



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i Microbiologia

Programa de Doctorado en Microbiología

**Caracterización molecular de la resistencia de
Mycobacterium tuberculosis en un área rural de Angola**

Tesis presentada por:

Ariadna Rando Segura

Para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología del
Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona bajo la dirección de:

Dra. María Teresa Tórtola Fernández

Dr. Israel Molina Romero

Tutora:

Rosa María Bartolomé Comas

Barcelona, junio 2021



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

Programa de Doctorado en Microbiología

**Caracterización molecular de la resistencia de
Mycobacterium tuberculosis en un área rural de Angola**

Ariadna Rando Segura, 2021

María Teresa Tórtola Fernández, profesora asociada médica del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y responsable de la unidad de Micobacterias del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, **Israel Molina Romero**, responsable de la unidad de Medicina Tropical y Salud Internacional del Hospital Vall d'Hebron y director del Programa de Salut Internacional de l'ICS (PROSICS), y **Rosa María Bartolomé Comas**, profesora titular del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Caracterización molecular de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en un área rural de Angola”, presentado por la Licenciada en Biología y especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, Ariadna Rando Segura, ha sido realizado en el Hospital Universitario Vall d'Hebron bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal que corresponda.

Directores de Tesis Doctoral:

Tutora:

Dra. M.^a Teresa Tórtola

Dr. Israel Molina

Rosa M.^a Bartolomé

En Barcelona, junio de 2021

A mis padres y mis hermanos

Cuando un médico va detrás del féretro de su paciente, a veces la causa sigue al efecto.

Robert Koch

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de un gran número de personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento.

A mis dos directores de tesis, María Teresa Tórtola y Israel Molina, agradecerles haberme dado la oportunidad de formar parte de este proyecto. Hago extensivo este agradecimiento a Mateu Espasa y Elena Sulleiro. A todos ellos, quisiera agradecerles su dedicación, paciencia y confianza en mí todos estos años.

A Milagros Moreno, Israel Molina, Elena Sulleiro, Cristina Bocanegra, Marisa Aznar, Eva Gil y todos los profesionales sanitarios del Hospital *Nossa Senhora da Paz* agradecerles su colaboración e inspiración para cambiar las cosas.

A mis compañeros de laboratorio agradecerles su ayuda y apoyo en todo momento, especialmente a mis compañeros de la unidad de micobacterias por su inmensurable ayuda sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

A mi familia y amigos agradecerles por su paciencia, que no ha sido tarea sencilla.

A todos ellos agradecerles su ayuda para que esta tesis sea hoy una realidad.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AMK	amikacina
ARN	ácido ribonucleico
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Calmette-Guérin
BDQ	bedaquilina
CFZ	clofazimina
CMI	concentración mínima inhibitoria
CS	cicloserina
DLM	delamanid
DR	drogorresistente
ECOFF	punto de corte epidemiológico
EMB	etambutol
ETO	etionamida
FQ	Fluoroquinolonas
IPM/CLN	Imipenem/cilastatina
INF-γ	Interferón gamma
INH	isoniacida
KAN	kanamicina
LFX	levofloxacino
LIPA	pruebas basadas en sondas en línea
LZD	linezolid
MDR	multirresistente
MFX	moxifloxacino
MPM	meropenem
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex

NGS	secuenciación masiva
NTM	micobacterias no tuberculosas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	ácido para-aminosalicílico
PNLCT	Programa Nacional de Lucha Contra la tuberculosis
PTO	protionamida
PZA	pirazinamida
RIF	rifampicina
RR	resistente a rifampicina
RRDR	región determinante de resistencia a rifampicina
STM	estreptomicina
TB	tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
TDO	tratamiento acortado estrictamente observado
TRD	Terizidona
TNF	factor de necrosis tumoral
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

1. INTRODUCCION

- 1.1. Etiología de la tuberculosis
- 1.2. Historia natural e inmunopatología de la tuberculosis
- 1.3. Clínica de la tuberculosis
- 1.4. Bases bacteriológicas para el tratamiento de la tuberculosis
- 1.5. Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis
 - 1.5.1. Microscopía de frotis de esputo o baciloscopia
 - 1.5.2. Cultivo microbiológico
 - 1.5.3. Detección fenotípica de resistencias o antibiograma
 - 1.5.4. Detección genotípica de resistencias
- 1.6. Tratamiento de los pacientes con tuberculosis
 - 1.6.1. Tratamiento de los enfermos sin antecedente de tratamiento previo
 - 1.6.2. Tratamiento de los enfermos con antecedente de tratamiento previo
 - 1.6.3. Tratamiento de los pacientes con tuberculosis multirresistentes
 - 1.6.3.1. Esquema alargado de tratamiento
 - 1.6.3.2. Esquema acortado de tratamiento
- 1.7. Epidemiología: situación actual en África

2. JUSTIFICACION, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

- 2.1. Justificación del estudio
- 2.2. Hipótesis del estudio
- 2.3. Objetivos del estudio

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Ámbito y diseño del estudio

3.2. Diagnóstico microbiológico

3.2.1. Diagnóstico directo sobre muestra clínica

3.2.2. Cultivo, identificación i antibiograma

3.2.3. Caracterización molecular de la resistencia

3.2.4. Caracterización de la resistencia a rifampicina

3.2.4.1. Caracterización molecular por secuenciación del gen *rpoB*

3.2.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

4. RESULTADOS

4.1. Descripción de la población de estudio

4.2. Patrones de resistencia a fármacos antituberculosos

4.3. Caracterización de la resistencia a rifampicina

5. DISCUSIÓN

5.1. Prevalencia de tuberculosis drogorresistente

5.2. Caracterización de los patrones moleculares de resistencia

5.2.1. Patrones de resistencia genotípica a isoniazida

5.2.2. Patrones de resistencia genotípica a rifampicina

5.3. Evaluación de la rentabilidad diagnóstica del sistema GeneXpert

5.4. Propuesta de implementación de nuevos algoritmos diagnósticos

6. CONCLUSIONES

7. LÍNEAS DE FUTURO

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de tuberculosis en el 2019.....	10
Figura 2. Porcentaje de pacientes con tuberculosis multirresistente entre los pacientes nuevos.	10
Figura 3. Porcentaje de pacientes con tuberculosis multirresistente entre los pacientes previamente tratados.	11
Figura 4. Disminución de bacterias viables en una muestra de esputo de un paciente con enfermedad tuberculosa en tratamiento.	16
Figura 5. Características de los fármacos con actividad frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
Figura 6. Fármacos recomendados para el tratamiento de la tuberculosis resistente a rifampicina y la tuberculosis multirresistente.	20
Figura 7. Diagrama de árbol de decisión de pauta de tratamiento de los pacientes.	34
Figura 8. Región determinante de resistencia a rifampicina, sobre se ella se representan en distintos colores las zonas donde hibridan las cinco sondas de la prueba Xpert MTB/RIF.	35
Figura 9. Patrones de interpretación de la prueba MTBDR <i>plus</i> VER2.0.	37
Figura 10. Región determinante de resistencia a rifampicina. Bandas de tipo salvaje y de mutación incluidas en la prueba GenoType MTBDR <i>plus</i> VER2.0.	38
Figura 11. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos con solvente orgánicos cloroformo-alcohol isoamílico.	41
Figura 12. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos.	47
Figura 13. Distribución de los valores de concentración mínima inhibitoria a rifampicina entre los aislados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.	72
Figura 14. Caracterización de los aislados resistentes a rifampicina	77

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bandas de tipo salvaje y bandas de mutación incluidas en la prueba de detección molecular GenoType MTBDRplus VER2.0.	39
Tabla 2. Cebadores y protocolos de amplificación y secuenciación del gen <i>rpoB</i>	42
Tabla 3. Preparación de la batería de tubos mycobacteria growth indicator tube para la determinación de la concentración mínima inhibitoria a rifampicina empleando el sistema BACTEC MGIT 960.	43
Tabla 4. Características socio demográficas de los pacientes incluidos.	48
Tabla 5. Resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea entre los aislados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.	50
Tabla 6. Resistencia a fármacos antituberculosos de segunda línea entre los aislados multirresistentes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.	51
Tabla 7. Distribución de mutaciones asociadas a resistencia a isoniacida y rifampicina entre los aislados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.	52
Tabla 8. Caracterización de <i>rpoB</i> entre los aislados fenotípicamente resistentes a rifampicina.	53
Tabla 9. Caracterización de <i>rpoB</i> entre los aislados fenotípicamente sensibles a rifampicina.	54
Tabla 10. Comparación de los resultados de resistencia a rifampicina obtenidos mediante Xpert MTB/RIF y pruebas de detección de resistencia basadas en cultivo.	78

RESUMEN

La República de Angola es un país ubicado en la costa occidental del sur de África que se encuentra dentro de los 30 países con mayor carga de tuberculosis y mayor carga de tuberculosis multirresistente. Aunque no existen datos reales de prevalencia de tuberculosis multirresistente debido a la falta de laboratorios de microbiología capaces de realizar cultivos de micobacterias y la ausencia de métodos rápidos de detección de resistencia a *Mycobacterium tuberculosis* complex.

El Hospital *Nossa Senhora da Paz*, situado en Cubal, un municipio de unos 250.000 habitantes de la provincia de Benguela, en el sur del país, es un centro de referencia de tuberculosis a nivel nacional. Desde 2008 trabaja en colaboración con el Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona en diferentes proyectos dentro del ámbito sanitario. Uno de ellos permitió que entre abril de 2014 y julio de 2015, con el soporte financiero de PROBITAS, se llevará a cabo un estudio epidemiológico en el que se realizaron cultivos de esputo y pruebas de sensibilidad por métodos fenotípicos y genotípicos a todas las muestras basales de los pacientes con tuberculosis, así como una prueba rápida de reacción en cadena de la polimerasa y de resistencia a rifampicina (GeneXpert MTB/RIF) a todos los pacientes previamente tratados y a aquellos casos nuevos en los que la baciloscopia fue positiva tras dos meses de tratamiento.

En el periodo de estudio se incluyeron un total de 422 pacientes, 311 (74%) fueron casos nuevos y los restantes 111 (26%) eran pacientes previamente tratados. Basándonos en el antibiograma fenotípico registramos un 8,0% de multirresistentes en casos nuevos y un 71,1% en pacientes previamente tratados. Estos datos revelan cifras de multirresistencia alarmantes, más de cuatro veces la prevalencia de tuberculosis multirresistente estimada por la Organización Mundial de la Salud. Paralelamente, también se evaluó el perfil de mutaciones asociadas a resistencia a rifampicina (gen *rpoB*) de las cepas circulantes, ya que la utilidad de las técnicas moleculares de detección de resistencia podía verse afectada por variaciones de estas entre diferentes regiones geográficas. Encontramos un total de 87 aislados resistentes a rifampicina. De los cuales, 74 casos (85,1%) tenían mutaciones de

resistencia asociadas a alto nivel de resistencia en la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR), 9 casos (10,3%) tenían mutaciones de resistencia asociadas a bajo nivel de resistencia en la región de resistencia a rifampicina, 2 casos (2,3%) eran aislados heterorresistentes y 2 casos (2,3%) no tenían mutaciones en el gen *rpoB*. Por lo que los métodos moleculares de detección de resistencia, por sí solos no hubieran sido capaces de detectar como resistentes estas dos últimas cepas. También hay que desatacar que entre los aislados sensibles a rifampicina se detectaron dos aislados (0,9%) portadores de mutaciones con cambio de sentido en la región determinante de resistencia a rifampicina no asociadas a resistencia que podrían haber sido identificados erróneamente como aislados resistentes por los métodos moleculares de detección de resistencia. A pesar de todo ello, estos datos respaldan el uso generalizado de los ensayos moleculares para la detección rápida de resistencia a rifampicina.

En resumen, los datos aquí expuestos confirman que la tuberculosis es un problema de gran magnitud en Angola. No sólo por la elevada incidencia sino por la alta prevalencia de tuberculosis multirresistente, sobre todo en casos previamente tratados. Esto refuerza la necesidad de la incorporación en la práctica asistencial diaria de métodos de diagnóstico rápido de resistencias, la construcción de laboratorios con capacidad de realizar cultivos y antibiogramas de micobacterias, la incorporación de infraestructuras para el aislamiento y correcto manejo/tratamiento de los pacientes, así como la formación de personal sanitario.

SUMMARY

The Republic of Angola is a country located on the western coast of southern Africa that is among the 30 countries with the highest burden of tuberculosis and the highest burden of multidrug-resistant tuberculosis. Although there are no real data on the prevalence of multidrug-resistant tuberculosis due to the lack of microbiology laboratories capable of performing mycobacterial cultures and the absence of molecular assays for the rapid detection of resistance to *Mycobacterium tuberculosis* complex.

The *Nossa Senhora da Paz* Hospital, located in Cubal, a municipality of about 250,000 inhabitants in the province of Benguela, in the south of the country, is a reference center for tuberculosis nationwide. Since 2008 he has been working in collaboration with the Vall d'Hebron University Hospital in Barcelona on different projects within the healthcare field. One of them allowed that between April 2014 and July 2015, with the financial support of PROBITAS, an epidemiological study will be carried out in which sputum cultures and susceptibility testing were performed by phenotypic and genotypic methods on all baseline samples of tuberculosis patients, as well as, a rapid polymerase chain reaction test to detect rifampicin resistance-associated mutations (GeneXpert MTB / RIF) in all previously treated patients and in new cases in which the smear test was positive after two months of treatment.

In the study period, a total of 422 patients were included, 311 (74%) were new cases and the remaining 111 (26%) were previously treated patients. Based on the phenotypic antibiogram, we registered 8.0% of multidrug resistance in new cases and 71.1% in previously treated patients. These data reveal alarming multidrug-resistance figures, more than four times the prevalence of multidrug-resistant tuberculosis estimated by the World Health Organization. At the same time, the profile of mutations associated with rifampicin resistance (*rpoB* gene) of the circulating strains was also evaluated, since the usefulness of molecular resistance detection techniques could be affected by variations in the distribution of mutations between different geographic regions. We found a total of 87 rifampicin-resistant isolates. Of which, 74 cases (85.1%) had mutations in the rifampicin resistance

determining region associated with high level resistance, 9 cases (10.3%) had mutations in the rifampicin resistance determining region associated with low level resistance, 2 cases (2.3%) were heteroresistant isolates and 2 cases (2.3%) did not have mutations in the *rpoB* gene. Therefore, molecular assays for detection resistance, by themselves, would not have been able to detect these last two strains as resistant. It should also be noted that among the rifampicin-sensitive isolates, two isolates (0.9%) had missense mutations in the rifampicin resistance determining region not associated with resistance that could have been erroneously identified as resistant isolates by molecular assays for detection resistance. Despite this, these data support the widespread use of molecular assays for the rapid detection of rifampicin resistance.

In summary, the data presented here confirm that tuberculosis is a major problem in Angola. Not only associated with higher tuberculosis incidence but also with higher prevalence of multidrug-resistant tuberculosis, especially in previously treated cases. This reinforces the need for the incorporation into daily healthcare practice of methods for rapid diagnosis of resistance, the construction of laboratories with the capacity to carry out cultures and antibiograms of micobacterias, the incorporation of infrastructures for the isolation and correct management/treatment of patients, as well as the training of health personnel.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

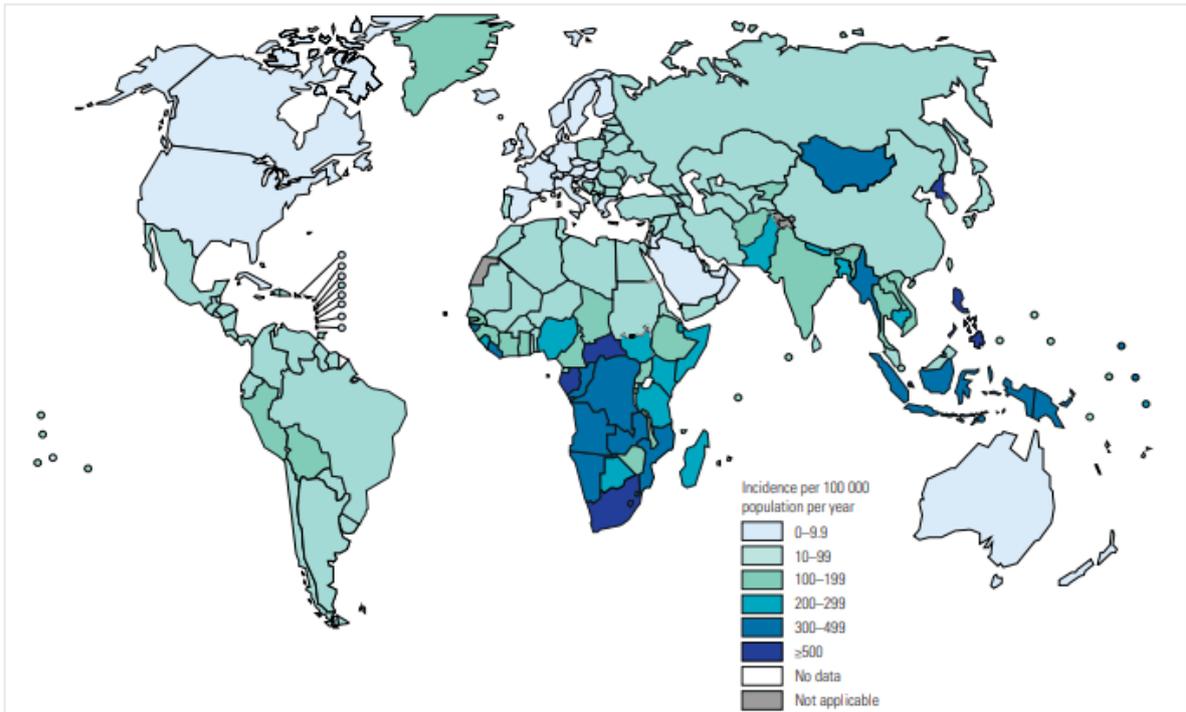
La antigüedad del bacilo de la tuberculosis (TB) se ha estimado en más de 70 mil años.¹ Por lo tanto, es probable que la TB sea una de las enfermedades infecciosas más antiguas de la humanidad (existen evidencias del padecimiento de esta enfermedad desde 3,700 a.C.). Sin embargo, aún constituye un importante problema de salud pública y desafortunadamente parece distar mucho de poder ser erradicada.²

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2019, 10 millones de personas enfermaron de TB y 1,4 millones murieron. Desde el punto de vista geográfico, la mayoría de los casos de TB se registraron en las Regiones de la OMS de Asia Sudoriental (44%), África (25%) y el Pacífico Occidental (18%), con porcentajes menores en el Mediterráneo Oriental (8,2%), las Américas (2,9%) y Europa (2,5%). Aunque proporcionalmente a la población, la región de África es la que soporta la mayor carga de enfermedad, véase figura 1.²

La resistencia a los fármacos antituberculosos constituye un problema añadido que amenaza el éxito de la lucha contra la TB en todo el mundo. En 2019, se estima que hubo medio millón de personas afectadas por una TB multirresistente (MDR). Los tres países con una mayor proporción de carga mundial de TB MDR fueron la India (27%), China (14%) y la Federación Rusia (8%). En el ámbito mundial, se estima que el 3,4% de los casos nuevos de TB y el 18% de los casos previamente tratados eran personas afectadas por una TB MDR. Las tasas más altas (>50% en casos tratados previamente) se dan en países de la antigua Unión Soviética, véase figura 2 y 3.²

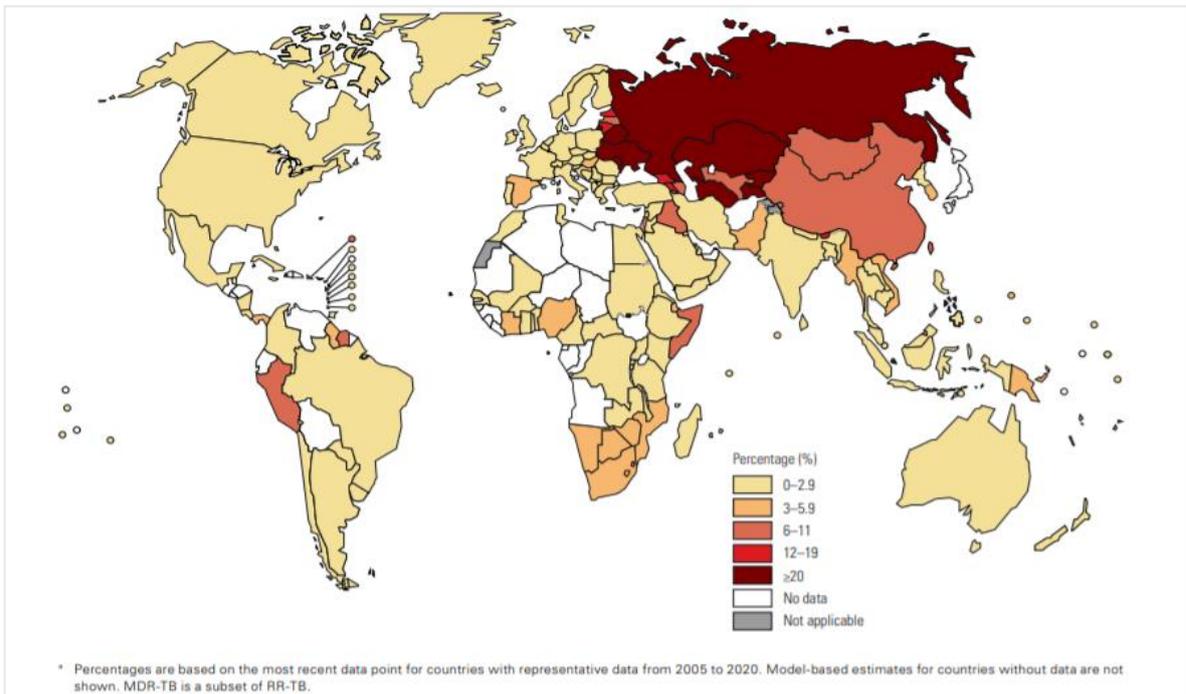
Sin embargo, con el diagnóstico y tratamiento oportuno la mayoría de las personas enfermas de TB pueden curarse y la transmisión de la infección puede frenarse. Además, el número de casos anuales de TB (y por ende el número de muertes debidas a la enfermedad) también puede aminorarse reduciendo la prevalencia de los factores de riesgo de la TB (por ejemplo, el tabaquismo, la diabetes y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH]), ofreciendo tratamiento preventivo a las personas con infección latente y adoptando medidas multisectoriales sobre los determinantes generales de la infección y la enfermedad (por ejemplo, la pobreza, la calidad de la vivienda y la desnutrición).²

Figura 1. Incidencia de tuberculosis en el 2019



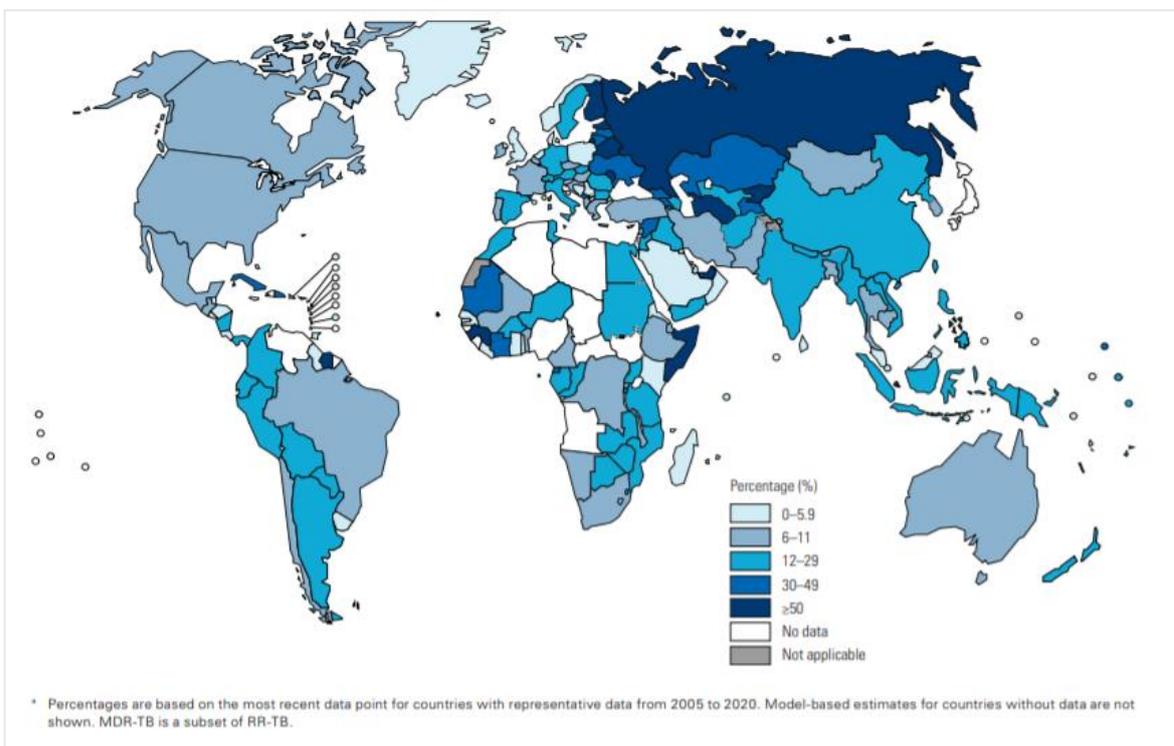
Fuente: WHO. *Global Tuberculosis Report 2020.*²

Figura 2. Porcentaje de pacientes con tuberculosis multirresistente entre los pacientes nuevos.



Fuente: WHO. *Global Tuberculosis Report 2020.*²

Figura 3. Porcentaje de pacientes con tuberculosis multirresistente entre los pacientes previamente tratados.



Fuente: WHO. *Global Tuberculosis Report 2020*.²

1.1 Etiología de la tuberculosis

El 24 de marzo de 1882 el médico y microbiólogo alemán Robert Heinrich Herman Koch (1843-1910) anunció el descubrimiento del agente etiológico de la TB.³ Sin embargo, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (sensu estricto) no es la única causa de TB en humanos. Todas las especies capaces de producir TB en humanos y/o animales se agrupan dentro del complejo *M. tuberculosis* (MTBC). Este complejo está compuesto por *M. tuberculosis* (sensu estricto), *Mycobacterium canetti* (subespecie de *M. tuberculosis*), *Mycobacterium africanum* (subtipo I o II), *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium orygis* y *Mycobacterium pinnipedi*.^{4,5} Los miembros de este grupo son micobacterias altamente relacionadas, que exhiben una gran homogeneidad en la secuencia de nucleótidos, a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente, y algunas

características fisiológicas, tales como la morfología de la colonia o el patrón de resistencia a fármacos.⁶

MTB (sensu estricto) es la principal causa de TB en humanos e infecta a más de un cuarto de la población mundial (su único reservorio).² Sin embargo, hay que tener en cuenta que en algunas regiones de África la principal causa de TB en humanos puede ser *M. africanum* (*M. africanum* subtipo I es más frecuente en la zona oeste del continente africano y *M. africanum* subtipo II es más frecuente en la zona este). *M. bovis* causa TB en el ganado, los humanos y otros primates, así como, en animales como perros, gatos, cerdos o papagayos. *M. caprae*, *M. microti*, *M. orygis*, y *M. pinnipedi* infectan al ganado caprino, pequeños roedores, bóvidos y pinnípedos, respectivamente, todas ellos son causantes de casos de zoonosis, aunque en menor medida que *M. bovis*.^{4,5} Por otro lado, *M. bovis*-BCG es una variante atenuada obtenida en el laboratorio a partir de una cepa de *M. bovis* que por sucesivos pases de cultivo perdió su poder patógeno, pero mantuvo su capacidad antigénica; motivo por el cual actualmente se utiliza como vacuna para la prevención de la TB, como vehículo recombinante para otras vacunas y como tratamiento inmunógeno que puede causar enfermedad en inmunodeprimidos al tratarse de una cepa viva.^{4,5}

La taxonomía molecular ubica estas especies dentro del orden *Actinomycetales*, el suborden *Corynebacterineae* y la familia *Mycobacteriaceae*. Todos ellos son bacilos inmóviles aerobios o microaerófilos ligeramente curvados o rectos (0,2-0,6 x 1,0-10 µm) que suelen presentarse sueltos, pero a veces aparecen ramificados formando filamentos y micelios que se fragmentan con facilidad en formas bacilares y cocoides. Sin embargo, no producen conidios ni hifas áreas visibles. Otra característica diferencial es el alto porcentaje de guanina más citosina (G+C=57-73%) del genoma de las micobacterias, así como, la presencia de una pared celular muy compleja, con abundancia de lípidos (algo excepcional entre las bacterias grampositivas). Esta capa cerosa confiere muchas de las características propias del género: ácido-alcohol resistencia, hidrofobicidad, resistencia a varios antibióticos, además de distintas propiedades inmunológicas.⁷

1.2 Historia natural e inmunopatología de la tuberculosis

En la mayoría de los casos la TB humana es el resultado de la inhalación de gotas de Pflügge (micro gotas, principalmente de saliva y moco, que se expulsan por la boca y la nariz al hablar, estornudar, toser o espirar) que albergan el bacilo. Estas partículas miden menos de 5 μm , y en el exterior, pierden una parte de su contenido acuoso por evaporación, dejando un núcleo con unos pocos bacilos que puede permanecer en suspensión por un periodo prolongado en el ambiente. Las partículas de gran tamaño ($>10 \mu\text{m}$) quedan fácilmente retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, sin embargo, las de pequeño tamaño (entre 1 y 5 μm), como las gotas de Pflügge, tienen la capacidad de llegar hasta los alveolos. Si esto sucede los bacilos serán fagocitados por los macrófagos alveolares.⁶

Dado que MTB es un agente patógeno intracelular, el bacilo consigue evitar su destrucción, impidiendo la unión del fagosoma y el lisosoma, y multiplicándose en el interior del macrófago hasta posteriormente destruirlo. Al igual que ocurre con otros patógenos intracelulares, el macrófago infectado secreta citocinas (entre ellas, el factor de necrosis tumoral [TNF]) y quimiocinas que desencadenan un proceso inflamatorio local, y con ello una respuesta inespecífica de defensa que se caracteriza por el acumulo inicial de neutrófilos y posteriormente de nuevos macrófagos en el foco de infección. Esta respuesta innata fracasa en la contención del bacilo, de manera que consigue diseminarse. Este crecimiento bacilar es detenido con la generación de una respuesta inmunitaria basada en linfocitos T de tipo CD4 mayoritariamente, pero también de linfocitos CD8 y linfocitos B. La respuesta inmunológica protectora contra la TB está dominada por la inmunidad celular, con muy poca participación de los anticuerpos. Los linfocitos Th1 tienen un particular interés, ya que migran hacia el foco de infección y liberan citocinas activadoras de macrófagos, tales como el interferón gamma (INF- γ) y el TNF- α . Igualmente, son los responsables de la hipersensibilidad retardada, al desplazarse y proliferar ante la presencia de pequeñas concentraciones de proteínas de la pared celular de MTB permitiendo focalizar macrófagos y linfocitos específicos alrededor del bacilo, evitando su crecimiento y su

diseminación. La activación de los macrófagos mediante INF- γ desencadena una acidificación y un incremento de los radicales de oxígeno y de nitrógeno en el interior del fagosoma que permite destruir un alto porcentaje de población bacilar. No obstante, el porcentaje restante es capaz de adaptar su metabolismo para responder a esta situación de estrés y consigue sobrevivir en estado de latencia. En el 90% de los casos la pequeña población bacilar del granuloma crónico acaba por ser destruida previa fibrosis y reabsorción del granuloma en un proceso de años de evolución. En un 5% puede originar una enfermedad primaria, en el caso de que el crecimiento bacilar no sea contenido inicialmente, ocasionando cuadros patológicos de diferente gravedad. El 5% restante de los infectados pueden desarrollar una enfermedad postprimaria durante toda la vida, a partir de la reactivación de focos infecciosos localizados.⁶

1.3 Clínica de la tuberculosis

Las manifestaciones clínicas son inespecíficas y muy variables. Habitualmente se distinguen manifestaciones de carácter general y otras referidas al órgano o sistema afecto. Las manifestaciones generales clásicas consisten en un cuadro inespecífico subagudo o crónico caracterizado por adelgazamiento, astenia, anorexia, febrícula de predominio vespertino y sudoración nocturna. En ocasiones (10-20%), la TB es asintomática y se descubre de forma casual o mediante el estudio de contactos de un enfermo tuberculoso. Los datos de laboratorio son asimismo inespecíficos; puede observarse leucocitosis y leucopenia, y a veces anemia.⁶

Aunque la TB puede afectar cualquier órgano, la mayoría de las infecciones en pacientes inmunocompetentes están restringidas a los pulmones (85-90%).⁶ La edad de presentación depende de la situación epidemiológica; en países con alta prevalencia afecta a personas jóvenes (edad media inferior a 30 años), mientras que en los de baja prevalencia afecta a personas mayores.⁶ Varios factores aumentan el riesgo de contraer la TB. Enfermedades concomitantes como la infección por el VIH, la *diabetes mellitus*, el tabaquismo, el consumo de alcohol y drogas y los trastornos de salud mental aumentan significativamente el riesgo de padecer TB. Otras afecciones

que alteran los mecanismos de defensa del sistema inmunitario como la desnutrición, el cáncer y los tratamientos con inmunomoduladores también aumentan el riesgo de presentar TB.⁸

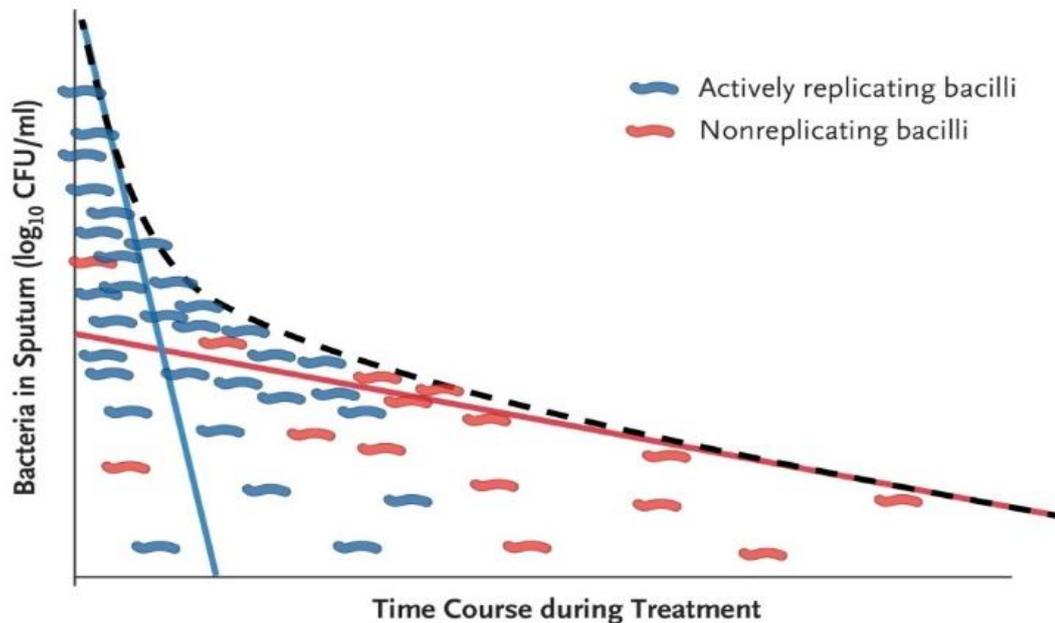
1.4 Bases bacteriológicas para el tratamiento de la tuberculosis

Las micobacterias presentan resistencia natural a numerosos antibacterianos, por el hecho de poseer una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos.⁹ También se han descrito enzimas modificantes, como betalactamasas, o sistemas de eflujo que contribuyen a esta resistencia natural.^{10,11} Por todo ello, el tratamiento de la TB se lleva a cabo mediante fármacos específicos, también llamados fármacos antituberculosos.

La estreptomycin (STM) fue el primer fármaco antituberculoso eficaz que se utilizó en el tratamiento de la TB, introducida en 1946.¹² Sin embargo, poco tiempo después se observó que los pacientes experimentaban una mejoría inicial con una rápida recaída como consecuencia del desarrollo de resistencias al fármaco.¹³ La resistencia adquirida a fármacos en MTBC se debe a mutaciones espontáneas en los genes que regulan las dianas de los fármacos antituberculosos. Estas mutaciones son cromosómicas e irreversibles. Se estima que una población de en torno a 10^6 bacterias/ml puede generar una bacteria mutante frente a un fármaco. Por ello, si se administra un único fármaco es seguro que se desarrollará resistencia, debido a que la población de bacterias en las lesiones supera este número y, por tanto, una vez el fármaco hayo eliminado las bacterias sensibles, la bacteria mutante regenerará de nuevo la población. Si se administran dos fármacos de forma simultánea, será necesario que haya una población bacteriana de 10^{10} a 10^{12} bacterias/ml para generar una mutante a ambos fármacos. Esta es una población elevada poco frecuente de alcanzar en las lesiones. Con la administración conjunta de tres fármacos se eleva hasta 10^{15} a 10^{18} bacterias/ml el número de bacterias necesario para generar una bacteria mutante a los tres fármacos, una población imposible de alcanzar. Por tanto, administrar tres fármacos eficaces es el objetivo. No obstante, las pautas terapéuticas con cuatro fármacos se justifican por la posibilidad de contagiarse con una cepa resistente a alguno de ellos.¹⁴ En resumen, se requiere la asociación de varios

fármacos para evitar el desarrollo de resistencias. Otro factor importante a tener en cuenta es la necesidad de una quimioterapia prolongada para que los fármacos puedan actuar sobre todas las poblaciones bacilares y evitar las recaídas, ver figura 4.

Figura 4. Disminución de bacterias viables en una muestra de esputo de un paciente con enfermedad tuberculosa en tratamiento.



El número de bacterias disminuye rápidamente durante la fase inicial del tratamiento (curva azul), esta tasa de disminución es menos rápida en la fase posterior (curva roja). El patrón bifásico que se observa (curva negra discontinua) sugiere la presencia de varias poblaciones bacterianas con diferente sensibilidad a los fármacos antituberculosos. *Abreviaturas:* CFU = unidades formadoras de colonia, por sus siglas en inglés.

Fuente: Horsburgh CR et al. Treatment of Tuberculosis.¹⁵

En el foco de infección existen poblaciones bacilares con diferentes características metabólicas: los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio (bacilos metabólicamente activos); los bacilos del interior de los macrófagos se multiplican en un ambiente microaerófilo que induce la latencia (bacilos en fase de inhibición ácida), y los que se encuentran en el interior del *caseum* tienen un crecimiento intermitente (bacilos en fase de multiplicación esporádica).¹⁶ Por otro lado, también hay que tener en cuenta la biodisponibilidad de los fármacos. Los bacilos pueden multiplicarse en los tejidos, donde la penetración de los antibióticos es fácil o bien encontrarse en cavidades

pulmonares, pus o material caseoso, donde la penetración de los antibióticos resulta más difícil.¹⁶ Esto hace que los fármacos presenten un perfil de actividad diferenciado frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones, y es necesario asegurarse de que el tratamiento prescrito sea activo frente a todas ellas,¹⁶ véase figura 5.

Figura 5. Características de los fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Actividad y toxicidad de los fármacos anti-TB					
Actividad	Prevención de resistencias	Actividad bactericida	Actividad esterilizante	Toxicidad	
Alta	Rifampicina Isoniacida Ethambutol	Isoniacida Rifampicina Mfx / Lfx	Rifampicina Pirazinamida Mfx / Lfx	Ethambutol Rifampicina Isoniacida Mfx / Lfx	Baja
Moderada	Inyectables Mfx / Lfx Ethionamida Cicloserina PAS Linezolid?	Inyectables Linezolid Bedaquilina? Delamanid?	Linezolid Clofazimina Bedaquilina? Delamanid?	Inyectables Pirazinamida	Moderada
Baja	Pirazinamida	Ethionamida Pirazinamida		Resto	Alta

La prevención de resistencias, la actividad bactericida y la actividad esterilizante se exponen de mayor a menor (actividad alta, moderada y baja) en la tabla, mientras que la toxicidad se expone al revés en la flecha del lado derecho (baja, moderada, alta), para poder poner en la parte superior los mejores fármacos disponibles según todas estas características.

Fuente: Caminero JA et al. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos.¹⁷

1.5 Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis

1.5.1 Microscopía de frotis de esputo o baciloscopia

En el momento actual, la técnica más rápida, sencilla y accesible para realizar el diagnóstico rápido de la TB es la tinción ácido-alcohol resistente. Permite la detección en muestras clínicas de todos los miembros del género *Mycobacterium*, pero para que sean detectables deben existir entre 5.000–10.000 bacilos/ml en la muestra. En países con alta carga de TB, la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en

muestras clínicas suele ser sinónimo de TB, sobre todo en muestras respiratorias. Las técnicas de tinción más empleadas son las tinciones de Ziehl-Neelsen y la fluorescente de Auramina-Rodamina. Se ha demostrado que la especificidad de ambas es similar, si bien la tinción fluorescente posee la ventaja de ser examinada con un menor número de aumentos, lo que redundará en un menor tiempo de evaluación de cada extensión. Se recomienda además la realización de un recuento del número de bacilos presente en la muestra para valorar el seguimiento del tratamiento.¹⁸

La identificación de casos bacilíferos es de especial importancia, puesto que se trata de los pacientes más contagiosos, y su detección es prioritaria en todos los programas de lucha contra la TB como paso esencial en la rotura de la cadena de transmisión de la enfermedad. Por ello, todo paciente sospechoso de TB debe ser estudiado mediante tinción.¹⁸ Además de su papel fundamental en el diagnóstico, la microscopía también es esencial para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento. En este sentido, deben obtenerse muestras para baciloscopia coincidiendo con las visitas de seguimiento. El número de bacterias presentes en la tinción disminuirá si el tratamiento es eficaz, aunque la conversión de la tinción puede tardar en función de la carga bacilar inicial de las lesiones.¹⁸

1.5.2 Cultivo microbiológico

Se debe realizar el cultivo para micobacterias en todo paciente con sospecha de TB. El cultivo, considerado la prueba de referencia, posee mucha mayor sensibilidad que la tinción, siendo capaz de detectar entre 10-100 bacterias/ml de muestra. Además, permite aislar la micobacteria presente en la muestra, y hace posible su identificación de especie y el estudio de sensibilidad a los antibióticos. El principal inconveniente del cultivo es la lentitud en la obtención de resultados positivos, hecho que está determinado por las características metabólicas del patógeno. MTB, así como el resto de especies del complejo, son micobacterias de crecimiento lento, lo que implica que son necesarias de dos a seis semanas para dar lugar a crecimiento visible macroscópicamente en medios de cultivo sólidos. Con el objetivo de minimizar este período de incubación se han empleado diversas estrategias, y en el momento actual la más utilizada es el empleo de medios líquidos automatizados. Estos medios

permiten detectar la presencia de crecimiento bacteriano entre 7–10 días antes que los medios sólidos.¹⁸

1.5.3 Detección fenotípica de resistencias o antibiograma

El estudio de sensibilidad de MTBC se basa en la detección en el cultivo de un porcentaje superior al 1% de bacterias resistentes en comparación con un control de crecimiento sin antibiótico. La existencia de estas bacterias resistentes se debe a la elevada tasa de mutaciones de resistencia que presentan frente a los distintos antibióticos utilizados en el tratamiento. En el momento actual, en el mercado se dispone de varios sistemas comerciales estandarizados, basados en los mismos medios líquidos automatizados o semiautomatizados utilizados en el cultivo. Permiten la realización del antibiograma de forma relativamente sencilla en la mayoría de los laboratorios de micobacteriología. No obstante, deberá ser realizado por laboratorios con experiencia que posean una carga de trabajo suficientemente elevada, y que se sometan de forma repetida a diversos controles de calidad, tanto internos como externos. En el momento actual se recomienda la realización de antibiograma a fármacos de primera línea a todos los aislamientos de muestras iniciales de pacientes nuevos o tratados previamente, con el objetivo de conocer la respuesta de los aislados clínicos frente a los mismos y ajustar el tratamiento cuando sea necesario. Cuando se detectan resistencias es importante confirmarlas, si es preciso repitiendo el ensayo o remitiendo el aislado a un centro de referencia, así como descartar falsas resistencias debidas a contaminación por otras micobacterias o por bacterias convencionales. Ante la presencia de resistencia, sobre todo a isoniacida (INH) y/o rifampicina (RIF), estará indicada la realización de antibiograma frente a fármacos de segunda línea. Como no existe en la actualidad una estandarización ampliamente aceptada, se recomienda derivar el aislado a un centro de referencia o con suficiente experiencia en su realización.¹⁸

Los aislados resistentes se clasificarán en categorías en función de las pruebas de sensibilidad antibiótica: *monorresistencia*, resistencia a solo un antituberculoso de primera línea; *polirresistencia*, resistencia a más de un antituberculoso de primera línea distinto de la NH y la RIF; *multirresistencia*, resistencia a al menos la INH y la

RIF; *extremadamente resistente*, aislados MDR con resistencia a fluoroquinolonas (FQ) y por lo menos uno de los tres fármacos del grupo A,¹⁹ ver figura 6.

Figura 6. Fármacos recomendados para el tratamiento de la tuberculosis resistente a rifampicina y la tuberculosis multirresistente.

Grupo de Fármacos		Fármaco	Abreviación
Grupo A	Incluya los tres medicamentos (a menos que no se puedan usar)	Levofloxacino o moxifloxacino	LFX o MFX
		Bedaquilina	BDQ
		Línezolid	LZD
Grupo B	Agregue ambos medicamentos (a menos que no se puedan usar)	Clofazimina	CFZ
		Cicloserina o terizidona	CS o TRD
Grupo C	Agregar para completar el régimen y cuando no se puedan usar medicamentos de los grupos A y B	Etambutol	EMB
		Delamanid	DLM
		Pirazinamida	PZA
		Imipenem/cilastatina o meropenem	IPM/CLN o MPM
		Amikacina (o estreptomicina)	AMK (o STM)
		Etionamida o protionamida	ETO o PTO
		ácido para-aminosalicílico	PAS

Fuente: WHO. WHO treatment guidelines for drug resistant tuberculosis 2016 update.²⁰

1.5.4 Detección genotípica de resistencias

La lentitud del antibiograma (4-8 semanas desde la obtención de la muestra) ha estimulado el desarrollo de métodos rápidos de detección molecular de resistencias. Se basan en la premisa de que el mecanismo principal de resistencia a los fármacos son mutaciones cromosómicas irreversibles, por lo que detectando las mutaciones se diagnostica la resistencia. La ventaja más importante de los métodos genéticos de detección de resistencias es la rapidez. En condiciones de rutina asistencial permite obtener resultados en pocas horas o pocos días. Cuando se aplica sobre cultivos positivos, la sensibilidad es cercana al 100% para detectar las mutaciones incluidas en el diseño de la técnica. También puede utilizarse directamente sobre muestras clínicas. En este caso, la sensibilidad dependerá de la concentración de bacterias en la muestra, siendo mayor en las muestras con microscopía positiva con alta carga bacilar y menor en las muestras con microscopía negativa. No obstante, la realización del antibiograma debería ser obligada, ya que estas técnicas no detectan todas las

resistencias, por lo que su principal utilidad se la confiere el proporcionar una información preliminar y rápida del antibiograma, especialmente cuando se detectan mutaciones de resistencia.¹⁴

De entre estas técnicas moleculares es necesario resaltar la prueba Xpert MTB/RIF, que permite la identificación de MTBC, así como, la detección de resistencia a RIF en un plazo de 2 horas, en muchos entornos con bajos requerimientos de bioseguridad e infraestructura. I las pruebas basadas en sondas en línea (LiPA, por sus siglas en inglés) de las cuales existen varios ensayos comercializados que permiten la detección rápida (en menos de 48 horas) de resistencias a fármacos de primera (INNO-LiPA Rif.TB, GenoType MTBDR*plus*) y segunda línea (GenoType MTBDR*s*).

1.6 Tratamiento de los pacientes con tuberculosis

En condiciones ideales, la elección de un régimen de tratamiento apropiado debería determinarse en función del perfil de resistencia del microorganismo que afecta al paciente. Sin embargo, en algunos países el acceso a pruebas de sensibilidad a fármacos es muy limitado. Por ello, el régimen terapéutico se suele establecer en función del antecedente de tratamiento previo.⁸

1.6.1 Tratamiento de los enfermos sin antecedente de tratamiento previo

En los casos nuevos en los que se presupone sensibilidad a todos los fármacos, la pauta terapéutica de elección será la asociación de INH, RIF, EMB y PZA durante dos meses, seguida de una fase de continuación de cuatro meses con INH y RIF (fase de continuación con INH, RIF y EMB si las tasas de resistencia primaria a INH son altas).⁸

1.6.2 Tratamiento de los enfermos con antecedente de tratamiento previo

Entre las personas que han recibido tratamiento en el pasado, se incluyen aquellas que necesitan un tratamiento por una recaída, un tratamiento después de un fracaso terapéutico o un tratamiento después de pérdida durante el seguimiento. El correcto manejo de estos pacientes con alta sospecha de multirresistencia primaria requiere de la realización de pruebas de sensibilidad a fármacos. Recomendándose, como

mínimo, la realización de pruebas de diagnóstico rápido para la detección de resistencia a RIF. Si estas pruebas no detectan mutaciones asociadas a resistencia, la pauta terapéutica de elección será la asociación de INH, RIF, PZA y EMB durante seis meses. Por el contrario, si se demuestra la presencia de mutaciones asociadas a resistencia, se recomendará el uso de pautas para el tratamiento de TB-MDR.⁸

1.6.3 Tratamiento de la tuberculosis multirresistente

1.6.3.1 Esquemas alargados de tratamiento

Los esquemas alargados de tratamiento tienen, en general, una duración total del tratamiento de 18 a 20 meses. I consisten en pautas que han de incluir los tres fármacos del grupo A y al menos un fármaco del grupo B para asegurar que el tratamiento comience con al menos cuatro fármacos contra la TB que probablemente sean efectivos y que se incluyan al menos tres fármacos durante el resto del tratamiento después de que se suspenda la administración de la BDQ (normalmente se interrumpe 6 meses después de iniciar su administración). Si solo se utilizan uno o dos fármacos del grupo A, se deben incluir los dos fármacos del grupo B. Si el esquema no puede estar compuesto únicamente por fármacos de los grupos A y B, se añaden fármacos del grupo C para completarlo, ver figura 6.

1.6.3.2 Esquemas acortados de tratamiento

En pacientes que no hayan recibido previamente tratamiento durante más de 1 mes con fármacos de segunda línea utilizados en el esquema acortado de tratamiento de la TB-MDR o en los que se ha descartado la resistencia a las FQ y a los fármacos inyectables de segunda línea, se puede utilizar un esquema acortado de tratamiento de la TB-MDR de 9 a 12 meses, en lugar de los esquemas alargados. Este régimen consta de una fase inicial intensiva de cuatro meses (prolongable hasta un máximo de seis meses) con AMK (puede también usarse kanamicina [KAN]), MFX, CFZ, PTO (o ETO), PZA, EMB e INH. Seguido de una fase de continuación de cinco meses con MFX, CFZ, EMB y PZA.⁸

1.7 Epidemiología: situación actual en África

Según el informe presentado por la OMS se estima que en 2019 aproximadamente 2,5 millones de personas enfermaron de TB, de los cuales, 1.310.000 (53,3%) eran hombres, 793.000 (32,2%) eran mujeres y 355.000 (14,4%) eran niños (edad <15 años). Con una población estimada de 1090 millones de personas, estos datos corresponden a una incidencia de 226 casos por 100.000 habitantes y año (1,7 veces mayor que la media global). Esta región acumula, también, la mayor incidencia de casos de TB asociada a VIH. Se estima que hubo aproximadamente 600 mil personas con TB asociada al VIH, es decir, casi, una cuarta parte de los casos de TB en la región de África están asociados al VIH. Y estos representan el 75% de todos los casos de TB asociada a VIH a nivel mundial. Los datos de mortalidad también son preocupantes, ya que se estima que hubo casi 550 mil personas que murieron de TB en esta región. No obstante, es importante resaltar que la tendencia de la incidencia y de la mortalidad en la región va a la baja, con una reducción de la incidencia del 16% y una disminución de la mortalidad del 19% entre 2015 y 2019. Esta mejoría está íntimamente relacionada con la mejora de los programas de prevención y control de la infección por VIH, lo que está permitiendo reducir el número de casos de TB asociada al VIH. Sin embargo, aún quedan muchos otros aspectos por cubrir. La tasa de detección de TB, entendida como el porcentaje de casos diagnosticados entre los estimados, fue de tan sólo el 57% en el año 2019. Esto significa que hay una brecha de casi un millón de enfermos no notificados o, peor aún, no diagnosticados. Otro aspecto a resaltar es la resistencia a fármacos antituberculosos. Se estima que, en 2019, el 3,3% de los casos nuevos y el 17,7% de los casos de TB previamente tratados presentaban cepas MDR (770.000 casos). Sin embargo, a la mayoría de los pacientes no se les realizaron pruebas de sensibilidad a fármacos de primera línea (según datos comunicados tan sólo se realizaron pruebas de sensibilidad a fármacos al 41% de los enfermos). Esto explica la baja tasa de detección, tan sólo se detectaron el 3,8% de los casos. Lo que pone de manifiesto la necesidad de fortalecer los servicios de laboratorio y diagnóstico de la TB en esta región, pues existe una brecha de casi 740.000 pacientes MDR sin diagnosticar.

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.1 Justificación del estudio

Las autoridades sanitarias de la República de Angola, siguiendo las recomendaciones de la OMS, implementaron tras el fin de la guerra civil (año 2002) estrategias de manejo clínico-programático de la TB. Sin embargo, esta acción demostró tener poco impacto pues la mortalidad por TB en el país fue en aumento. En el año 2013 se notificaron 68.480 muertes por TB, un 15% más que en 2003 (58.148 defunciones por TB notificadas). Para justificar este incremento se argumentaron varias razones, como la fragilidad de un sistema de salud devastado por la guerra, la rápida urbanización de las ciudades o el advenimiento de la epidemia del VIH.²¹

Los profesionales sanitarios del hospital angoleño *Nossa Senhora da Paz*, en colaboración con el grupo de enfermedades infecciosas del Hospital Universitari Vall d'Hebron, llevaron a cabo durante el periodo 2009-2010 un estudio observacional prospectivo que puso de manifiesto una baja tasa de éxito de tratamiento entre los enfermos nunca tratados.²² Este hallazgo sembró la idea de que el exceso de mortalidad observado era debido a la irrupción de aislados resistentes. Pero los investigadores no pudieron confirmar esta hipótesis pues la microscopía de frotis de esputo era la única prueba disponible. Esta situación, dejó al descubierto la falta de capacidad de diagnóstico de los servicios de laboratorio, y la necesidad de reportar datos sobre resistencia a fármacos antituberculosos en la región.

La ampliación de la capacidad para diagnosticar TB farmacorresistente se convirtió en una prioridad para mejorar la detección y el tratamiento de la TB y justificó la puesta en marcha de un proyecto de colaboración cuyo principal objetivo era reforzar la capacidad diagnóstica del centro de TB del hospital *Nossa Senhora da Paz* mediante la incorporación de la plataforma de pruebas moleculares GeneXpert (Cepheid).

2.2 Hipótesis del estudio

Los profesionales sanitarios implicados decidieron aprovechar esta intervención para realizar, en paralelo, un estudio prospectivo de vigilancia de la resistencia a fármacos y confirmar la alta rentabilidad de esta prueba para el diagnóstico de la TB resistente a RIF, así como, confirmar que la baja tasa de éxito de tratamiento entre los enfermos de TB estaba asociada a una elevada incidencia de aislados farmacorresistentes en la región.

2.3 Objetivos del estudio

☒ **Objetivos principales**

- Estimar la prevalencia de tuberculosis drogoresistente (DR) entre los nuevos casos de tuberculosis pulmonar (TBP) en la ciudad angoleña de Cubal, provincia de Benguela.
- Evaluar la rentabilidad de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos - Xpert MTB/RIF - para diagnosticar resistencia a RIF.

☒ **Objetivos secundarios**

- Establecer los patrones de resistencia fenotípica a fármacos de primera línea entre los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Establecer los patrones de resistencia fenotípica a fármacos de segunda línea entre los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes.
- Establecer los patrones de resistencia genotípica a isoniacida y rifampicina entre los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

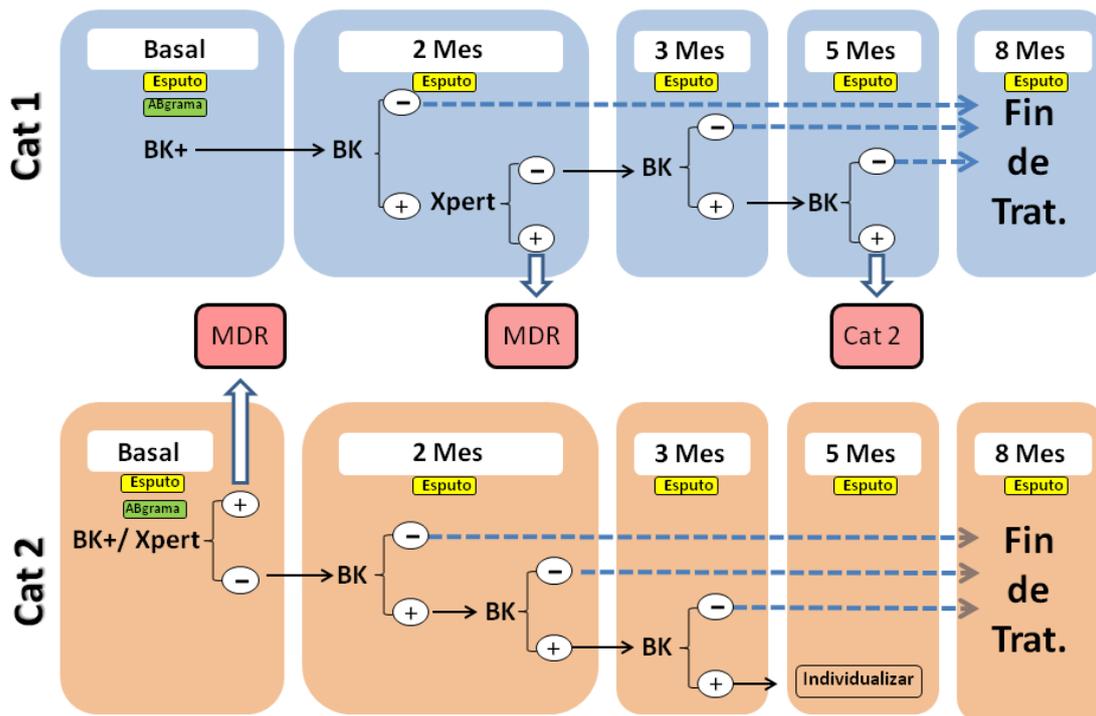
3.1 Ámbito y diseño del estudio

La República de Angola se encuentra entre los 30 países del mundo con mayor incidencia de TB y TB-MDR en su población.²³ Sin embargo, en ausencia de una encuesta nacional o sistema de vigilancia de la resistencia a fármacos, se desconoce la prevalencia de resistencia a fármacos antituberculosos.²³ Los objetivos de los estudios aquí expuestos eran establecer la proporción de aislados resistentes a fármacos antituberculosos en pacientes con TBP, así como, describir parte de los mecanismos moleculares de resistencia de estos aislados.

Para ello se diseñó un estudio prospectivo observacional con intervención que se llevó a cabo en el Hospital angoleño *Nossa Senhora da Paz*, centro de referencia para el diagnóstico y tratamiento de la TB en la ciudad de Cubal, provincia de Benguela, Angola. En el que se incluyeron, entre abril de 2014 y julio de 2015, pacientes mayores de 16 años diagnosticados de TBP basándose en un examen de esputo con baciloscopia positiva. También se incluyeron pacientes adultos con infección por VIH que tenían un cuadro clínico compatible con TB independientemente del resultado del frotis de esputo. Tras la inclusión en el estudio se llevó a cabo una primera entrevista en la que se recogió información acerca de las características basales (edad, sexo, estado de infección por el VIH) y del tratamiento previo del paciente. Los pacientes se clasificaron como categoría 1, paciente con TB que nunca recibió tratamiento antituberculoso o que lo hizo por un periodo inferior a 30 días; o bien como categoría 2, pacientes con TB que han sido previamente tratados por TB, incluyéndose en este grupo los pacientes con recaída, fracaso terapéutico o pérdida de seguimiento. Los pacientes previamente tratados (o categoría 2) presentan mayor riesgo de farmacoresistencia, por eso se sometieron a la prueba rápida de detección de resistencias Xpert MTB/RIF (Cepheid). También se sometieron a esta prueba todos los pacientes con infección por VIH con un cuadro clínico compatible con TB independientemente de la baciloscopia y el tratamiento previo del paciente.

Todos los pacientes diagnosticados de TB resistente a RIF (TB-RR) se trataron con fármacos de segunda línea (fase intensiva de ocho meses de duración con KAN, LFX, CS, ETO, PZA y EMB seguida de una fase de mantenimiento de doce meses con LFX, CS, ETO, PZA y EMB), siguiendo las recomendaciones de la OMS de esa época. El resto de los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados según las recomendaciones del Programa Nacional de Lucha Contra la TB (PNLCT). En los casos nuevos (o categoría 1) se utilizaba la pauta estándar 2EHRZ/4HR (fase intensiva de dos meses de duración con INH, RIF, PZA y EMB seguida de una fase de continuación de cuatro meses con INH y RIF) y en los casos previamente tratados (o categoría 2) la pauta estándar 2SHRZE/1HRZE/5HRE (fase intensiva de dos meses de duración con INH, RIF, PZA, EMB y STM seguida de una fase de continuación con INH, RIF, PZA y EMB durante el primer mes y posteriormente cinco meses con RIF, INH y EMB), ver figura 7.

Figura 7. Diagrama de árbol de decisión de pauta de tratamiento de los pacientes.



Abreviaciones: Cat1 = categoría 1, Cat2 = categoría 2, ABgrama = antibiograma, BK = baciloscopia, Xpert = Xpert MTB/RIF. **Definiciones:** Categoría 1: paciente con tuberculosis que nunca recibió tratamiento antituberculoso o que lo hizo por un periodo inferior a 30 días. Categoría 2: pacientes en recaída, fracaso o reaparecidos. Recaída: paciente que completó el tratamiento y considerado curado que vuelve a ser diagnosticado de tuberculosis. Fracaso de tratamiento: paciente con baciloscopia que persiste positiva al quinto mes de tratamiento. Reaparecido: paciente que reaparece con baciloscopia positiva después de haber abandonado el tratamiento durante un mínimo de 2 meses.

Para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento se obtuvieron muestras de esputo para baciloscopia en todas las visitas de seguimiento. La falta de conversión del frotis de esputo tras la fase intensiva de tratamiento (2 meses) puede estar relacionada con la presencia de aislados resistentes que no responden al tratamiento. Por esta razón, todos los pacientes que habían iniciado tratamiento sin un tamizado previo de la resistencia a RIF se sometieron a la prueba Xpert MTB/RIF (Cepheid), ver Figura 7. Rectificando la pauta de tratamiento de los pacientes diagnosticados de TB-RR.

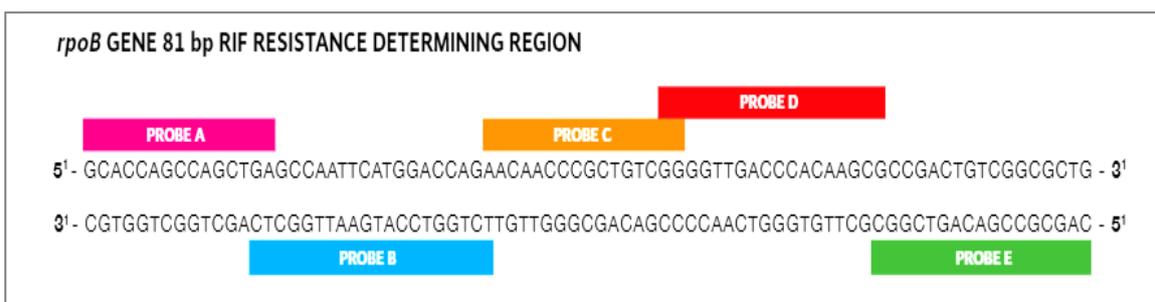
3.2 Diagnóstico microbiológico

3.2.1 Diagnóstico directo sobre muestra clínica

A todos los pacientes se les recogió una muestra de esputo para el diagnóstico de TB mediante pruebas de tinción de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), concretamente se empleó la tinción de Ziehl-Neelsen, que tiñe las micobacterias de rojo, en contraposición de las demás bacterias, que se tiñen de azul. Además, esta muestra también se empleó para la detección directa de TB y TB-RR mediante Xpert MTB/RIF (Cepheid) en los pacientes que habían recibido tratamiento con anterioridad y los pacientes con infección por VIH.

Para el diagnóstico de TB esta prueba incorpora cinco sondas de baliza molecular cada una ellas marcada con un fluorocromo distinto cubriendo totalmente la secuencia de bases entre los codones 432 y 458 del gen *rpoB* (o entre los codones 507 y 533 según numeración para EC), también conocida como región determinante de resistencia a RIF (RRDR, por sus siglas en inglés), véase figura 8.

Figura 8. RRDR, sobre se ella se representan en distintos colores las zonas donde hibridan las cinco sondas de la prueba Xpert MTB/RIF (Cepheid).



Cuando estas sondas se unen a la secuencia natural de bases de la región amplificada, el fluorocromo emite fluorescencia. Cualquier mutación en RRDR hará que la sonda correspondiente no se una y dejará de detectarse la fluorescencia correspondiente. El equipo identifica la muestra como positiva, es decir, presencia de MTBC cuando al menos dos de las cinco sondas son positivas con menos de 2 ciclos de diferencia, así como, resistencia a RIF si al menos una de las sondas no produce señal o si hay una diferencia de 3,5 ciclos o más entre la detección de la primera y la última sonda.

3.2.2 Cultivo, identificación y antibiograma

A todos los pacientes se les recogió una nueva muestra basal de esputo antes de iniciar tratamiento antibiótico. Estas muestras se enviaron a la Unidad de Micobacterias del Hospital Universitario Vall d'Hebron para realizar cultivo y antibiograma. Una vez completados estos estudios los aislados se conservaron en medios criogénicos para posteriores estudios de caracterización genética.

Todas las muestras se sometieron a un proceso de digestión y descontaminación química mediante el uso de N-acetil-L-cisteína e hidróxido sódico al 2%, tras este proceso, se inocularon en un caldo Middlebrook 7H9 modificado utilizando los tubos BBL MGIT (7mL) del equipo BD BACTEC MGIT (Becton, Dickinson and Company) y se incubaron durante 42 días. Los cultivos positivos se sometieron a una tinción de Ziehl-Neelsen para confirmar que el crecimiento observado eran micobacterias y detectar posibles contaminaciones. Para incrementar la capacidad de detección todos los cultivos contaminados se sometieron a un segundo proceso de descontaminación química mediante el uso de laurilsulfato sódico al 3% y NaOH al 1% y, tras este proceso, se sembraron en medio de Löwenstein-Jensen y se incubaron durante 3 meses.

Para identificar los aislados se utilizaron pruebas moleculares. Si se sospechaba la presencia de micobacterias no tuberculosas (NTM) los cultivos se sometían a la prueba de identificación molecular GenoType CM (Hain Lifescience) y en aquellos casos en los que no se llegaba a identificar la especie, el estudio se ampliaba con la prueba de identificación molecular GenoType AS (Hain Lifescience). Por el contrario, si se

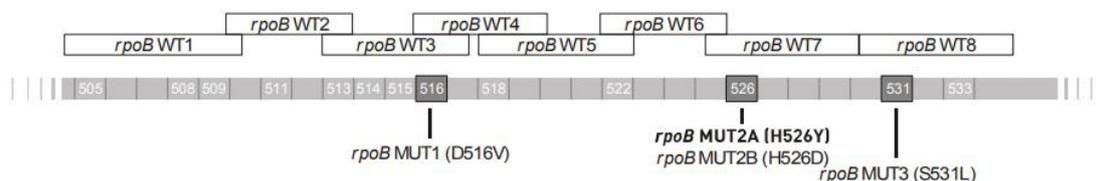
primera línea; *polirresistencia*, resistencia a más de un antituberculoso de primera línea distinto de la NH y la RIF; *multirresistencia*, resistencia a al menos la INH y la RIF; *ultrarresistencia*, resistencia a cualquier FQ y al menos a uno de los tres antituberculosos inyectables de segunda línea (esta última se definió siguiendo las recomendaciones de la OMS del año 2006).

3.2.3 Caracterización molecular de la resistencia

Todos los aislados se sometieron a un cribado de mutaciones de resistencia a RIF e INH mediante la prueba GenoType MTBDR*plus* VER2.0 (Hain Lifescience) (Figura 9).

Para la detección de resistencia a RIF esta prueba incorpora ocho sondas de tipo salvaje que cubren totalmente la secuencia de bases entre los codones 428 y 458 del gen *rpoB* (o entre los codones 505 y 533 según numeración para EC), también conocida como RRDR. Cuando todas las sondas de tipo salvaje son positivas no se detectan mutaciones en las regiones examinadas. En caso de mutación el amplicón afectado no podrá unirse a la correspondiente sonda de tipo salvaje. Por lo tanto, la ausencia de señal en al menos una de las sondas de tipo salvaje indica resistencia, ver tabla 1. Esta prueba también incorpora cuatro sondas de mutación para la detección de las mutaciones asociadas a resistencia a RIF más comunes: D441V, H451Y, H451D y S456L (o D516V, H526Y, H526D y S531L según numeración para EC) (Figura 10).

Figura 10. Región determinante de resistencia a rifampicina. Bandas de tipo salvaje y de mutación incluidas en la prueba GenoType MTBDR*plus* VER2.0 (Hain Lifescience).



Abreviaciones: WT = bandas *wild type* o salvaje, MUT = bandas de mutación.

Tabla 1. Bandas de tipo salvaje y bandas de mutación incluidas en la prueba de detección molecular GenoType MTBDRplus VER2.0 (Hain Lifescience).

a) **Mutaciones en *rpoB*** + – marcador de resistencia a rifampicina.

Ausencia banda WT	Codón analizado	Presencia banda de mutación	Mutación
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		E510H L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<u><i>rpoB</i> MUT1</u>	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<u><i>rpoB</i> MUT2A</u> <u><i>rpoB</i> MUT2B</u>	H526Y H526D H526R H526P* H526Q H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<u><i>rpoB</i> MUT3</u>	S531L S531Q* S531W L533P

b) **Mutaciones en *katG*** – marcador de alto nivel de resistencia a isoniacida.

Ausencia banda WT	Codón analizado	Presencia banda de mutación	Mutación
<i>katG</i> WT1	315	<u><i>katG</i> MUT1</u> <u><i>katG</i> MUT2</u>	S315T1 S315T2

c) **Mutaciones en *inhA*** – marcador de bajo nivel de resistencia a isoniacida.

Ausencia banda WT	Posición de bases analizadas	Presencia banda de mutación	Mutación
<i>inhA</i> WT1	-15 -16	<u><i>inhA</i> MUT1</u> <u><i>inhA</i> MUT2</u>	C-15T A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<u><i>inhA</i> MUT3A</u> <u><i>inhA</i> MUT3B</u>	T-8C T-8A

Abreviaciones: WT = bandas *wild type* o salvaje, MUT = bandas de mutación.

(+) anotación de mutaciones según numeración para *Escherichia coli*.

(*) mutaciones que sólo se han detectado *in silico*, puede que no se detecten *in vitro*.

Para la detección de resistencia a INH esta prueba incorpora una sonda de tipo salvaje que cubre el codón 315 del gen *katG*, así como, dos sondas de mutación que detectan las dos variantes de la mutación asociada a resistencia más común (S315T), la primera sonda de mutación está diseñada para detectar el cambio nucleotídico AGC a ACC (S315T1) y la segunda sonda de mutación está diseñada para detectar el cambio nucleotídico AGC a ACA (S315T2). Además, incorpora dos sondas de tipo salvaje para la región promotora del gen *inhA* (nucleótidos -8, -15 y -16), así como, cuatro sondas de mutación para las mutaciones asociadas a resistencias más comunes: C15T, A16G, T8C y T8A. (Tabla 1)

3.2.4 Caracterización de la resistencia a rifampicina

Los aislados genotípicamente resistentes a RIF por ausencia de hibridación de sondas de tipo salvaje, así como, los aislados discrepantes genotipo/fenotipo se recuperaron para su caracterización. Para ello se realizó un cultivo secundario o subcultivo de estos aislados en caldo Middlebrook 7H9 y se incubaron entre 7 y 28 días hasta observar crecimiento bacteriano. Este subcultivo se empleó para determinar el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a RIF, así como, para realizar una extracción de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) utilizando el método de extracción con solventes orgánicos cloroformo-alcohol isoamílico (el procedimiento se describe en la figura 11). Esta extracción de ADN se empleó para la posterior secuenciación del gen *rpoB*.

Figura 11. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos con solvente orgánicos cloroformo-alcohol isoamílico.

Precalear un termo bloque a 80°C

1. Poner en un tubo cónico con tapón de rosca 1 ml de medio de cultivo crecido.
2. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender el sedimento en 450 µl de tampón Tris-EDTA.
5. Poner en el termo bloque durante 1 hora a 80°C.

Precalear un termo bloque a 37°C

6. Añadir 75 µl de lisozima y mezclar con vórtex suave.
7. Poner en el termo bloque durante 1-12 horas a 37°C.

Precalear un termo bloque a 65°C

8. Precalear a 65°C la proteinasa K y el CTAB/NaCl.
9. Preparar una mezcla con 70 µl/muestra de SDS + 5 µl/muestra de proteinasa K.
10. Añadir 75 µl de SDS/proteinasa K y mezclar con vórtex suave.
11. Poner en el termo bloque durante 10 minutos a 65°C.
12. Añadir 100 µl de NaCl 5M y mezclar por inversión.
13. Añadir 100 µl de CTAB precalentado y mezclar por inversión.
14. Poner en el termo bloque durante 10 minutos a 65°C.

Encender crio centrífuga a -4°C

15. Añadir 750 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24;1) (-20°C) y mezclar por inversión.
16. Centrifugar a 12.000 rpm a 4°C durante 5 minutos.
17. Recuperar la fase acuosa y pasarla a un tubo limpio.
18. Añadir 450 µl de isopropanol (-20°C) y mezclar por inversión.
19. Centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
20. Eliminar el sobrenadante.
21. Añadir 450 µl de isopropanol (-20°C).
22. Poner en el congelador durante 1 hora a -20°C.
23. Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos.
24. Eliminar el sobrenadante. Dejar aproximadamente 20 µl de sedimento.
25. Añadir 1.000 µl de etanol al 70% (-20°C) y mezclar por inversión.
26. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos
27. Eliminar el sobrenadante

Precalear un termo bloque a 42°C

28. Poner en el termo bloque durante 10 minutos a 42°C.
29. Añadir 200 µl de agua.
30. Poner en el termo bloque durante 12 horas a 42°C.

Guardar el ADN a 4°C.

3.2.4.1 Caracterización molecular por secuenciación del gen *rpoB*

Para la amplificación del gen *rpoB* se diseñaron dos juegos de cebadores que cubren totalmente la región comprendida entre el codón 135 y el codón 610 de este gen. Esta amplificación se llevó a cabo en el equipo GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) empleando el kit GoTaq G2 Green Master Mix (Promega) con 5 µl de ADN en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación, así como, los cebadores empleados se indican en la tabla 2. Tras esta reacción el material amplificado se purificó enzimáticamente con Exo-SAP-IT (Affymetrix) y se secuenció mediante el sistema ABI Prism (Applied Biosystems) de terminadores fluorescentes BigDye y el instrumento de electroforesis multicapilar ABI Prism 3130XL usando los mismos cebadores empleados en la PCR de amplificación. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se ensamblaron y editaron utilizando el programa *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) usando como referencia la secuencia nucleotídica de MTB H37Rv (GenBank: AL123456).

Tabla 2. Cebadores y protocolos de amplificación y secuenciación del gen *rpoB*.

Gen	Cebadores	Condiciones PCR	Position (aa)
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -1F: CAACAACAACACCGGTGAGA	94°C x 5'	135-382
	<i>rpoB</i> -1R: CTGGTTTTGGATCAGCTCGC	45c: (94°C x 45" - 66°C c 1' - 72°C x 45") 72°C x 10'	
	<i>rpoB</i> -2F: GTACGGTCGGCGAGCTGA	94°C x 5'	376-610
	<i>rpoB</i> -2R: CCTGGCGCTGCATGTTTG	45c: (94°C x 45" - 66°C c 1' - 72°C x 45") 72°C x 10'	

Abreviaciones: PCR = *polymerase chain reaction*, aa = aminoácido.

Los casos se clasificaron en categorías en función de la caracterización genética: *mutación silente*, mutación que provoca un cambio en una de las bases del ADN de forma que el triplete de nucleótidos se modifica, pero sigue codificando para el mismo aminoácido; *mutación con cambio de sentido*, se produce cuando el cambio de un solo par de bases da lugar a la sustitución de un aminoácido en la proteína resultante; *mutación sin sentido*, es la sustitución de un solo par de bases que da lugar a la aparición de un codón de terminación prematuro donde previamente había un codón que codificaba para un aminoácido. La presencia de este codón de terminación prematuro genera una proteína más corta y probablemente no funcional; *mutación con cambio del marco de lectura*, mutación que consiste en la inserción o delección de un

número de bases, que no es múltiplo de tres, con lo que se cambia el marco de la lectura original y la secuencia de los aminoácidos. Si la inserción o delección de un número de bases, es múltiplo de tres, esto introducirá o eliminará uno o más aminoácidos de la secuencia peptídica pero no cambiará la fase de lectura.

3.2.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden no tener ningún efecto o pueden dar lugar a una proteína no funcional. Para medir el efecto de estos cambios en la afinidad de la RIF por la ácido ribonucleico (ARN) polimerasa se determinó el valor de la CMI. Para determinar este parámetro se enfrentó un inculo bacteriano ajustado con el estándar 0,5 de McFarland a diluciones seriadas en base 2 del antimicrobiano (a saber, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 µg/ml) y tras 7-28 días de incubación se observó cuál era la dilución más baja que no presentaba crecimiento bacteriano. En concreto, en nuestro estudio el valor de la CMI a RIF se estableció por macrodilución empleando el sistema analítico BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company) a partir de droga potenciada valorada. Para ello se cogieron 6 tubos BBL MGIT (7mL) del equipo BD BACTEC MGIT (Becton, Dickinson and Company), y se suplementaron con 0,8 mL de preparado OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa). El primer tubo se empleó como control sin antimicrobiano, en los 5 tubos restantes se añadieron concentraciones decrecientes de RIF, véase tabla 3. Estos tubos se inocularon e incubaron hasta que el control sin antimicrobiano alcanzó el umbral de crecimiento.

Tabla 3. Preparación de la batería de tubos *mycobacteria growth indicator tube* (MGIT) para la determinación de la concentración mínima inhibitoria a rifampicina empleando el sistema BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company).

Antibiótico	Concentración del antibiótico de partida	Volumen añadido a los tubos MGIT	Concentración final en los tubos MGIT
RIF 4,0	332 µg/ml	100 µl	4 µg/ml
RIF 2,0	166 µg/ml	100 µl	2 µg/ml
RIF 1,0	83 µg/ml	100 µl	1 µg/ml
RIF 0,5	41,5 µg/ml	100 µl	0,5 µg/ml
RIF 0,25	20,75 µg/ml	100 µl	0,25 µg/ml

Abreviaciones: RIF = rifampicina; MGIT = *mycobacteria growth indicator tube*.

Los casos se clasificaron en categorías en función del valor de la CMI a RIF: *aislados resistentes*, valor de la CMI por encima del punto de corte clínico de 1 µg/ml, dentro de este grupo definimos un subgrupo de aislados con bajo nivel de resistencia valor de CMI de 1 a 2,0 µg/ml; *aislados con CMI aumentada*, valor de CMI aumentada por encima del punto de corte epidemiológico (ECOFF, por sus siglas en ingles) de entre 0,25 a 0,5 µg/ml, pero por debajo de la concentración crítica de 1 µg/ml; *aislados sensibles*, valor de CMI por debajo del punto crítico de sensibilidad de 1 µg/ml y por debajo del punto de ECOFF de 0,5 µg/ml. Esta terminología esta poco extendida en el ámbito de la micobacteriología siendo mucho más frecuente el empleo de los términos de mutación cuestionada y mutación no cuestionada. Entendiéndose como *mutaciones no cuestionadas* todas aquellas mutaciones asociadas a altos niveles de resistencia cuya detección no supone ninguna dificultad para ninguna de las pruebas de sensibilidad a fármacos disponibles (CMI > 2 µg/ml). Por el contrario, entendemos como *mutaciones cuestionadas* todas aquellas mutaciones asociadas a bajos niveles de resistencia o con valores de CMI por debajo del punto de corte clínico cuya detección supone un reto para las pruebas de sensibilidad a fármacos disponibles lo que conduce a que en ocasiones se detecten como aislados sensibles y en otras ocasiones como aislados resistentes (CMI < 2 µg/ml).

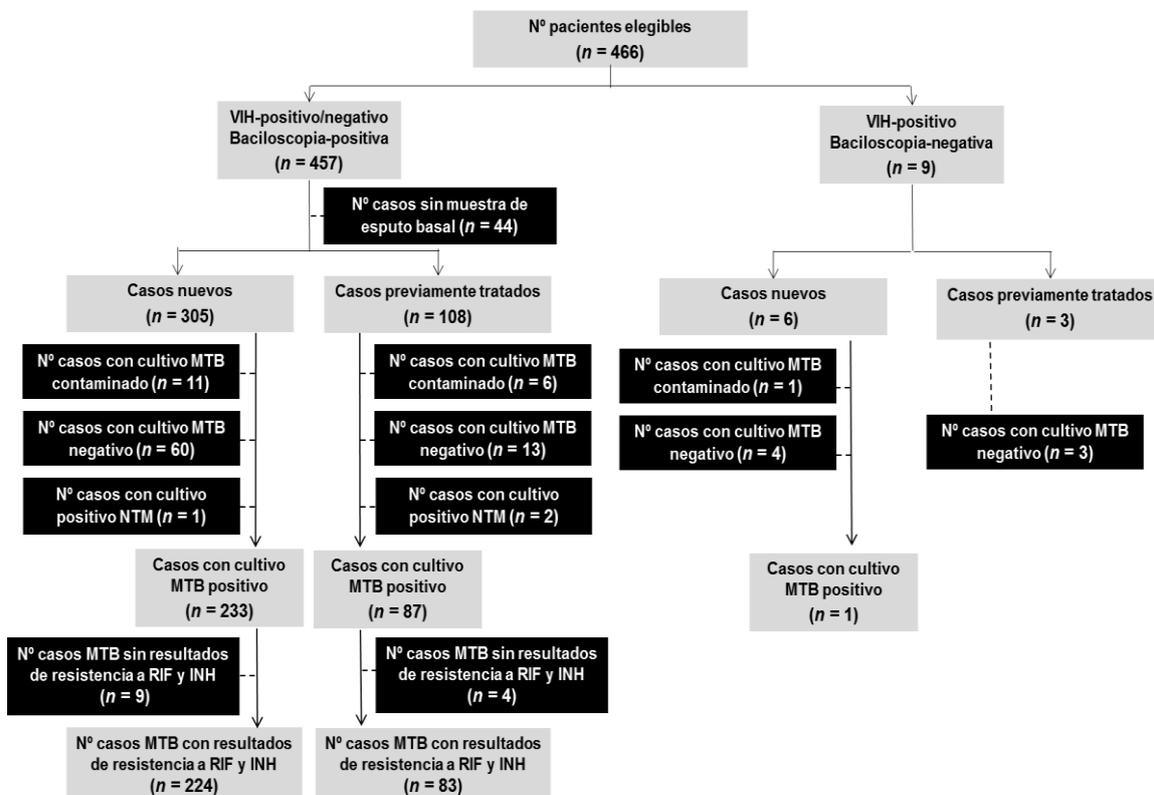
RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Descripción de la población de estudio

Durante el periodo de estudio un total de 466 casos cumplieron los criterios de elegibilidad. De los cuales, 44 se excluyeron por no disponer de muestra de esputo basal. Por lo tanto, finalmente en el estudio se incluyeron un total de 422 casos de TBP, 311 casos en pacientes nuevos y 111 casos en pacientes previamente tratados. En 321 (76,1%) se obtuvo confirmación bacteriológica de TB. No obstante, solo se pudieron realizar pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos por cultivo en medio líquido MGIT a 308 de los 321 aislados. De estos 308 casos, 225 (73,1%) correspondían a casos de TB en pacientes nuevos y 83 (26,9%) correspondían a casos de TB en pacientes previamente tratados. No observándose diferencias en el porcentaje de cultivos positivos entre casos nuevos (72,3%) y casos previamente tratados (74,8%), véase figura 12.

Figura 12. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos.



Abreviaciones: N.º = número, VIH = Virus de la inmunodeficiencia humana, MTB = *Mycobacterium tuberculosis*, NTM = micobacterias no tuberculosas.

RESULTADOS

Hubo 101 casos de TBP sin confirmar, 77 casos de TBP en pacientes nuevos y 24 casos de TBP en pacientes previamente tratados. En 74 (17,5%) se demostró la presencia de MTBC por pruebas de diagnóstico molecular. De estos, 54 correspondían a casos de TB en pacientes nuevos y 20 correspondían a casos de TB en pacientes previamente tratados. Además, en 2 pacientes con baciloscopia positiva y Xpert MTB/RIF negativo, un paciente nuevo y otro previamente tratado, se demostró la presencia de NTM (*M. smegmatis* y *M. intracellulare*, respectivamente).

No se observaron diferencias en cuanto a sexo, edad o porcentaje de pacientes con infección por VIH entre los casos confirmados de TB en pacientes nuevos y los previamente tratados. Tampoco se observaron diferencias entre los nuevos casos de TB en pacientes confirmados y los diagnosticados clínicamente. Sin embargo, entre los casos de TB en pacientes previamente tratados sí que se observó una tendencia a encontrar un mayor porcentaje de pacientes con infección por VIH entre los pacientes diagnosticados clínicamente (14,3% versus 4,8%; $p = 0,09$). Esto podría explicarse por la naturaleza paucibacilar de la TB en el enfermo de SIDA. También, como era de esperar, existe un mayor porcentaje de pacientes con baciloscopia negativa o con carga bacilar baja entre los pacientes sin confirmación bacteriológica (62,3% versus 14,0%; $p < 0,05$). Esto se debe a que, como cualquier otra prueba de detección, la sensibilidad del cultivo está relacionada con la carga bacteriana, véase tabla 4.

Tabla 4. Características socio demográficas de los pacientes incluidos.

		Casos nuevos (n = 311)		Casos previamente tratados (n = 111)	
		TB confirmada (n = 225)	TB clínica (n = 86)	TB confirmada (n = 83)	TB clínica (n = 28)
Edad	Mediana	28,5	32,5	30,5	29,5
	(RIC)	(23,5-38,5)	(23,5-43,3)	(25,0-35,5)	(24,8-42,0)
Sexo	Masculino	145 (64,4%)	53 (61,6%)	47 (56,6%)	16 (57,1%)
	Femenino	80 (35,6%)	33 (38,4%)	36 (43,4%)	12 (42,9%)
VIH	Positivo	12 (5,3%)	8 (9,3%)	4 (4,8%)	4 (14,3%)
	Negativo	210 (93,3%)	77 (89,5%)	79 (95,2%)	24 (85,7%)
Baciloscopia*	Negativa	6 (2,7%)	27 (31,4%)	5 (6,0%)	8 (28,6%)
	Carga bacilar baja	25 (11,1%)	28 (32,6%)	7 (8,4%)	8 (28,6%)
	Carga bacilar alta	194 (86,2%)	31 (36,0%)	71 (85,5%)	12 (42,9%)

Abreviaciones: BAAR=bacterias ácido-alcohol resistentes. (*) Baciloscopia realizada sobre la muestra de esputo basal enviada para estudio de resistencias. **Definiciones:** “Carga bacilar baja” pacientes con baciloscopia de 1-9 BAAR/100 campos o 10-99 BAAR/100 campos. “Carga bacilar alta” pacientes con baciloscopia de 1-10 BAAR/campo o > 10 BAAR/campo.

4.2 Patrones de resistencia a fármacos antituberculosos

Entre los pacientes que no habían recibido tratamiento con anterioridad el porcentaje de TB-DR y TB-MDR fue del 25,8% y del 8,0%, respectivamente. La incidencia de resistencia primaria a fármacos de primera línea fue la siguiente: INH, 47 casos (20,9%); STM, 25 casos (11,1%); RIF, 20 casos (8,9%); PZA, 13 casos (5,8%); y EMB, 10 casos (4,4%), ver tabla 5. No detectándose ningún caso de TB-XDR, ver tabla 6.

De los 47 aislados INH resistentes, 26 (55,3%) eran portadores de mutaciones en *katG* y 2 (4,3%) eran portadores de mutaciones en la región promotora de *inhA*. Los mecanismos moleculares de resistencia de los 19 (40,4%) aislados restantes se desconocen por no presentar ninguna de las mutaciones detectables por la prueba MTBDR*plus* VER2.0. De los 20 aislados RIF resistentes, 19 (95,0%) eran portadores de mutaciones en *rpoB*. Y desconocemos el mecanismo de resistencia del aislado restante por no presentar ninguna de las mutaciones detectables por la prueba MTBDR*plus* VER2.0, ver tabla 7. La caracterización por secuenciación de dicho aislado tampoco demostró la presencia de ninguna mutación conocida en *rpoB*.

Entre los pacientes que habían recibido tratamiento con anterioridad el porcentaje de TB-DR y TB-MDR fue del 83,1% y del 71,1%, respectivamente. La incidencia de resistencia adquirida a fármacos de primera línea fue: INH, 66 casos (79,5%); RIF, 61 casos (73,5%); STM, 42 casos (50,6%); PZA, 32 casos (38,6%); y EMB, 37 casos (38,6%). Siendo el 33,9% de los aislados resistentes a todos los fármacos de primera línea, ver tabla 5. No obstante, no se detectó ningún caso de TB-XDR, ver tabla 6.

De los 66 aislados INH resistentes, 47 (71,2%) eran portadores de mutaciones en *katG* y 4 (6,1%) eran portadores de mutaciones en la región promotora de *inhA*. Los mecanismos moleculares de resistencia de los 15 (22,7%) aislados restantes se desconocen por no presentar ninguna de las mutaciones detectables por MTBDR*plus* VER2.0. De los 61 aislados RIF resistentes, 58 (95,1%) eran portadores de mutaciones en *rpoB* y desconocíamos el mecanismo de resistencia de los tres aislados restantes, ver tabla 7. La posterior caracterización por secuenciación demostró en uno de ellos

RESULTADOS

ausencia de mutaciones en *rpoB*, y en los dos casos restantes presencia de aislados heteroresistentes.

Tabla 5. Resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea entre los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Patrón de resistencia fenotípica	Casos de TB nuevos (n = 225)		Casos de TB previamente tratados (n = 83)	
	No.	% (95IC)	No.	% (95IC)
TB Sensible	167	74,2 (68,1 - 79,5)	14	16,9 (10,3 - 26,3)
TB Drogoresistente	58	25,8 (20,5 - 31,9)	69	83,1 (73,7 - 89,7)
TB Resistente a				
INH	47	20,9 (16,1 - 26,7)	66	79,5 (69,6 - 86,8)
RIF	20	8,9 (5,8 - 13,3)	61	73,5 (63,1 - 81,8)
STM	25	11,1 (7,6 - 15,9)	42	50,6 (40,1 - 61,1)
EMB	10	4,4 (2,4 - 8,0)	32	38,6 (28,8 - 49,3)
PZA	13	5,8 (3,4 - 9,6)	37	44,6 (34,4 - 55,3)
TB Mono-resistente	31	13,8 (9,9 - 18,9)	7	8,4 (4,1 - 16,4)
INH	21	9,3 (6,2 - 13,8)	4	4,8 (1,9 - 11,7)
RIF	1	0,4 (0,1 - 2,5)	2	2,4 (0,7 - 8,4)
STM	8	3,6 (1,8 - 6,9)	1	1,2 (0,2 - 6,5)
PZA	1	0,4 (0,1 - 2,5)	0	0,0 (0,0 - 4,4) *
TB Multiresistente	18	8,0 (5,1 - 12,3)	59	71,1 (60,6 - 79,7)
INH + RIF	4	1,8 (0,7 - 4,5)	12	14,5 (8,5 - 23,6)
INH + RIF + STM	2	0,9 (0,2 - 3,2)	5	6,0 (2,6 - 13,3)
INH + RIF + EMB	0	0,0 (0,0 - 1,7) *	3	3,6 (1,2 - 10,1)
INH + RIF + PZA	2	0,9 (0,2 - 3,2)	2	2,4 (0,7 - 8,4)
INH + RIF + STM + EMB	3	1,3 (0,5 - 3,8)	4	4,8 (1,9 - 11,7)
INH + RIF + STM + PZA	1	0,4 (0,1 - 2,5)	9	10,8 (5,8 - 19,3)
INH + RIF + EMB + PZA	1	0,4 (0,1 - 2,5)	4	4,8 (1,9 - 11,7)
INH + RIF + STM + EMB + PZA	5	2,2 (1,0 - 5,1)	20	24,1 (16,2 - 34,3)
TB Poliresistente	9	4,0 (2,1 - 7,4)	3	3,6 (1,2 - 10,1)
INH + STM	5	2,2 (1,0 - 5,1)	0	0,0 (0,0 - 4,4) *
INH + EMB	1	0,4 (0,1 - 2,5)	0	0,0 (0,0 - 4,4) *
INH + PZA	2	0,9 (0,2 - 3,2)	0	0,0 (0,0 - 4,4) *
INH + STM + EMB	0	0,0 (0,0 - 1,7) *	1	1,2 (0,2 - 6,5)
INH + STM + PZA	0	0,0 (0,0 - 1,7) *	2	2,4 (0,7 - 8,4)
RIF + STM + PZA	1	0,4 (0,1 - 2,5)	0	0,0 (0,0 - 4,4) *

Abreviaciones: TB = tuberculosis; No. = recuento; 95CI = intervalo de confianza del 95%; INH = isoniacida; RIF = rifampicina; STM = estreptomycin; EMB = etambutol; PZA = pirazinamida.

(*) contraste unilateral, intervalo de confianza del 97.5%

RESULTADOS

Tabla 6. Resistencia a fármacos antituberculosos de segunda línea entre los aislados multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Patrón de resistencia fenotípica	Casos de TB nuevos (n = 18)		Casos de TB previamente tratados (n = 59)	
	No.	% (95CI)	No.	% (95CI)
TB Sensible	16	83,3 (60,8 – 94,2)	50	84,7 (73,5 – 91,8)
TB Resistente a FQ	0	0,0 (0,0 – 17,6) *	0	0,0 (0,0 – 6,1) *
TB Resistente a 2LI	2	16,7 (5,8 – 39,2)	9	15,3 (8,2 – 26,5)
TB Extremadamente Resistente	0	0,0 (0,0 – 17,6) *	0	0,0 (0,0 – 6,1) *

Abreviaciones: TB = tuberculosis; No. = recuento; 95CI = intervalo de confianza del 95%; FQ = fluoroquinolonas; 2LI = fármaco inyectable de segunda línea.

(*) contraste unilateral, intervalo de confianza del 97.5%

Tabla 7. Distribución de mutaciones asociadas a resistencia a isoniacida y rifampicina entre los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Resistencia Fenotípica	GenoType MTBDRplus VER2.0			Casos de TB nuevos	Casos de TB previamente tratados
	<i>katG</i>	<i>InhA</i>	<i>rpoB</i> ⁺		
INH, n = 113				47	66
	Δwt, S315T1	-		23	42
	Δwt	-		3	5
	-	Δwt1, C15T		2	2
	-	Δwt1		0	1
	-	C15T		0	1
	-	-		19	15
RIF, n = 81				20	61
			-	1	3
			Δwt2	0	2
			Δwt2,3,4 D516V ⁺	1	8
			Δwt3,4, D516V ⁺	3	3
			Δwt4,5	0	1
			Δwt7	0	1
			Δwt7, H526Y ⁺	2	0
			Δwt7, H526D ⁺	0	2
			Δwt7,8, H526D ⁺	0	1
			Δwt8	1	3
			Δwt8, S531L ⁺	12	37

Abreviaciones: TB = tuberculosis; INH = isoniacida; RIF = rifampicina; - = ausencia de mutación, WT = bandas wild type o salvaje, MUT = bandas de mutación, rpoB-WT1 = codones 505-509, rpoB-WT2 = codones 510-513, rpoB-WT3 = codones 513-571, rpoB-WT4 = codones 516-519, rpoB-WT5 = codones 518-522, rpoB-WT6 = codones 522-525, rpoB-WT7 = codones 526-529, rpoB-WT8 = codones 530-533, katG-WT = codón 315, inhA-WT1 = posiciones -15 y -16, inhA-WT2 = posición -8.

(+) anotación de mutaciones según numeración para *Escherichia coli*

4.3 Caracterización de la resistencia a rifampicina

En total se identificaron 81 aislados resistentes a RIF por pruebas de sensibilidad antibiótica basadas en cultivo. No obstante, la prueba de detección genotípica de resistencias GenoType MTBDRplus VER2.0 solo identificó como resistentes 77 de estos aislados. Pudiendo identificar la mutación asociada a resistencia en 69 de los mismos, la distribución de las mutaciones asociadas a resistencias fue: S450L (S531L según numeración para EC), 49 casos; D435V (D516V según numeración para EC), 15 casos; H445D (H526D según numeración para EC), 3 casos; y H445Y (H526Y según numeración para EC), 2 casos. En los ocho aislados restantes la resistencia se infirió por la ausencia de señal en al menos una de las sondas de tipo salvaje. La caracterización por secuenciación del gen *rpoB* demostró en todos ellos la presencia de mutaciones con cambio de sentido o bien la inserción o delección de un triplete de bases. Las mutaciones que se detectaron fueron la doble mutación L430P y S493L (L511P+S574L según numeración para EC), la inserción Q432 (Q513ins según numeración para EC), la delección N437 (Del N518 según numeración para EC), la mutación H445L (H526L según numeración para EC), la doble mutación L449M y S450F (L530M+S531F según numeración para EC), la mutación S450F (S531F según numeración para EC), la mutación S450W (S531W según la numeración para EC), y la mutación S450Y (S531Y según numeración para EC). Para medir el efecto de estos cambios en la afinidad de la RIF por la ARN polimerasa se determinó el valor de la CMI a RIF, presentando todos ellos valores entre 1,0 a >4,0 µg/ml. El aislado portador de la mutación por inserción de un triplete de bases, así como, los aislados portadores de mutaciones en el codón 450 tendían a causar resistencia elevada (CMI ≥4,0 µg/ml), mientras que los aislados portadores de mutaciones por delección de un triplete de bases, los dobles mutantes o los aislados portadores de la mutación H445L tendían a causar bajos niveles de resistencia (CMI entre 1,0 y 2,0 µg/ml). Estos últimos suponen un reto diagnóstico puesto que una pequeña variación (±1 dilución) en el valor de la CMI, error aceptable para este tipo de técnicas, puede cambiar el resultado de sensibilidad antibiótica de sensible a resistente o al inverso, por este motivo se consideraron como aislados portadores de mutaciones cuestionadas. También hay

RESULTADOS

que destacar que hubo cuatro aislados resistentes por pruebas de sensibilidad antibiótica basadas en cultivo identificados como sensibles por la prueba GenoType MTBDRplus VER2.0. La caracterización por secuenciación demostró en dos de ellos ausencia de mutaciones en *rpoB*, y en los dos casos restantes demostró la presencia de aislados heterorresistentes portadores de la doble mutación L430P y S493L (L511P+S574L según numeración para EC) y la doble mutación D435Y y L452P (D516Y+L533P según numeración para EC), respectivamente, ver tabla 8.

Tabla 8. Caracterización de *rpoB* entre los aislados fenotípicamente resistentes a RIF.

Frec.		Resistencia fenotípica		CMI	GenoType MTBDRplus VER2.0			Secuenciación <i>rpoB</i> ⁺
		INH	RIF		RIF	<i>rpoB</i> ⁺	<i>katG</i>	
1	C1	R	R	-	Δwt2,3,4, D516V	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
2	C1	R	R	-	Δwt2,3,4, D516V	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
1	C1	R	R	-	Δwt2,3,4, D516V	-	-	No secuenciada
2	C1	S	R	-	Δwt7, H526Y-	-	-	No secuenciada
1	C1	R	R	> 4,0	Δwt8	-	-	L530M+S531F
8	C1	R	R	-	Δwt8, S531L	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
2	C1	R	R	-	Δwt8, S531L	Δwt	-	No secuenciada
2	C1	R	R	-	Δwt8, S531L	-	-	No secuenciada
1	C1	R	R	> 4,0	-	-	-	Sin mutación
1	C2	R	R	4,0	-	Δwt, S315T1	-	L511P+S574L*
1	C2	R	R	2,0	Δwt2	Δwt, S315T1	-	L511P+S574L
1	C2	R	R	0,5	-	Δwt, S315T1	-	D516Y+L533P*
1	C2	R	R	4,0	Δwt2	-	-	Q513ins
8	C2	R	R	-	Δwt2,3,4, D516V	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
2	C2	R	R	-	Δwt3,4, D516V	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
1	C2	R	R	-	Δwt3,4, D516V	-	-	No secuenciada
1	C2	R	R	1,0	Δwt4,5	-	-	N518del
1	C2	R	R	-	Δwt7, H526D	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
1	C2	R	R	-	Δwt7,8, H526D	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
1	C2	R	R	-	Δwt7, H526D	-	-	No secuenciada
1	C2	R	R	2,0	Δwt7	Δwt	-	H526L
1	C2	R	R	>4,0	Δwt8	Δwt, S315T1	-	S531Y
1	C2	R	R	>4,0	Δwt8	-	Δwt1, C15T	S531F
1	C2	R	R	>4,0	Δwt8	-	-	S531W
22	C2	R	R	-	Δwt8, S531L	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
2	C2	R	R	-	Δwt8, S531L	Δwt	-	No secuenciada
1	C2	R	R	-	Δwt8, S531L	-	Δwt1, C15T	No secuenciada
1	C2	R	R	-	Δwt8, S531L	-	Δwt1	No secuenciada
1	C2	R	R	-	Δwt8, S531L	-	C15T	No secuenciada
8	C2	R	R	-	Δwt8, S531L	-	-	No secuenciada
2	C2	S	R	-	Δwt8, S531L	-	-	No secuenciada
1	C2	R	R	<0,13	-	-	-	Sin mutación

Abreviaciones: Frec. = frecuencia, INH = isoniazida, RIF = rifampicina, CMI = concentración mínima inhibitoria, C1 = casos nuevos, C2 = casos previamente tratados, R = resistente, S = sensible, WT = bandas *wild type* o salvaje, MUT = bandas de mutación, *rpoB*-WT1 = codones 505-509, *rpoB*-WT2 = codones 510-513, *rpoB*-WT3 = codones 513-571, *rpoB*-WT4 = codones 516-519, *rpoB*-WT5 = codones 518-522, *rpoB*-WT6 = codones 522-525, *rpoB*-WT7 = codones 526-529, *rpoB*-WT8 = codones 530-533, *rpoB*-MUT1 = mutación D516V, *rpoB*-MUT2A = mutación H526Y, *rpoB*-MUT2B = mutación H526D, *rpoB*-MUT3 = mutación S531L, *katG*-WT = codón 315, *katG*-MUT1 = mutación S315T1, *katG*-MUT2 = mutación S315T2, *inhA*-WT1 = posiciones -15 y -16, *inhA*-WT2 = posición -8, *inhA*-MUT1 = cambio nucleotídico C-15T, *inhA*-MUT2 = cambio nucleotídico A-16G, *inhA*-MUT3A = cambio nucleotídico T-8C, *inhA*-MUT3B = cambio nucleotídico T-8A . (*) heteroresistencia, (+) anotación de mutaciones según numeración para *Escherichia coli*.

RESULTADOS

Por otro lado, entre los 227 aislados sensibles a RIF por pruebas de sensibilidad a fármacos basadas en cultivo se identificaron ocho aislados resistentes a RIF por la prueba de detección genotípica de resistencias GenoType MTBDRplus VER2.0. La caracterización por secuenciación del gen *rpoB* demostró en todos ellos la presencia de mutaciones con cambio de sentido. Las mutaciones que se detectaron fueron L430P (L511P según numeración para EC), D435Y (D516Y según numeración para EC), H445L (H526L según numeración para EC), H445N (H526N según numeración para EC) y L452P (L533P según numeración para EC). Para medir el efecto de estos cambios en la afinidad de la RIF por la ARN polimerasa se determinó el valor de la CMI a RIF, presentando todos ellos valores de CMI de 0,125 a 1,0 µg/ml, ver tabla 9. Los aislados portadores de las mutaciones H445L, D435Y y L452P presentaban valores de CMI aumentados de 0,5 a 1,0 µg/ml. En contraste, los aislados portadores de las mutaciones H445N y L430P presentaban valores de CMI de 0,125 µg/ml.

Tabla 9. Caracterización de *rpoB* entre los aislados fenotípicamente sensibles a RIF.

Frec.	Resistencia fenotípica (MGIT 960)			CMI (MGIT 960) RIF	GenoType MTBDRplus VER2.0			Secuenciación <i>rpoB</i> ⁺
	INH	RIF	RIF		<i>rpoB</i> ⁺	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	
176	C1	S	S	-	-	-	-	No secuenciada
10	C1	R	S	-	-	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
1	C1	R	S	-	-	Δwt	-	No secuenciada
2	C1	R	S	-	-	-	Δwt1, C15T	No secuenciada
13	C1	R	S	-	-	-	-	No secuenciada
1	C1	R	S	0,125	Δwt2	Δwt, S315T1	-	L511P (+)
1	C1	R	S	0,125	Δwt7	-	-	H526N (+)
1	C1	R	S	0,5	Δwt7	Δwt, S315T1	-	H526L (+++)
15	C2	S	S	-	-	-	-	No secuenciada
1	C2	R	S	-	-	Δwt, S315T1	-	No secuenciada
1	C2	R	S	-	-	-	-	No secuenciada
2	C2	R	S	0,5	Δwt3,4	Δwt, S315T1	-	D516Y (++)
1	C2	R	S	1,0	Δwt7	Δwt	-	H526L (+++)
1	C2	R	S	0,5	Δwt8	Δwt, S315T1	-	L533P (++)
1	C2	R	S	No viable	Δwt8	Δwt	-	L533P (++)

Abreviaciones: Frec. = frecuencia, INH = isoniazida, RIF = rifampicina, CMI = concentración mínima inhibitoria, C1 = casos nuevos, C2 = casos previamente tratados, R = resistente, S = sensible, WT = bandas *wild type* o salvaje, MUT = bandas de mutación, *rpoB*-WT1 = codones 505-509, *rpoB*-WT2 = codones 510-513, *rpoB*-WT3 = codones 513-571, *rpoB*-WT4 = codones 516-519, *rpoB*-WT5 = codones 518-522, *rpoB*-WT6 = codones 522-525, *rpoB*-WT7 = codones 526-529, *rpoB*-WT8 = codones 530-533, *rpoB*-MUT1 = mutación D516V, *rpoB*-MUT2A = mutación H526Y, *rpoB*-MUT2B = mutación H526D, *rpoB*-MUT3 = mutación S531L, *katG*-WT = codón 315, *katG*-MUT1 = mutación S315T1, *katG*-MUT2 = mutación S315T2, *inhA*-WT1 = posiciones -15 y -16, *inhA*-WT2 = posición -8, *inhA*-MUT1 = cambio nucleotídico C-15T, *inhA*-MUT2 = cambio nucleotídico A-16G, *inhA*-MUT3A = cambio nucleotídico T-8C, *inhA*-MUT3B = cambio nucleotídico T-8A, (+++) alta fuerza de asociación para predecir resistencia fenotípica, (++) moderada fuerza de asociación para predecir resistencia fenotípica, (+) baja fuerza de asociación para predecir resistencia fenotípica. (+) anotación de mutaciones según numeración para *Escherichia coli*.

Tal como mencionamos previamente, los aislados con mecanismos de resistencia de baja expresión, es decir, que presentan valores de CMI cercanos a los puntos de corte de sensibilidad antibiótica establecidos suponen un reto diagnóstico puesto que una pequeña variación (± 1 dilución) en el valor de la CMI, error aceptable para este tipo de técnicas, puede cambiar el resultado de sensibilidad antibiótica de sensible a resistente o al inverso, por este motivo se consideran como aislados portadores de mutaciones cuestionadas. En nuestro estudio, todos los aislados con mutaciones en *rpoB* y valores de CMI por debajo de 2,0 $\mu\text{g/ml}$ (punto corte clínico = 1,0 $\mu\text{g/ml}$) se consideraron aislados portadores de mutaciones cuestionadas independientemente del resultado de las pruebas de sensibilidad antibiótica basadas en cultivo. Identificándose un total de once aislados con estas características. Todos ellos presentaban resistencia a INH y la mayoría (8/11) procedían de pacientes previamente tratados que recibieron pautas de tratamiento con fármacos de segunda línea. Los tres casos restantes pertenecían a casos nuevos que recibieron la pauta estándar con 2EHZR/4HR (al tratarse de casos nuevos no se sometieron a un tamizaje de resistencia mediante Xpert MTB/RIF).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Prevalencia de tuberculosis drogorresistente

Hasta la elaboración del primero de los artículos incluidos en la presente tesis doctoral,²⁴ no existían en la República de Angola datos sobre la prevalencia de TB-MDR, por lo que nuestro estudio supuso la primera fuente de información sobre este problema en el país. Encontramos una alta prevalencia de TB-MDR entre los pacientes tratados previamente (71,1%) y los casos nuevos (8,0%). Siendo está muy superior (casi 4 veces mayor) a la esperada según las estimaciones de la OMS sobre la carga de TB-MDR en Angola, que era del 21% entre los pacientes tratados previamente y del 2,8% entre los pacientes nuevos.²⁵ Estos datos también distan mucho de los datos comunicados por países vecinos, con prevalencias de TB-MDR entre los pacientes tratados previamente del 4,6-15,0%, y del 2,0-6,6% entre los pacientes nuevos.^{26,27,28,29,30,31}

Estos datos revelan cifras de multirresistencia alarmantes, pero estos hallazgos han de interpretarse con precaución. El presente trabajo forma parte de un proyecto mucho más amplio y ambicioso cuyo objetivo era reforzar la capacidad diagnóstica del centro de TB del Hospital *Nossa Senhora da Paz* para la detección de TB y TB-MDR mediante la incorporación del sistema GeneXpert y la prueba Xpert® MTB/RIF.³² Convirtiéndose así en el primer centro de la República de Angola que incorporaba esta tecnología. Todo esto junto con el compromiso por parte del ministerio de salud de este país de garantizar a los pacientes diagnosticados de TB-MDR el acceso a fármacos de segunda línea pudo haber generado un efecto llamada de los casos más graves como, por ejemplo, pacientes con antecedentes de fracaso a múltiples esquemas terapéuticos o los que requerían acceso a fármacos de segunda línea no disponibles en otros centros, que suelen presentar mayor riesgo de farmacorresistencia. Con el fin de minimizar el sesgo de selección se estableció como criterio de inclusión del estudio que los pacientes elegibles fueran de la provincia de Benguela, permitiendo un máximo de 100 pacientes referidos. Todos los pacientes incluidos en el estudio eran de la provincia de Benguela, y la mayoría eran del

municipio de Cubal o de municipios cercanos (<50 km de la ciudad de Cubal). No obstante, un elevado porcentaje de los pacientes tratados previamente habían sido referidos desde localidades que se encuentran a más de 50 km de la ciudad de Cubal. Esto junto el elevado porcentaje (26,3%) de pacientes previamente tratados entre la población elegible nos hace sospechar que se pudo haber producido un sesgo de selección. Según los datos comunicados por el PNLCT tan sólo se esperaría un 10-15% de pacientes previamente tratados entre los pacientes potencialmente elegibles.²⁵ Todo ello podría explicar la extremadamente alta prevalencia de TB-MDR entre los pacientes previamente tratados (71,1%), siendo ésta especialmente alta cuando la comparamos con los pacientes que no habían recibido tratamiento con anterioridad (8,0%). Además, tras esta observación tampoco podemos descartar que se haya producido el mismo sesgo de selección entre los pacientes nuevos ya que aquellos enfermos de TB contactos de pacientes con diagnóstico de TB-MDR podrían haber ido preferentemente a este centro. Siendo necesaria la realización de una encuesta nacional de resistencia a fármacos antituberculosos para confirmar la prevalencia de TB-MDR en la República de Angola.

A pesar de estas limitaciones, que impiden que podamos realizar una estimación precisa de la carga de TB-MDR en la región, es evidente que la TB-MDR es un problema sanitario importante en esta región. La República de Angola consiguió su independencia de Portugal en 1975, después de una larga guerra. Sin embargo, una vez emancipado el nuevo país se vio inmerso en una intensa y duradera guerra civil que se prolongó de 1975 a 2002. La guerra impidió el desarrollo de programas de salud, produciéndose frecuentes faltas de abastecimiento de fármacos y movilizaciones de personas de un territorio a otro, lo que dificultó la adhesión al tratamiento y el correcto seguimiento de los pacientes, así como, la formación del personal sanitario.³³ Además, hasta hace unos años, no existían programas de TDO para el manejo de pacientes con TB,²¹ lo cual ha podido influir en la adherencia a los tratamientos farmacológicos y al posterior desarrollo de resistencia a fármacos. Durante los últimos años el PNLCT ha implementado programas de tratamiento acortado directamente acortado (TDO) para el manejo de pacientes con TB, lo que

con toda seguridad aumentará la adherencia al tratamiento y probablemente ayudará a disminuir el desarrollo de resistencias. Por el momento estos programas solo se están utilizando para el tratamiento de la TB sensible a fármacos, sin existir aún programas de TDO para el manejo de pacientes con TB-MDR. Por otro lado, las guías nacionales de la República de Angola para el tratamiento de la TB en casos que habían sido previamente tratados con fármacos antituberculosos se basaban en las recomendaciones de la OMS de 2010 en las que utilizaba la Categoría II, que añadía STR al esquema terapéutico de primera línea y lo alargaba hasta 8 meses.³³ Sin embargo, existen varios estudios que han observado que el uso de este esquema terapéutico en pacientes previamente tratados se asocia a altos porcentajes de fracasos y recaídas, y, además, promueve fenómenos de amplificación selectiva de poblaciones con mutaciones que confieren resistencia a los fármacos empleados, factor que ha podido condicionar también los altos porcentaje de TB-MDR encontrados en nuestro estudio.^{34,35,36} De hecho, la OMS no recomienda actualmente el uso de este esquema terapéutico. En su lugar recomienda la implementación de pruebas de sensibilidad a fármacos, haciendo especial hincapié en la introducción de pruebas rápidas para la detección de resistencia que permitan orientar la pauta de tratamiento a recomendar.³⁷ Sin embargo, hasta el año 2014, momento en el que se inició el proyecto en el cual se engloba la presente tesis doctoral, la confirmación del diagnóstico de la TB en la República de Angola se basaba única y exclusivamente en la microscopía del frotis de esputo.

5.2 Caracterización de los patrones moleculares de resistencia

Tal como hemos mencionado, la OMS recomienda la introducción en el algoritmo diagnóstico de pruebas moleculares rápidas para el diagnóstico de la TB. Estas pruebas pueden disminuir el retraso en el diagnóstico ya que algunas de ellas presentan mayor sensibilidad que la microscopía, considerada la técnica rápida de referencia para el diagnóstico de la TB, además, pueden detectar mutaciones asociadas a resistencia y orientar la pauta de tratamiento a recomendar.³⁷ Su breve tiempo de respuesta, en comparación con las pruebas clásicas basadas en cultivo, las

convierte en herramientas muy valiosas para la toma de decisiones clínicas. Además, son pruebas estandarizadas, de rendimiento potencialmente elevado, y que pueden llevarse a cabo en entornos con bajos requerimientos de bioseguridad.

De entre estas técnicas moleculares es necesario resaltar la prueba Xpert MTB/RIF, que permite la identificación de MTBC, así como, la detección de resistencia a RIF en un plazo de 2 horas, con una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98%. Además, es mucho más sensible que la baciloscopia (es positivo en el 68% de los casos con baciloscopia negativa y cultivo positivo), por lo que también supone un avance importante en la detección precoz, especialmente en pacientes con infección por VIH.^{37,38,39} No obstante, su principal ventaja se basa en que la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos está totalmente automatizada y tiene lugar en el interior de un cartucho de un solo uso. Con lo que se reduce al mínimo el riesgo de contaminación cruzada entre muestras, a la vez que permite la realización de pruebas de biología molecular en muchos entornos con bajos requerimientos de bioseguridad e infraestructura.

Hay que mencionar, también, la utilidad de otras pruebas moleculares como son las LIPA. Estas pruebas presentan una buena rentabilidad diagnóstica a partir de aislados de cultivos, y también han demostrado ser útiles en la detección directa sobre muestras respiratorias con baciloscopia positiva; sin embargo, no se recomienda su utilización si la baciloscopia es negativa.^{40,41} Existen varios ensayos comercializados que permiten la detección rápida (en menos de 48 horas) de resistencias a fármacos de primera (INNO-LiPA Rif.TB, GenoType MTBDR*plus*) y segunda línea (GenoType MTBDR*s*). La rentabilidad diagnóstica para la detección de resistencia a RIF es excelente (sensibilidad >96% y especificidad >97%).⁴⁰ Pero, para el resto de los fármacos, estas técnicas muestran una moderada sensibilidad (INH: sensibilidad 89%; FQ: sensibilidad 80%; inyectables de segunda línea: sensibilidad 64%).^{40,41} A pesar de ello, su valor predictivo positivo es alto al mostrar todas ellas alta especificidad (especificidad >96%).^{40,41} Por lo que se recomienda su uso como pruebas rápidas iniciales para la detección de casos de TB resistente a la INH, así como, para la detección de casos de TB-MDR resistente a FQ o inyectables de segunda

linea.^{40,41} Por otro lado, este tipo de pruebas también pueden emplearse para caracterizar los aislados circulantes, ya que incorporan sondas específicas contra las mutaciones asociadas a resistencia más frecuentes. La mayor dificultad para la implementación de estas técnicas es que su uso requiere de una extracción y una amplificación manual de ácidos nucleicos por lo que se requiere de laboratorios con cierto nivel de complejidad.

La introducción de este tipo de pruebas en el algoritmo diagnóstico de la TB es esencial para el correcto manejo de los pacientes con TB aportando estas innumerables ventajas.²¹ No obstante, presentan también algunos inconvenientes que hemos de tener en cuenta. El primero es consecuencia de que la resistencia a un fármaco esta mediada por la participación de una o más mutaciones en uno o varios genes, inclusive algunos de ellos aún no identificados. Esto hace que la especificidad de las técnicas para la búsqueda de una mutación determinada en un gen sea alta, pero la sensibilidad para la identificación fenotípica de resistencia puede ser baja. La proporción de aislados resistentes detectados dependerá de factores intrínsecos como el fármaco, sus mecanismos de adquisición de resistencias, dianas genéticas incluidas en la presentación de la prueba, así como, factores extrínsecos como el perfil de mutaciones de los aislados circulantes. Otra limitación es la escasa sensibilidad de estos ensayos para detectar poblaciones minoritarias resistentes (poblaciones heterorresistentes) que fuesen las causantes de la resistencia fenotípica. Por todo ello se recomienda caracterizar y monitorizar los aislados circulantes pues la frecuencia de las mutaciones específicas asociadas a resistencias puede variar entre regiones geográficas o a lo largo del tiempo afectando a la rentabilidad diagnóstica de las técnicas empleadas.

5.2.1 Patrones de resistencia genotípica a isoniazida

La resistencia a INH es debida a la participación de diferentes mecanismos de adquisición de resistencia, inclusive algunos de ellos aún no identificados. Pero los mecanismos de resistencia más relevantes son aquellos que involucran a los genes *katG* e *inhA*.⁴² El gen *katG* codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, responsable de

la transformación de la INH en su compuesto activo (radical o anión acil-isonicotínico).⁴³ Este radical producido tras la acción de la enzima KatG se une covalentemente al anillo de nicotinamida de una molécula de NAD(H) el producto de esta unión (acil-isonicotínico-NADH) se une de forma competitiva al sitio activo de la enzima InhA inhibiendo su función.^{44,45,46} Entre el 40 y el 95% de los aislados resistentes a INH son portadores de mutaciones en *katG*.^{47,48} La enzima resultante es incapaz de activar la INH generando una resistencia de alto nivel. Se han descrito numerosas mutaciones, pero las más frecuentes son aquellas que afectan el codón 315. Entre el 75 y el 90% de los aislados portadores de mutaciones en *katG* presentan mutaciones en esta posición.^{47,48} Por otro lado, el gen *inhA* codifica la enzima enoil-ACP-reductasa que participa en los procesos de síntesis de los ácidos micólicos de la pared bacteriana. Esta enzima es el blanco molecular del fármaco.^{44,45,46} Entre el 8 y el 43% de los aislados resistentes a INH son portadores de mutaciones en este gen.⁴⁸ La mayor parte de estas mutaciones se han descrito en la región reguladora y origina una sobreexpresión de la enzima que compensa la acción inhibitoria del fármaco. También se han descrito mutaciones que disminuyen la afinidad de la enzima InhA por la dupla acil-isonicotínico-NADH.^{44,46} Ambos tipos de mutación se asocian a un bajo nivel de resistencia. No obstante, han de existir otros mecanismos asociados a resistencia no descritos aun pues entre el 10 y el 25% de los aislados resistentes a INH no presentan mutaciones ni el gen *katG* ni en el gen *inhA*.⁴⁸⁻⁵⁰

El empleo de la prueba molecular GenoType MTBDRplus VER2.0 sobre los aislados clínicos de nuestra serie de pacientes reveló que el 64,6% (73/113) de los aislados resistentes a INH eran portadores de mutaciones en la posición 315 del gen *katG*, concretamente 65 eran portadores de la mutación de alto nivel S315T. Por otro lado, esta prueba también reveló que el 5,3% (6/113) de los aislados resistentes a INH eran portadores de mutaciones en la región promotora del gen *inhA*. Además, es importante resaltar que en el 30,1% de los aislados resistentes a INH no se detectó ninguna mutación asociada a resistencia a INH utilizando la prueba GenoType MTBDRplus VER2.0. Esto puede ser debido a que presenten otros mecanismos asociados a resistencia no descritos aún. O bien, que sean portadores de mutaciones

en regiones de *katG* e *inhA* no incluidas en la prueba diagnóstica. Como ya mencionamos esta prueba incorpora para la detección de resistencia de alto nivel una sonda de tipo salvaje que cubre el codón 315 del gen *katG*, así como, dos sondas de mutación que detectan las dos variantes de la mutación asociada a resistencia más común (S315T). Es decir, que tan solo analizamos una única posición de este gen. Por otro lado, para la detección de resistencia de bajo nivel esta prueba incorpora dos sondas de tipo salvaje para la región promotora del gen *inhA* (nucleótidos -8, -15 y -16), así como, cuatro sondas de mutación para las mutaciones asociadas a resistencias más comunes: C15T, A16G, T8C y T8A. De manera que con este panel de mutaciones el único mecanismo de resistencia que estamos evaluando es la sobreexpresión de la enzima para compensar la acción inhibidora del fármaco.

Es importante resaltar que tal y como pone de manifiesto el presente estudio el porcentaje de aislados portadores de mutaciones en los genes *katG* e *inhA* varía entre las diferentes regiones geográficas. Ello hace que la sensibilidad de las pruebas moleculares para la detección de resistencia a INH también varíe. Esto explica que la exactitud diagnóstica de estas pruebas, en particular la de GenoType MTBDR*plus*, sea variable y presente una sensibilidad muy heterogénea entre estudios, con sensibilidades que van desde el 57% hasta el 100% con una sensibilidad acumulada del 84,3%.⁴⁰ Sin embargo, la especificidad acumulada es alta y consistente entre estudios.⁴⁰ Todo ello hace que este tipo de pruebas presente un elevado valor predictivo positivo, es decir, un resultado positivo indica resistencia a INH con seguridad. Sin embargo, un resultado negativo requiere de la realización de otras técnicas confirmatorias antes de descartar la resistencia a INH, especialmente en países con alta prevalencia de TB farmacorresistente.

5.2.2 Patrones de resistencia genotípica a rifampicina

La RIF es un agente bactericida de amplio espectro que interfiere en la síntesis de ARN mensajero al unirse a la polimerasa de ARN dependiente de ADN procariota.^{51,52,53} Esta polimerasa es un oligómero compuesto por cuatro subunidades distintas: α , β , β' y σ codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*,

respectivamente. La RIF no impide la unión de la ARN polimerasa al promotor ni la formación del primer enlace fosfodiéster, pero impide la elongación posterior de la cadena. Esta inhibición la logra uniéndose a la subunidad β de la ARN polimerasa,^{54,55} concretamente, los modelos estructurales indican que el sitio de unión de la RIF está ubicado cerca del centro catalítico de la enzima y bloquea físicamente la elongación de la cadena.^{56,57} Las micobacterias, al igual que otros géneros bacterianos, adquieren resistencia a la RIF mediante mutaciones en una región bien definida de 81 pares de bases del gen *rpoB* conocida como RRDR. Más del 96% de las cepas resistentes a la RIF poseen mutaciones en esta región.^{58,59} Este hecho ha facilitado enormemente el desarrollo de pruebas moleculares rápidas para la detección de TB-RR, además, como la resistencia a RIF raramente se presenta sola pero frecuentemente viene asociada a resistencia a la INH, se puede considerar la resistencia a RIF como un marcador de TB-MDR.

El empleo de la prueba molecular GenoType MTBDR*plus* VER2.0 sobre los aislados clínicos de nuestra serie de pacientes reveló que el 95,1% (77/81) de los aislados resistentes a RIF eran portadores de mutaciones en RRDR. Pudiendo identificar la mutación asociada a resistencia en 69 de los mismos. En los ocho aislados restantes la resistencia se infirió por la ausencia de señal en al menos una de las sondas de tipo salvaje. Resaltar, también, que en el 4,9% (4/881) de los aislados resistentes a RIF no se detectó ninguna mutación asociada a resistencia a RIF utilizando la prueba GenoType MTBDR*plus* VER2.0. La posterior caracterización por secuenciación demostró en dos de ellos ausencia de mutaciones en *rpoB*, y en los dos casos restantes presencia de aislados heteroresistentes. También hay que resaltar la detección de ocho aislados portadores de mutaciones en RRDR identificados como aislados sensibles por pruebas de sensibilidad a fármacos basadas en cultivo. Para poder evaluar la rentabilidad diagnóstica de la prueba Xpert MTB/RIF se caracterizaron todos los aislados resistentes por ausencia de hibridación de sondas de tipo salvaje, así como todos los aislados discrepantes.

Tal como ya mencionemos anteriormente, las pruebas moleculares rápidas para la detección de TB-RR tienen una excelente exactitud diagnóstica para la detección de

resistencia a RIF.^{39,40} A pesar de ello, su introducción en el algoritmo diagnóstico de la TB conduce invariablemente a discrepancias, en ambos sentidos, entre los métodos fenotípicos y genotípicos de resistencias.^{60,61} Estas discrepancias pueden ser debidas a la presencia de aislados con mutaciones fuera de la región RRDR, a la presencia de aislados portadores de mutaciones silentes, a la presencia de aislados portadores de mutaciones cuestionadas o a la presencia de aislados heterorresistentes.⁶²

La primera situación que nos puede conducir a discordancias entre métodos está relacionada con el **mecanismo molecular de resistencia** ya que la resistencia a un fármaco está mediada por la participación de una o más mutaciones en uno o varios genes, inclusive algunos de ellos aún no identificados. Esto hace que la especificidad de las técnicas para la búsqueda de una mutación determinada en un gen sea alta, pero la sensibilidad para la identificación fenotípica de resistencia pueda ser baja. Es decir, el hecho de no encontrar ciertas mutaciones en uno o varios genes no necesariamente se traduce en un diagnóstico confiable de sensibilidad. La proporción de aislados resistentes no detectados dependerá del fármaco y de sus mecanismos de adquisición de resistencia. Tal como hemos mencionado antes la resistencia a la RIF se asocia principalmente a mutaciones en una pequeña región del gen *rpoB*. Más del 96% de las cepas resistentes a la RIF poseen mutaciones en esta región.^{58,59} Este hecho ha facilitado enormemente el desarrollo de pruebas moleculares rápidas para la detección de TB-RR. Sin embargo, en un porcentaje no despreciable (cerca de un 5%) la resistencia a RIF es debida a mutaciones fuera de RRDR. Existen varias publicaciones que describen mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a resistencia fuera de RRDR. En concreto refieren las mutaciones V176F e I491F (V146F e I572F según numeración para EC).^{63,64,65} No obstante, aún no conocemos todas las mutaciones asociadas a resistencia ni todos los mecanismos de resistencia implicados. Existe alguna publicación que sugiere una asociación entre la resistencia a RIF y la sobreexpresión de las bombas de eflujo Rv0194 y *mmpL5*.^{66,67} Pero se requieren estudios con un mayor tamaño muestral para evaluar esta asociación.

En nuestra serie de pacientes se detectaron dos casos de aislados resistentes a RIF no portadores de mutaciones en RRDR. La caracterización por secuenciación del

fragmento de ADN entre los codones 135 y 610 del gen *rpoB*, donde se encuentran todas las mutaciones asociadas a resistencia descritas, tampoco demostró ninguna mutación en *rpoB* fuera de RRDR. Por lo tanto, desconocemos el mecanismo de resistencia de estos dos aislados. Pero debido a su presencia dos casos de TB-MDR no pudieron ser detectados por pruebas moleculares de detección de resistencias, un caso entre los pacientes que no habían recibido tratamiento con anterioridad y otro caso entre los pacientes previamente tratados.

Otra situación que puede conducir a discordancias entre métodos está relacionada con la presencia de **mutaciones silentes**. Las técnicas moleculares de detección de resistencias detectan cambios en la secuencia nucleotídica, pero por la degeneración del código genético no todos los cambios se traducen en cambios en la estructura proteica. Por lo tanto, una proporción variable de cepas sensibles pueden ser detectadas erróneamente como aislados resistentes. Existen varias publicaciones que alertan de la presencia de aislados portadores de mutaciones silentes que potencialmente pueden ocasionar errores diagnósticos. Concretamente nos alertan sobre las mutaciones silentes Q510Q, F514F, y L533L (Q429Q, F433F, L452L, respectivamente, según numeración para EC).^{68,69,70} Pero apenas hay datos sobre la prevalencia de este tipo de aislados y los pocos datos que se disponen provienen de estudios llevados a cabo en países con baja incidencia de TB. Reportándose unas prevalencias de entre el 0,4 y el 1,3%.^{68,69,71,72}

La presencia de este tipo de aislados afecta más al rendimiento de las pruebas de detección genética de resistencias basadas en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR a tiempo real (p.ej. Xpert® MTB/RIF) que a las pruebas basadas en el principio de hibridación reversa (p.ej. GenoType MTBDR*plus* VER2.0). Esto se debe a que las primeras sólo incorporan para la detección de resistencia sondas de tipo salvaje y la resistencia se infiere por ausencia de señal en alguna de ellas. Sin embargo, las pruebas basadas en el principio de hibridación reversa incorporan para la detección de resistencia tanto sondas de tipo salvaje que cubren la secuencia de bases de la región de interés, así como, sondas de mutación específicas para la detección de las mutaciones asociadas a resistencia más comunes. De manera que en un porcentaje

elevado de casos conocemos la mutación asociada a resistencia implicada, en los casos restantes la resistencia se infiere por la ausencia de una de las sondas de tipo salvaje. Como estos resultados tienen implicaciones importantes para el tratamiento del paciente es importante confirmar e identificar la presencia de mutaciones en el gen *rpoB*. La Asociación de Laboratorios de Salud Pública de Estados Unidos (APHL, por sus siglas en inglés) recomienda confirmar la presencia de mutaciones en *rpoB* mediante secuenciación o a través de pruebas basadas en el principio de hibridación reversa (por su menor tiempo de respuesta) y tan sólo secuenciar *rpoB* en aquellos casos en que no se detecte ninguna de las mutaciones asociadas a resistencia incluidas en la prueba.⁷³ En el manual para la implementación de Xpert MTB/RIF en el algoritmo diagnóstico de la TB publicado por la OMS en 2013 se recomendaba confirmar la presencia de mutaciones en *rpoB* en entornos donde la prevalencia de resistencia a RIF fuera inferior al 15% a causa del bajo VPP de la prueba en áreas con baja incidencia de TB-MDR.³⁸ Esta recomendación se mantuvo en la siguiente actualización publicada en 2014, sin embargo, en esta se indicaba que gran parte de las discordancias detectadas podían estar relacionadas con la detección de cepas verdaderamente resistentes a RIF no detectadas por pruebas de sensibilidad antibiótica basadas en cultivo (estándar de referencia).³⁹

Estudios realizados en áreas con baja incidencia de TB describen porcentajes moderados/altos de aislados portadores de mutaciones silentes entre los aislados genotípicamente resistentes, reportándose prevalencias de entre el 4,3% y el 25% de los casos.^{69,71,72} En países con alta incidencia de TB la prevalencia de aislados portadores de mutaciones silentes entre los aislados genotípicamente resistente es menor aunque existen datos heterogéneos al respecto, reportándose prevalencias de entre el 1,3% y el 10,6% de los casos.^{74,75} Importante resaltar que en este último trabajo los autores resaltaban que tan elevado e inusual porcentaje de discrepancias en un área de alta incidencia de TB podía estar influenciado por la presencia de pacientes en clúster, infectados por una misma cepa, y que por tanto participan en una misma cadena de transmisión.⁷⁵ En nuestra serie, llevada a cabo en un área de alta carga de TB, no se detectó ningún aislado portador de mutaciones silentes.

Otra situación a tener en cuenta ante la presencia de discrepancias es la presencia de aislados portadores de **mutaciones cuestionadas**. La interpretación de los resultados de las pruebas de sensibilidad antibiótica consiste en la categorización clínica de los resultados, es decir, en la traducción por medio de los puntos de corte clínicos en las categorías clínica sensible, intermedio o resistente. Los puntos de corte, bien en valores de halos de inhibición o de CMI, se utilizan para separar estas categorías. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* establecen en los Estados Unidos y en Europa, respectivamente, estos puntos de corte. Este último grupo también ha establecido los denominados puntos ECOFF que separan las poblaciones que carecen o no expresan mecanismos de resistencia de aquellas que los presentan y expresan. Los puntos de corte que definen la categoría clínica sensible no necesariamente han de coincidir con los ECOFF. La utilización exclusiva de las categorías clínicas (sensible, intermedio o resistente) puede limitar la lectura interpretada del antibiograma, en particular si los puntos de corte clínicos no son adecuados o están alejados de los puntos de ECOFF. Esta circunstancia se agrava cuando se consideran mecanismos de resistencia de baja expresión que implican valores de CMI o halos de inhibición que apenas superan los puntos de corte de sensibilidad antibiótica establecidos.

En el caso de la RIF el nivel de resistencia dependerá de la mutación detectada.⁷⁶ La posición de la mutación y el cambio aminoacídico determinan el nivel de resistencia. Las mutaciones S450L, H445Y, H445D y D435V (S531L, H526Y, H526D, D516V, respectivamente, según la numeración para EC) están asociadas con un alto o moderado nivel de resistencia, mientras que las mutaciones L452P, H445N, H445L, D435Y y L430P (L533P, H526N, H526L, D516Y, L511P, respectivamente, según la numeración para EC) tienden a causar bajo nivel de resistencia.^{77,78} Los aislados con mecanismos de resistencia de baja expresión, es decir, que presentan valores de CMI cercanos a los puntos de corte de sensibilidad antibiótica establecidos suponen un reto diagnóstico para las pruebas de detección de resistencia basadas en cultivo.⁷⁹ Esto es debido principalmente a la reproducibilidad de sus resultados pues una pequeña variación (± 1 dilución) en el valor de la CMI, error aceptable para este tipo

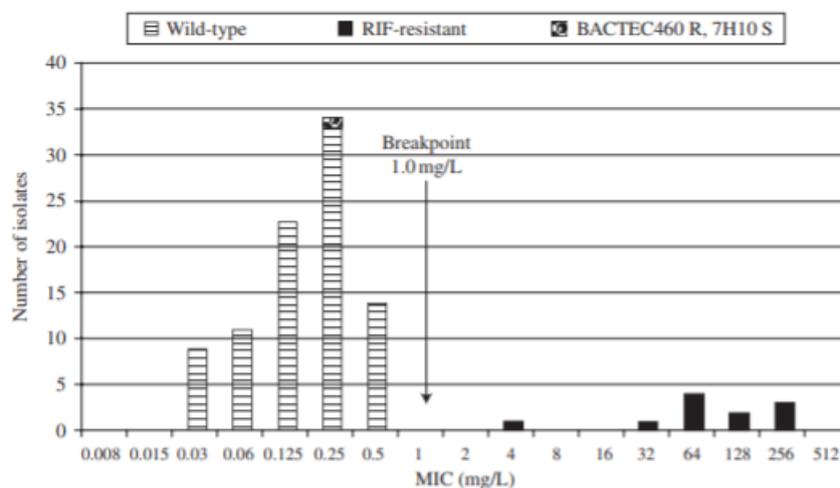
de técnicas, puede cambiar el resultado de sensibilidad antibiótica de sensible a resistente o al inverso. Este hecho es responsable de que muchas de estas mutaciones con bajo nivel de resistencia se interpreten a veces como aislados sensibles y otras veces como aislados resistentes, por todo ello el valor de estas mutaciones es incierto y reciben el nombre de aislados portadores de mutaciones cuestionadas.^{79,80} A pesar de que existen estudios que indican que la presencia de estos aislados incrementa la probabilidad de fracaso de tratamiento.⁸¹

En nuestra serie se detectaron un total de once pacientes con aislados portadores de mutaciones cuestionadas. Todos ellos presentaban resistencia a INH, y la mayoría (8/11) procedían de pacientes previamente tratados por la que la exposición previa al tratamiento pudo haber contribuido a su desarrollo. Tres se clasificaron como fenotípicamente resistentes por las pruebas de sensibilidad basadas en cultivo, pero presentaban mutaciones asociadas a un bajo nivel de resistencia (CMI entre 1.0 y 2.0 µg/ml; punto de corte clínico = 1.0 µg/ml). Las mutaciones que se detectaron fueron la doble mutación L430P+S493L (L511P+S574L según la numeración para EC), la delección N437 (N518del según la numeración para EC), y la mutación H445L (H526L según la numeración para EC). Los restantes ocho aislados portadores de mutaciones cuestionadas se clasificaron como aislados fenotípicamente sensibles. Las mutaciones que se detectaron fueron L430P (L511P según numeración para EC), 1 caso; D435Y (D516Y según numeración para EC), 1 caso; H445L (H526L según numeración para EC), 2 casos; H445N (H526N según numeración para EC), 1 caso, y L452P (L533P según numeración para EC), 2 casos. Los aislados portadores de las mutaciones H445L, D435Y y L452P presentaban valores de CMI aumentados cercanos al punto de corte clínico (CMI = 0,5-1,0 µg/ml). Sin embargo, los aislados portadores de las mutaciones H445N y L430P presentaban valores de CMI por debajo del punto de ECOFF (CMI = 0,125 µg/ml; ECOFF = 0,25-0,5 µg/ml).

Para mejorar el diagnóstico fenotípico de la resistencia a RIF varios autores han sugerido reducir el punto de corte clínico de la RIF para que coincida con el punto de ECOFF.^{77,82,83} El problema radica en la superposición de los valores de CMI entre las poblaciones que carecen o no expresan mecanismos de resistencia con aquellas que

los presentan y expresan, véase Figura 13. Ello hace que, aunque se reduzca el punto de corte clínico todavía se pasarían por alto algunos aislados portadores de mutaciones cuestionadas mientras que algunos aislados sensibles se clasificarían erróneamente como resistentes.⁷⁷

Figura 13. Distribución de los valores de concentración mínima inhibitoria a rifampicina entre los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* complex.



* Para establecer la distribución de los valores de CMI a rifampicina entre los aislados que carecen o no expresan mecanismos de resistencia se seleccionaron 90 aislados clínicos consecutivos sensibles a rifampicina (barras con líneas verticales). También se seleccionaron 11 aislados resistentes tanto por BACTEC460 como por 7H10 (barras negras). El punto de corte clínico está señalado con una flecha. La barra llena de puntos es un aislado discordante de BACTEC460 y 7H10.

Fuente: Schön T et al. Evaluation of wild-type MIC distributions as a toll for determination of clinical breakpoint for *Mycobacterium tuberculosis*.⁸⁴

Con el mismo fin, las plataformas de datos han trabajado en el desarrollo de nuevos métodos para predecir la resistencia fenotípica a fármacos antituberculosos. Uno de los consorcios internacionales de TB junto con los socios de la plataforma ReSeqTB publicaron en 2018 un trabajo cuyo objetivo era establecer un nuevo método, estandarizado y reconocido internacionalmente para predecir la resistencia fenotípica a fármacos e implantarlo en su plataforma.⁸⁵ Este nuevo método de predicción de resistencias se basa en la utilización de la razón de verosimilitud como medida de asociación. Este parámetro tiene dos grandes ventajas. La primera es que la razón de verosimilitud es una medida universal de asociación que no se ve afectada

por la prevalencia. La segunda es que, a diferencia de la sensibilidad y la especificidad, que a menudo se utilizan para evaluar las mutaciones de resistencia como predictores de resistencia fenotípica, la razón de verosimilitud no conduce a una exageración de los beneficios de una prueba o a la fuerza de una asociación ya que simplemente proporcionan un multiplicador de la probabilidad de resistencia previa a la prueba. Es decir, una alta sensibilidad y especificidad no garantizan que el resultado positivo sea correcto si la afección subyacente es extremadamente rara. A pesar de sus ventajas existe un inconveniente y es que este sistema no tiene en cuenta la incertidumbre (intervalo de confianza 95%) en torno a la estimación de la razón de verosimilitud para mutaciones que se asocian positivamente con la resistencia. Esto significa que las mutaciones pueden clasificarse como de alta confianza, a pesar de haber sido observada en tan sólo unos pocos aislados resistentes. Por lo tanto, el nivel de confianza en la clasificación de cada mutación se ha de considerar como provisional ya que podría cambiar en cualquier dirección a medida que se obtengan más datos.⁸⁵ Junto con la descripción de esta nueva metodología, publicaron también una lista de mutaciones asociadas a resistencia clasificadas según su fuerza de asociación para predecir la resistencia. Según esta lista la mutación H445L (H526L según la numeración para EC) tiene una alta fuerza de asociación, y las mutaciones D435Y (D516Y según la numeración para EC) y L452P (L533P según la numeración para EC) tienen una moderada fuerza de asociación para predecir la resistencia fenotípica a RIF.⁸⁵ Mientras que las mutaciones H445N (L511P según la numeración para EC) y L430P (H526N según la numeración para EC) tienen una baja fuerza de asociación para predecir la resistencia fenotípica a RIF, ergo evidencia no concluyente de que la mutación confiere o está fuertemente asociada a resistencia a RIF.⁸⁵ Los aislados portadores de mutaciones con alta o moderada fuerza de asociación se consideraron aislados clasificados erróneamente como aislados sensibles. Mientras que los aislados portadores de mutaciones con baja fuerza de asociación para predecir la resistencia fenotípica se consideraron aislados verdaderamente sensibles. Si revisamos los valores de CMI de estos aislados veremos que todos los aislados portadores de mutaciones con alta o moderada fuerza de asociación presentaban valores de CMI a RIF aumentados (CMI entre 0,5 y 1,0 µg/ml). Mientras que los

aislados portadores de mutaciones con baja fuerza de asociación presentaban valores de CMI por debajo del punto de ECOFF. Es decir, la determinación del valor de la CMI a RIF es una herramienta útil para esclarecer el valor clínico de los aislados portadores de mutaciones cuestionadas.

En resumen, debido a la presencia de estos aislados seis casos de TB-MDR no fueron diagnosticados por pruebas de sensibilidad a fármacos basadas en cultivo, un caso entre los nuevos casos y cinco casos entre los pacientes previamente tratados. No obstante, no puedo evaluarse el riesgo de fracaso del tratamiento con pautas que incluyan RIF debido a que todos los pacientes, excepto uno, recibieron medicamentos de segunda línea para el tratamiento de la TB puesto que fueron identificados como resistentes por la prueba Xpert MTB/RIF (pacientes previamente tratados) y el único caso que recibió la pauta de tratamiento 2EHZR/4HR (caso nuevo) murió durante el tratamiento.

Existe una última condición que puede ser causa de discrepancias, la **heteroresistencia**. Esta clásicamente se detectaba empleando pruebas de sensibilidad antibiótica basadas en cultivo y se definía como la coexistencia en un mismo paciente de micobacterias sensibles y resistentes para un mismo fármaco considerándose una cepa de MTBC resistente a un antibiótico cuando el 1% o más de la población bacteriana de un cultivo era capaz de crecer y multiplicarse en presencia de una concentración determinada de ese fármaco. Para ello se establecía la proporción de bacterias resistentes comparando el crecimiento de la cepa con antibiótico con una dilución 1/100 de la cepa que actuaba como control. Esta interpretación se conoce como método de las proporciones y las concentraciones críticas, y fue establecido por Cannetti y Grosset en 1963.⁸⁶ Sin embargo, con la llegada de las pruebas moleculares este término también se emplea para describir la coexistencia en un mismo paciente de micobacterias con el alelo salvaje y micobacterias con el alelo mutado asociado a resistencia a un determinado fármaco.⁸⁷ Este fenómeno, que representa una vía de escape natural hacia la resistencia estable a los antimicrobianos, se ha estudiado poco, esto hace que la prevalencia de este fenómeno sea desconocida pero

presumiblemente dependa de la epidemiología local de la resistencia a los fármacos antituberculosos.

Las pruebas basadas en el principio de hibridación reversa, como GenoType MTBDR*plus*, pueden detectar una parte de los aislados heteroresistentes. La detección simultánea de bandas de tipo salvaje y bandas de mutación es indicador de hetero-resistencia. Pero si la hetero-resistencia es debida a una mutación no incluida en la prueba diagnóstica esta pasará desapercibida y el aislado se identificará como sensible a RIF. Las pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR a tiempo real, como Xpert MTB/RIF, no son una buena herramienta para hallar aislados heteroresistentes, pero su presencia afecta menos al resultado de la prueba. Pues la ausencia de señal de una de las sondas (población homo-resistente) o si hay una diferencia de 3,5 ciclos o más entre la detección de la primera y la última sonda (población hetero-resistente) indica resistencia a RIF. Tan sólo habría dificultades para caracterizar correctamente como aislados resistentes aquellos en que la población resistente represente un bajo porcentaje de esta.⁸⁸

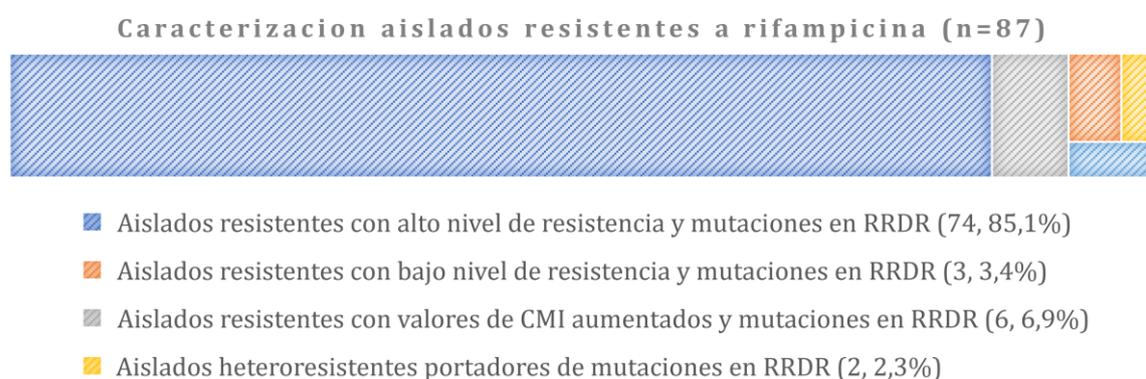
En nuestra serie de pacientes se detectaron casualmente 2 casos de hetero-resistencia entre los aislados resistentes a RIF ambos procedentes de pacientes previamente tratados. Estos dos aislados hetero-resistentes eran portadores de la doble mutación L430P y S493L (L511P+S574L según numeración para EC) y la doble mutación D435Y y L452P (D516Y+L533P según numeración para EC). La prueba Xpert MTB/RIF realizada en Angola para establecer la pauta de tratamiento de estos pacientes fue capaz de detectar, en ambos casos, la resistencia a RIF. Pero la presencia de estos aislados interfirió en la correcta caracterización de éstos mediante la prueba MTBDR*plus*, la cual identificó como sensibles ambos aislados. Esto fue debido a que ninguna de las mutaciones que portaban estos aislados se encuentra entre las bandas de mutación presentes en la prueba GenoType MTBDR*plus* VER2.0, a saber, D516V, H526Y, H526D y S531L (según la numeración para EC). Estos hallazgos son casuales y es probable que el porcentaje de hetero-resistencia hallado en nuestra serie esté subestimado, ya que nuestro estudio no estaba diseñado para estimar la prevalencia de hetero-resistencia, lo que habría requerido de la realización de antibiogramas por

el método de las proporciones en medio Löwenstein-Jensen o la aplicación de técnicas de secuenciación masiva sobre muestras o cultivo primario.⁸⁹ Estudios en otros países con alta carga de TB demuestran prevalencias de hetero-resistencia que van entre el 1,9 y el 28,8%.^{87,90,91}

En resumen, en nuestro estudio encontramos un total de 87 aislados resistentes a RIF. De los cuales, 74 casos (85,1%) tenían mutaciones de resistencia no cuestionadas, 9 casos (10,3%) tenían mutaciones de resistencia cuestionadas, 2 casos (2,3%) no tenían mutaciones en el gen *rpoB* y 2 casos (2,3%) eran aislados hetero-resistentes, ver figura 14. La distribución de mutaciones entre los aislados resistentes a RIF fue S450L (S531L según la numeración para EC), 49 casos (56,3%); D435V (D516V según la numeración para EC), 15 casos (17,2%); H445D (H526D según la numeración para EC), 3 casos (3,4%); H445L (H526L según la numeración para EC), 3 casos (3,4%); H445Y (H526Y según la numeración para EC), 2 casos (2,3%); H435Y (D516Y según la numeración para EC), 2 casos (2,3%); L452P (L533P según la numeración para EC), 2 casos (2,5%); L430P (L511P según la numeración para EC), 2 casos (2,5%); doble mutante L430P y S493L (L511P y S574L según la numeración para EC), 1 caso (1,1%); inserción Q432 (Q513ins según la numeración para EC), 1 caso (1,1%); doble mutante D435Y y L452P (D516Y y L533P según la numeración para EC), 1 caso (1,1%); delección N437 (N518del según la numeración para EC), 1 caso (1,1%); doble mutante L449M y S450F (L530M y S531F según la numeración para EC), 1 caso (1,1%); S450F (S531F según la numeración para EC), 1 caso (1,1%); S450W (S531W según la numeración para EC), 1 caso (1,1%) y S450Y (S531Y según la numeración para EC), 1 caso (1,1%). También hay que destacar que entre los 221 aislados sensibles a RIF se detectaron dos aislados (0,9%) portadores de mutaciones con cambio de sentido en la RRDR no asociadas con resistencia a RIF, cuya presencia puede conducir a una identificación genotípica errónea de TB-RR mediante el empleo de pruebas moleculares convencionales. Este patrón de distribución de mutaciones observado difiere mucho de otros patrones de mutaciones comunicados por otros países,⁹² los cuales suelen mostrar un claro predominio de la mutación S450L (S531L según la numeración para EC) y muy poca diversidad genética, lo que sugiere un bajo

grado de maduración de la epidemia de TB-MDR en Angola.^{93,94} El desarrollo de resistencia a fármacos antituberculosos implica un coste, en términos de eficacia biológica, en ausencia del fármaco. Por ello se suele observar un fenómeno de selección de mutaciones de resistencias que van seguidas o acompañadas de mutaciones compensatorias a medida que avanza la epidemia y se incrementa la tasa de resistencia primaria entre los casos de TB-MDR.⁹⁴

Figura 14. Caracterización de los aislados resistentes a rifampicina.



5.3 Evaluación de la rentabilidad diagnóstica del sistema GeneXpert

En nuestra serie solo los pacientes previamente tratados se sometieron a pruebas rápidas para la detección de resistencias sobre muestra clínica antes de iniciar tratamiento. En total 111 pacientes se beneficiaron de la realización de dicha prueba. En 107 se confirmó el diagnóstico de TB identificándose 75 casos de TB-RR. Sin embargo, solo se obtuvo confirmación bacteriológica de TB y resultados de pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos por cultivo en 83 de los casos confirmados. La concordancia entre ambas técnicas para la detección de resistencia a RIF fue elevada del 91,6%. Detectándose siete aislados discordantes, ver tabla 10. Seis eran aislados clasificados fenotípicamente como sensibles, pero identificados como resistentes por la prueba Xpert MTB/RIF, de los cuales cinco eran portadores de mutaciones con cambio de sentido con una fuerte o moderada asociación para predecir la resistencia fenotípica, es decir, verdaderamente resistentes, y en el caso restante no se identificó ninguna mutación en RRDR a pesar de que la prueba Xpert MTB/RIF detecto resistencia a RIF por ausencia de señal en la sonda E (población

homo-resistente), lo que sugiere un error preanalítico en el laboratorio clínico. El séptimo aislado discordante fue clasificado fenotípicamente como aislado resistente, pero sensible por la prueba Xpert MTB/RIF, la caracterización por secuenciación del gen *rpoB* no demostró la presencia de ninguna de las mutaciones asociadas a resistencia a RIF descritas en *rpoB*, y desconocemos el mecanismo de resistencia a RIF de dicho aislado. Teniendo en cuenta estos resultados de caracterización genotípica la sensibilidad y la especificidad del Xpert MTB/RIF fue del 98,4% y del 94,1%, respectivamente, para la detección de resistencia de RIF entre los pacientes previamente tratados, ver tabla 10.

Tabla 10. Comparación de los resultados de resistencia a rifampicina obtenidos mediante Xpert MTB/RIF y pruebas de detección de resistencia basadas en cultivo.

Xpert MTB/RIF	Pruebas de detección de resistencias basadas en cultivo			
	Casos nuevos con baciloscopia + tras 2 m (n=55)		Casos previamente tratados (n = 83)	
	RIF ^R	RIF ^S	RIF ^R	RIF ^S
RRDR secuencia mutada	15	1	60	6 ¹
RRDR secuencia salvaje	0	39	1	16

	Concordancia %	Índice Kappa	Sensibilidad %, (95% IC)	Especificidad %, (95% IC)	VPP %, (95% IC)	VPN %, (95% IC)
Global	92,4	0,85	97,5 (94,9-100)	86,4 (80,8-91,9)	89,5 (84,6-94,5)	96,9 (93,7-99,6)
Casos nuevos baciloscopia + tras 2 m	98,2	0,96	93,8 (87,4-100)	100	100	97,5 (93,4-100)
Casos previamente tratados	91,6	0,77	98,4 (95,6-100)	72,7 (63,1-82,3)	90,9 (84,7-97,1)	94,1 (89,1-99,2)

Abreviaciones: m = meses, RIF = rifampicina, R = resistente, S = sensible, RRDR = región determinante de resistencia a rifampicina, IC = intervalo de confianza, VPP = valor predictivo positivo, VPN = valor predictivo negativo.

¹ entre ellos se detectaron cinco aislados portadores mutaciones con cambio de sentido con una fuerte o moderada asociación para la detección de resistencia a rifampicina. Por ese motivo se consideraron resultados falso negativos de las pruebas de detección de resistencias basadas en cultivo.

A los pacientes nuevos que persistían con baciloscopia positiva tras dos meses de tratamiento también se les realizó dicha prueba. La falta de conversión de la baciloscopia tras la fase intensiva de tratamiento puede deberse a la presencia de aislados resistentes que no responden al tratamiento, sin embargo, existen otros motivos que pueden conducirnos a esta misma situación como la mala adherencia al tratamiento, la resolución lenta del cuadro clínico debido a la presencia de lesiones

extensas o incluso pueden ser bacterias no viables que permanecen visibles al microscopio. En total 90 pacientes se beneficiaron de la realización de dicha prueba. Pero solo en 84 de ellos se demostró la presencia de MTBC identificándose 22 casos de TB-RR. Es decir, que en el contexto del estudio (alta incidencia de TB-MDR) la falta de conversión de la baciloscopia entre los casos nuevos es debida a la presencia de aislados resistentes en el 26,2% de los casos. Sin embargo, solo teníamos confirmación bacteriológica de TB y resultados de pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos por cultivo en medio líquido en 55 casos. La concordancia entre ambas técnicas para la detección de resistencia a RIF fue elevada del 98,2%. Detectándose tan solo un aislado discordante, clasificado fenotípicamente como sensible, pero identificado como resistente por la prueba Xpert MTB/RIF. La prueba Xpert MTB/RIF identificó dicho aislado como resistente por presentar una diferencia de más de 3,5 ciclos entre la detección de la primera y la última sonda (sonda B), lo que sugiere la presencia de una población hetero-resistente. Sin embargo, la caracterización por secuenciación del gen *rpoB* no lo demostró ni tampoco demostró la presencia de ninguna mutación asociada a resistencia, lo que sugiere un proceso de selección positiva de la población sensible tras el cultivo por la ausencia de presión selectiva (no se pudo demostrar por no disponer de muestra original para confirmar). Teniendo en cuenta estos resultados de caracterización genotípica la sensibilidad y la especificidad del Xpert MTB/RIF fueron del 100% y del 97,5%, respectivamente, para la detección de resistencia a RIF entre los pacientes nuevos que persistían con baciloscopia positiva tras dos meses de tratamiento, ver tabla 10.

5.4 Propuesta de implementación de nuevos algoritmos diagnósticos

Los algoritmos diagnósticos implantados por los PNLCT dependen en gran medida de la epidemiología de la TB, la prevalencia de la TB asociada a VIH, la prevalencia de la TB farmacorresistente, así como, de los recursos disponibles. En el caso concreto de la República de Angola, hasta el año 2014, momento en el que se inició el proyecto en el cual se engloba la presente tesis doctoral, la confirmación del diagnóstico de la TB en la región se basaba única y exclusivamente en la microscopia de frotis de esputo. Sin

embargo, tras la notificación de los datos sobre la prevalencia de TB-MDR en la región, el PNLCT fortaleció los servicios de laboratorio incorporando el Xpert MTB/RIF como método de diagnóstico rápido de la TB y la TB-MDR.

Esta medida del PNLCT está en línea con las recomendaciones de la OMS para el correcto manejo de pacientes con TB. Dicha organización aconseja que todos los países con alta carga de TB-MDR incorporen en su algoritmo diagnóstico pruebas rápidas para el diagnóstico de la TB y la TB farmacorresistente (p. ej. Xpert MTB/RIF, Xpert MTB-XDR o LIPA). Recomendándose un uso indiscriminado de las mismas o, si los recursos son limitados, destinarlas para el correcto manejo de grupos de riesgo como por ejemplo pacientes previamente tratados, pacientes nuevos que persisten con baciloscopia positiva tras dos meses de tratamiento o contactos de pacientes con TB-MDR. Esta medida es altamente coste-efectiva pues permite orientar de forma precoz el tratamiento, lo que contribuye a disminuir la morbimortalidad a nivel individual e interrumpir la cadena de transmisión y prevenir el desarrollo y propagación de esta enfermedad en la comunidad. Sin embargo, hay que resaltar también que la OMS recomienda que todos los países fortalezcan los servicios de laboratorio capacitándolos para realizar cultivo y antibiograma de micobacterias. Dicha recomendación tiene dos objetivos, por un lado, la realización sistemática de antibiograma a todos los casos nuevos de TB y por otro lado mejorar el diagnóstico de pacientes con TB paucibacilar en aquellos países con alta carga infección por VIH. Sin embargo, en la República de Angola, a día de hoy no hay ningún laboratorio con capacidad para realizar cultivo y antibiograma de micobacterias. Tampoco disponen de ningún laboratorio con la infraestructura y/o personal necesario para la realización de pruebas moleculares de mayor complejidad.

Por todo lo mencionado anteriormente y teniendo en cuenta el contexto epidemiológico del país, alta carga de infección por VIH y alta carga de TB-MDR, el PNLCT debería invertir recursos para aumentar la capacidad diagnóstica de la TB. Siendo urgente la puesta en marcha de un laboratorio central de referencia con capacidad para realizar cultivo y antibiograma. Además, dicho laboratorio debería capacitarse también para la realización de pruebas moleculares de mayor

complejidad que permitan el diagnóstico rápido de la TB farmacorresistente, así como, caracterizar y monitorizar los aislados circulantes. Esto supone un reto importante para el PNCLT, pero también una oportunidad para la implementación de nuevas tecnologías (p. ej. secuenciación de nueva generación o NGS) y nuevos algoritmos diagnósticos que permitan la realización de pruebas diagnósticas a gran escala, el diagnóstico personalizado del paciente y la generación de información epidemiológica útil para la salud pública.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 6.1 La prevalencia de la tuberculosis farmacorresistente en Cubal, una zona rural de la República de Angola es muy alta: del 83,1% entre los pacientes previamente tratados y del 25,8% entre los casos nuevos.
- 6.2 La prevalencia de la tuberculosis multidrogorresistente también fue muy alta: del 71,1% entre los pacientes previamente tratados y del 8,0% entre los casos nuevos. No detectándose ningún caso de tuberculosis ultrarresistente.
- 6.3 El patrón de resistencia fenotípica más común entre los pacientes previamente tratados es la resistencia a todos los fármacos de primera línea (34,8%) y entre los casos nuevos la monorresistencia a isoniacida (36,2%).
- 6.4 El porcentaje de aislados resistentes a isoniacida con mecanismos de resistencia de alto nivel (mutaciones en *katG*) fue elevado: del 71,2% entre los pacientes previamente tratados y del 55,3% entre los casos nuevos.
- 6.5 El porcentaje de aislados resistentes a isoniacida con mecanismos de resistencia de bajo nivel (mutaciones en *inhA*) fue bajo: del 6,1% entre los pacientes previamente tratados y del 4,3% entre los casos nuevos.
- 6.6 El porcentaje de aislados resistentes a rifampicina con mutaciones en la región determinante de resistencia a rifampicina fue del 98,5% entre los pacientes previamente tratados y del 95,2% entre los casos nuevos. Es decir, que el 1,5% de los aislados resistentes entre los pacientes previamente tratados y el 4,8% de los aislados resistentes entre los casos nuevos no se pueden detectar con las pruebas moleculares convencionales de detección de resistencias (Xpert MTB/RIF, GenoType MTBDR*plus*).
- 6.7 El porcentaje de aislados resistentes a rifampicina que presentaban mecanismos de resistencia de baja expresión difíciles de detectar mediante las pruebas de sensibilidad a fármacos basadas en cultivo fue del 12,1% entre los pacientes previamente tratados y del 9,5% entre los casos nuevos.

CONCLUSIONES

- 6.8** El 0,9% de los aislados sensibles a rifampicina eran portadores de mutaciones en *rpoB* no asociadas a resistencia que pueden identificarse erróneamente como aislados resistentes por las pruebas moleculares convencionales de detección de resistencias (Xpert MTB/RIF, GenoType MTBDR*plus*).
- 6.9** Xpert MTB/RIF demostró ser una herramienta útil tanto para la detección de casos resistentes entre pacientes previamente tratados (Se=98,4; Sp=94,1%) como para la detección de casos resistentes entre los pacientes que persistían con baciloscopia positiva tras dos meses de tratamiento (Se=100%; Sp=97,5%).

CONCLUSIONES

LÍNEAS DE FUTURO

7. LÍNEAS DE FUTURO

La NGS que se ha mostrado tremendamente útil para la caracterización y seguimiento de la actual pandemia por el coronavirus SARS-CoV-2, es una herramienta muy útil para resolver distintas cuestiones microbiológicas. Entre estas aplicaciones destaca su utilidad para la realización de estudios epidemiológicos a nivel local y global, como el estudio de las múltiples variantes del SARS-CoV-2 que están apareciendo durante esta pandemia, así como, en el estudio y vigilancia de los mecanismos de resistencia antibiótica, de forma análoga a como lo ha demostrado su aplicación asistencial para estudio de variantes resistentes a tratamiento antivirales frente a el VIH, o el virus de la hepatitis C.^{95,96,97} Pese a ello, existen pocos estudios de costo-efectividad que demuestren su eficacia en la rutina clínica en el campo que trata esta tesis doctoral. Este hecho junto su requerimiento de una inversión económica elevada y de una alta capacitación del personal explica que su introducción en los laboratorios clínicos sea aún limitada.

Una de las líneas de trabajo de nuestro grupo de investigación consiste en el desarrollo y traslación clínica de pruebas de NGS en enfermedades infecciosas, que es ya una realidad en los estudios del VIH, hepatitis C y virus respiratorios como el propio SARS-CoV-2. Concretamente, en el ámbito de la micobacteriología se está trabajando en el diseño, desarrollo, implementación y validación de un panel de secuenciación de ADN de 10 genes relevantes asociados a resistencias a fármacos, usando técnicas de secuencia masiva. Este panel presenta una buena rentabilidad diagnóstica a partir de aislados de cultivos, y también ha demostrado ser útil en la detección directa tras un periodo de cultivo breve. La introducción de este tipo de paneles tiene el potencial de reducir el tiempo de respuesta hasta la emisión de los resultados del antibiograma, además, su implementación también puede disminuir el coste económico del procedimiento diagnóstico de la TB, al substituir alguna de las pruebas moleculares comerciales empleadas o incluso el cultivo. Sin embargo, para valorar la utilidad y el impacto real de estas pruebas en la rutina clínica deberemos realizar una evaluación económica de costo beneficio y/o costo efectividad de estas nuevas herramientas dentro del algoritmo diagnóstico de la TB tanto en áreas de alta

o baja incidencia de TB. También se está trabajando en la implementación de aplicaciones de secuenciación de genoma completo para caracterizar y realizar estudios de epidemiología molecular. Restando pendiente en el momento del depósito de la presente tesis doctoral la finalización del estudio de epidemiología molecular de los aislados clínicos resistentes circulantes en la región de la República de Angola.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación seguirá fomentando el desarrollo de proyectos de apoyo al fortalecimiento de los servicios de laboratorio y de diagnóstico de la TB. Ofreciendo capacitación y asesoría técnica para la puesta en marcha de laboratorios de micobacterias con capacidad para realizar cultivo y antibiograma a fármacos de primera línea. Así como, apoyo para la implementación de nuevas pruebas diagnósticas rápidas que pueden ser de utilidad en el manejo programático de los pacientes con TB, como por ejemplo, la introducción de la prueba molecular Xpert MTB-XDR.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Comas I, Coscolla M, Luo T, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet.* 2013;45(10):1176-1182. doi:10.1038/ng.2744
2. World Health Organization (WHO). *Global Tuberculosis Report 2020*; 2020.
3. Koch R. The etiology of tuberculosis. *Berliner Klin Wochenschrift.* 1982;19(3):221-230.
4. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina Moreno T, Valverde Cobacho A, Saiz Vega P, Jiménez Pajares MS. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(9):496-502. doi:https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.01.008
5. Malone KM, Gordon S V. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members Adapted to Wild and Domestic Animals. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1019:135-154. doi:10.1007/978-3-319-64371-7_7
6. Dan L. Longo, Dennis L. Kasper, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser JL. *Harrison. Principios de Medicina Interna, 18e.*
7. Magee JG, Ward AC. *Mycobacterium.* Vol 33.; 1958. doi:10.11400/kekaku1923.33.260
8. UNION. *Manejo de La Tuberculosis Multirresistente.* Vol 13.; 2007.
9. Jarlier V, Nikaido H. *Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics.* *FEMS Microbiol Lett.* 1994;123(1-2):11-18. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x
10. Gun MA, Bozdogan B, Coban AY. Tuberculosis and beta-lactam antibiotics. *Future Microbiol.* 2020;15(10):937-944. doi:10.2217/fmb-2019-0318
11. da Silva PEA, von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63(1):1-9. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x
12. Streptomycin Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Br Med J.* 1948;2(4582):769 LP - 782. doi:10.1136/bmj.2.4582.769
13. CROFTON J, MITCHISON DA. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *Br Med J.* 1948;2(4588):1009-1015. doi:10.1136/bmj.2.4588.1009
14. González-Martin J. Microbiología de la tuberculosis. *Semin la Fund Española Reumatol.*

- 2014;15(1):25-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semreu.2014.01.001>
15. Horsburgh CR, Barry CE, Lange C. Treatment of Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2149-2160. doi:10.1056/NEJMra1413919
 16. Coll P. Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(8):474-480. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.010>
 17. Caminero JA, Cayla JA, García-García JM, García-Pérez FJ, Palacios JJ, Ruiz-Manzano J. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. *Arch Bronconeumol*. 2017;53(9):501-509. doi:10.1016/j.arbres.2017.02.006
 18. González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(5):297.e1-297.e20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.006>
 19. World Health Organization. *Meeting Report of the WHO Expert Consultation on the Definition of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*; 2020.
<https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
 20. WHO 2016. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis 2016. *World Heal Organ*. 2016;(October).
 21. Brady P, Vita D. Challenges to tuberculosis control in Angola: the narrative of medical professionals. *J Public Health (Bangkok)*. 2018;40(4):820-826.
doi:10.1093/pubmed/idx159
 22. López T, Moreno M, Salvador F, et al. Tuberculosis diagnosed in a rural setting in Angola. Accuracy of follow-up sputum smears to predict outcome. *Pathog Glob Health*. 2013;107(1):5-10. doi:10.1179/2047773212Y.0000000066
 23. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2016. *World Heal Organ*. Published online 2016.
 24. Rando-Segura A, Aznar ML, Moreno MM, et al. Drug Resistance of Mycobacterium tuberculosis Complex in a Rural Setting, Angola. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(3):569-572.
doi:10.3201/eid2403.171562
 25. World Health Organization (WHO). Angola Tuberculosis profile 2015. *World Heal Organ*. Published online 2017.
 26. Menzies HJ, Moalosi G, Anisimova V, et al. Increase in anti-tuberculosis drug resistance in

- Botswana: results from the fourth National Drug Resistance Survey. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18(9):1026-1033. doi:10.5588/ijtld.13.0749
27. Kapata N, Mbulo G, Cobelens F, et al. The Second Zambian National Tuberculosis Drug Resistance survey – a comparison of conventional and molecular methods. *Trop Med Int Heal.* 2015;20(11):1492-1500. doi:10.1111/tmi.12581
 28. National Institute for Communicable Diseases. *South African Tuberculosis Drug Resistance Survey 2012–14.*; 2016.
 29. Eshetie S, Gizachew M, Dagne M, et al. Multidrug resistant tuberculosis in Ethiopian settings and its association with previous history of anti-tuberculosis treatment: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1). doi:10.1186/s12879-017-2323-y
 30. P. Samo Gudo, Z. Cuna, E. Coelho, S. Maungate, E. Borroni, P. Miotto, S. Ahmadova, M. Brouwer, G.B. Migliorie MZ and DMC. Is MDR-TB on the rise in Mozambique? Results of a national drug resistance survey. *Eur Respir J.* 2011;38:222-224.
 31. Musa BM, Adamu AL, Galadanci NA, Zubayr B, Odoh CN, Aliyu MH. Trends in prevalence of multi drug resistant tuberculosis in sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(9):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0185105
 32. Fundación PROBITAS. *Annual Report 2013.*; 2013.
 33. World Health Organization (WHO). Treatment of tuberculosis guidelines. Fourth Edition. *World Heal Organ.* Published online 2009.
 34. Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, et al. Standard short-course chemotherapy drug-resistant tuberculosis: Treatment outcomes in 6 countries. *J Am Med Assoc.* 2000;283(19):2537-2545. doi:10.1001/jama.283.19.2537
 35. Quy HTW, Lan NTN, Borgdorff MW, et al. Drug resistance among failure and relapse cases of tuberculosis: Is the standard re-treatment regimen adequate? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7(7):631-636.
 36. M.C.Becerra JCSSCAMLRSJB. Retreatment management strategies when first-line.pdf. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9(4):421–429.
 37. World Health Organization (WHO). Implementing Tuberculosis Diagnostics - Policy framework. *World Heal Organ.* 2015;ISBN 978 9(WHO/HTM/TB/2015.11):47.
https://www.who.int/tb/publications/implementing_TB_diagnostics/en/

38. World Health Organization (WHO). Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children. Policy update. *World Heal Organ*. Published online 2013.
39. World Health Organization (WHO). Xpert MTB/RIF implementation manual. Technical and operational “how to”: practical considerations. *World Heal Organ*. Published online 2014.
40. World Health Organization (WHO). The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin. Policy Update. *World Heal Organ*. Published online 2016.
41. World Health Organization (WHO). The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Policy guidance. *World Heal Organ*. Published online 2016.
42. Zhang Y, Yew WW. Mecanismos de resistencia a los medicamentos en el Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(11):1320-1330.
43. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase—peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Nature*. 1992;358(6387):591-593.
doi:10.1038/358591a0
44. Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WRJ, Sacchettini JC. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 1998;279(5347):98-102. doi:10.1126/science.279.5347.98
45. Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):13881-13886. doi:10.1073/pnas.2235848100
46. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science (80-)*. 1994;263(5144):227 LP - 230.
doi:10.1126/science.8284673
47. MIDDLEBROOK G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli; a preliminary report. *Am Rev Tuberc*. 1954;69(3):471-472. doi:10.1164/art.1954.69.3.471
48. Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, et al. Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis †. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2640-2649.

- doi:10.1128/AAC.00112-06
49. Vilchèze C, Jacobs WR. The mechanism of isoniazid killing: Clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:35-50.
doi:10.1146/annurev.micro.61.111606.122346
 50. Riccardi G, Pasca MR, Buroni S. Mycobacterium tuberculosis: Drug resistance and future perspectives. *Future Microbiol.* 2009;4(5):597-614. doi:10.2217/fmb.09.20
 51. Hartmann G, Honikel KO, Knusel F, Nuesch J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim Biophys Acta.* 1967;145(3):843-844.
doi:10.1016/0005-2787(67)90147-5
 52. Umezawa H, Mizuno S, Yamazaki H, Nitta K. Inhibition of DNA-dependent RNA synthesis by rifamycins. *J Antibiot (Tokyo).* 1968;21(3):234-236. doi:10.7164/antibiotics.21.234
 53. Wehrli W, Nuesch J, Knusel F, Staehelin M. Action of rifamycins on RNA polymerase. *Biochim Biophys Acta.* 1968;157(1):215-217. doi:10.1016/0005-2787(68)90285-2
 54. Rabussay D, Zillig W. A rifampicin resistant rna-polymerase from E. coli altered in the beta-subunit. *FEBS Lett.* 1969;5(2):104-106. doi:10.1016/0014-5793(69)80305-4
 55. Heil A, Zillig W. Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS Lett.* 1970;11(3):165-168. doi:10.1016/0014-5793(70)80519-1
 56. Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K, Darst SA. Crystal structure of thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell.* 1999;98(6):811-824.
doi:10.1016/S0092-8674(00)81515-9
 57. Korzheva N, Mustaev A, Kozlov M, et al. A structural model of transcription elongation. *Science (80-).* 2000;289(5479):619-625. doi:10.1126/science.289.5479.619
 58. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Lancet.* 1993;341(8846):647-651. doi:10.1016/0140-6736(93)90417-F
 59. Jamieson FB, Guthrie JL, Neemuchwala A, Lastovetska O, Melano RG, Mehaffy C. Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):2157-2162. doi:10.1128/JCM.00691-14
 60. Van Deun A, Barrera L, Bastian I, et al. Mycobacterium tuberculosis Strains with Highly Discordant Rifampin Susceptibility Test Results. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3501-3506.

- doi:10.1128/JCM.01209-09
61. Andres S, Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Occurrence of rpoB Mutations in Isoniazid-Resistant but Rifampin-Susceptible Mycobacterium tuberculosis Isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):590-592. doi:10.1128/AAC.01752-13
 62. Hofmann-Thiel S, Hoffmann H, Hillemann D, Rigouts L, Van Deun A, Kranzer K. How should discordance between molecular & growth-based assays for rifampicin resistance be investigated? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2017;21(7):721-726. doi:10.5588/ijtld.17.0140
 63. Hofmann-Thiel S, Hoffmann H, Hillemann D, Rigouts L, Van Deun A, Kranzer K. How should discordance between molecular & growth-based assays for rifampicin resistance be investigated? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2017;21(7):721-726. doi:10.5588/ijtld.17.0140
 64. Siu GKH, Zhang Y, Lau TCK, et al. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(4):730-733. doi:10.1093/jac/dkq519
 65. Zhao ZL, Chen L, Zhang H. Successful treatment of a multidrug-resistant tuberculosis patient with a negative xpert mtb/ rif test for rifampicin-resistant tuberculosis in guizhou province of china: A case report. *Infect Drug Resist.* 2020;13:1351-1355. doi:10.2147/IDR.S245219
 66. Li G, Zhang J, Guo Q, et al. Study of efflux pump gene expression in rifampicin-monoresistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *J Antibiot (Tokyo).* 2015;68(7):431-435. doi:10.1038/ja.2015.9
 67. Narang A, Garima K, Porwal S, et al. Potential impact of efflux pump genes in mediating rifampicin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from India. *PLoS One.* 2019;14(9):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0223163
 68. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, et al. Isolation of Mycobacterium tuberculosis strains with a silent mutation in rpoB leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol.* 2011;49(7):2688-2690. doi:10.1128/JCM.00659-11
 69. Moure R, Martín R, Alcaide F. Silent mutation in rpoB detected from clinical samples with rifampin-susceptible Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(10):3722. doi:10.1128/JCM.05314-11
 70. Mathys V, Vyvere M Van De, Droogh E De, Soetaert K, Groenen G. False-positive rifampicin resistance on Xpert W MTB / RIF caused by a silent mutation in the rpo B gene. *Int J Tuberc*

- Lung Dis.* 2014;18(April):1255-1257.
71. Mokaddas E, Ahmad S, Eldeen HS, Al-Mutairi N. Discordance between Xpert MTB/RIF assay and bactec MGIT 960 culture system for detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in a country with a low tuberculosis (TB) incidence. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1351-1354. doi:10.1128/JCM.03412-14
 72. Chiang TY, Fan SY, Jou R. Performance of an Xpert-based diagnostic algorithm for the rapid detection of drug-resistant tuberculosis among high-risk populations in a low-incidence setting. *PLoS One.* 2018;13(7):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0200755
 73. Association of Public Health Laboratories. Laboratory Considerations for Use of Cepheid Xpert ® MTB / RIF Assay. 2013;(November):1-7.
 74. Ocheretina O, Escuyer VE, Mabou MM, et al. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Haiti: Investigation of cases with discrepant susceptibility results. *PLoS One.* 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0090569
 75. Brandao AP, Pinhata JMW, Simonsen V, et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis presenting unusually high discordance between genotypic and phenotypic resistance to rifampicin in an endemic tuberculosis setting. *Tuberculosis.* 2020;125(June):102004. doi:10.1016/j.tube.2020.102004
 76. Aubry-Damon H, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of mutations in the rpoB gene that confer rifampin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(10):2590-2594. doi:10.1128/aac.42.10.2590
 77. Mvelase NR, Pillay M, Sibanda W, Ngozo JN, Brust JCM, Mlisana KP. RpoB Mutations Causing Discordant Rifampicin Susceptibility in Mycobacterium tuberculosis: Retrospective analysis of prevalence, phenotypic, genotypic, and treatment outcomes. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(4). doi:10.1093/ofid/ofz065
 78. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between Rifampin MICs for and rpoB Mutations of Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Japan. 1996;40(4):1053-1056.
 79. Rigouts L, Gumusboga M, Rijk WB De, et al. Rifampin Resistance Missed in Automated Liquid Culture System for Mycobacterium tuberculosis Isolates with Specific rpoB Mutations. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2641-2645. doi:10.1128/JCM.02741-12

80. Van Deun A, Aung KJM, Bola V, et al. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: Challenging the gold standard. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2633-2640. doi:10.1128/JCM.00553-13
81. Williamson DA, Roberts SA, Bower JE, et al. Clinical failures associated with rpoB mutations in phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(2):216-220. doi:10.5588/ijtld.11.0178
82. Heyckendorf J, Andres S, Köser C, et al. What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on multi- and extensively drug-resistant tuberculosis therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;62:AAC.01550-17. doi:10.1128/AAC.01550-17
83. Torrea G, Ng KCS, Van Deun A, et al. Variable ability of rapid tests to detect *Mycobacterium tuberculosis* rpoB mutations conferring phenotypically occult rifampicin resistance. *Sci Rep.* 2019;9(1):11826. doi:10.1038/s41598-019-48401-z
84. Schön T, Juréen P, Giske CG, et al. Evaluation of wild-type MIC distributions as a tool for determination of clinical breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(4):786-793. doi:10.1093/jac/dkp262
85. Miotto P, Tessema B, Tagliani E, et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J.* 2017;50(6). doi:10.1183/13993003.01354-2017
86. CANETTI, G., RIST, N., & GROSSET J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev Tuberc Pneumol (Paris).* 1963;27:217-272.
87. Operario DJ, Koepfel AF, Turner SD, et al. Prevalence and extent of heteroresistance by next generation sequencing of multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS One.* 2017;12(5):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0176522
88. Ng KCS, Supply P, Cobelens FGJ, et al. How Well Do Routine Molecular Diagnostics Detect Rifampin Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*? Land GA, ed. *J Clin Microbiol.* 2019;57(11). doi:10.1128/JCM.00717-19
89. Folkvardsen DB, Thomsen VO, Rigouts L, et al. Rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* Cultures as Detected by phenotypic and genotypic drug susceptibility test methods. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4220-4222.

- doi:10.1128/JCM.01602-13
90. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):350-352.
doi:10.1128/JCM.44.2.350-352.2006
 91. Kumar P, Balooni V, Sharma BK, Kapil V, Sachdeva KS, Singh S. High degree of multi-drug resistance and hetero-resistance in pulmonary TB patients from Punjab state of India. *Tuberculosis.* 2014;94(1):73-80. doi:10.1016/j.tube.2013.10.001
 92. Zhang L, Ye Y, Duo L, et al. Application of Genotype MTBDRplus in rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volum laboratory in Southern China. *Mol Biol Rep.* 2011;38(3):2185-2192.
doi:10.1007/s11033-010-0347-0
 93. Cohen T, Becerra MC, Murray MB. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. *Microb Drug Resist.* 2004;10(4):280-285. doi:10.1089/mdr.2004.10.280
 94. Knight GM, Colijn C, Shrestha S, et al. The Distribution of Fitness Costs of Resistance-Confering Mutations Is a Key Determinant for the Future Burden of Drug-Resistant Tuberculosis: A Model-Based Analysis. *Clin Infect Dis.* 2015;61(Suppl 3):S147-S154.
doi:10.1093/cid/civ579
 95. Ávila-Ríos S, Parkin N, Swanstrom R, et al. Next-Generation Sequencing for HIV Drug Resistance Testing: Laboratory, Clinical, and Implementation Considerations. *Viruses.* 2020;12(6). doi:10.3390/v12060617
 96. Perales C, Chen Q, Soria ME, et al. Baseline hepatitis C virus resistance-associated substitutions present at frequencies lower than 15% may be clinically significant. *Infect Drug Resist.* 2018;11:2207-2210. doi:10.2147/IDR.S172226
 97. Chen Q, Perales C, Soria ME, et al. Deep-sequencing reveals broad subtype-specific HCV resistance mutations associated with treatment failure. *Antiviral Res.* 2020;174:104694.
doi:10.1016/j.antiviral.2019.104694

ANEXO

El proyecto de investigación colaborativo en el que se engloba la presente tesis doctoral ha generado las siguientes publicaciones:

(1) Drug resistance of Mycobacterium tuberculosis Complex in a Rural Setting, Angola

Autores: Maria Luisa Aznar, Ariadna Rando Segura, Maria Milagros Moreno, Mateu Espasa, Elena Sulleiro, Cristina Bocanegra, Eva Gil, Arlete Ninda Eugénio, Adriano Zacarias, Domingos Katimba, Estevao Gabriel, Jacobo Mendioroz, Maria Teresa López, Tomás Pumarola, Maria Teresa Tórtola, Israel Molina.

Autores: Rando-Segura A, Aznar ML, Moreno MM, Espasa M, Sulleiro E, Bocanegra C, Gil E, Eugénio ANE, Escartin C, Zacarias A, Vegue J, Katimba D, Vivas MC, Gabriel E, Marina MC, Mendioroz J, López MT, Pumarola T, Molina I, Tórtola MT.

Revista: Emerg Infect Dis. 2018 Mar;24(3):569-572. doi: 10.3201/eid2403.171562.

(2) Prevalence and risk factors of multidrug-resistant tuberculosis in Cubal, Angola: a prospective cohort study

Autores: Maria Luisa Aznar, Ariadna Rando Segura, Maria Milagros Moreno, Mateu Espasa, Elena Sulleiro, Cristina Bocanegra, Eva Gil, Arlete Ninda Eugénio, Adriano Zacarias, Domingos Katimba, Estevao Gabriel, Jacobo Mendioroz, Maria Teresa López, Tomás Pumarola, Maria Teresa Tórtola, Israel Molina.

Revista: Int J Tuberc Lung Dis. 2019 Jan 1;23(1):67-72. doi: 10.5588/ijtld.18.0231

(3) Treatment Outcomes and Adverse Events from a Standardized Multidrug-Resistant Tuberculosis Regimen in a Rural Setting in Angola.

Autores: Maria Luisa Aznar, Ariadna Rando Segura, Maria Milagros Moreno, Mateu Espasa, Elena Sulleiro, Cristina Bocanegra, Eva Gil, Arlete Ninda Eugénio, Adriano Zacarias, Domingos Katimba, Estevao Gabriel, Jacobo Mendioroz, Maria Teresa López, Tomás Pumarola, Maria Teresa Tórtola, Israel Molina.

Revista: Am J Trop Med Hyg. 2019 Sep;101(3):502-509. doi: 10.4269/ajtmh.19-0175.

(4) Molecular characterization of rpoB gene mutations in isolates from tuberculosis patients in Cubal, Republic of Angola.

Autores: Ariadna Rando Segura, Maria Luisa Aznar, Maria Milagros Moreno, Mateu Espasa, Elena Sulleiro, Cristina Bocanegra, Eva Gil, Arlete Ninda Eugénio, Carlos Escartin Huesca, Adriano Zacarias, Josep Vegue Collado, Domingos Katimba, Maria Carmen Vivas Cano, Estevao Gabriel, Maria Teresa López, Tomás Pumarola, Israel Molina, Maria Teresa Tórtola.

Revista: manuscrito enviado para publicación.

Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a Rural Setting, Angola

Ariadna Rando-Segura,¹ María Luisa Aznar,¹
María Milagros Moreno, Mateu Espasa,
Elena Sulleiro, Cristina Bocanegra, Eva Gil,
Arlete N.E. Eugénio, Carlos Escartin,
Adriano Zacarias, Josep Vegue,
Domingos Katimba, María Carmen Vivas,
Estevao Gabriel, María Concepción Marina,
Jacobo Mendioroz, María Teresa López,
Tomas Pumarola, Israel Molina,
María Teresa Tórtola

We found high prevalence rates of multidrug-resistant tuberculosis among retreatment patients (71.1%) and persons with new cases (8.0%) in Angola. These findings are of concern but should be interpreted with caution. A national drug-resistance survey is urgently needed to determine the actual prevalence of multidrug-resistant tuberculosis in Angola.

Angola is among the 30 countries with the highest incidence of tuberculosis (TB) and multidrug-resistant (MDR) TB worldwide (1). However, drug-resistance prevalence is unknown in the absence of a national survey or laboratory drug-resistance surveillance systems (1). The objectives of our study were to determine the proportion of TB drug resistance in isolates from pulmonary TB patients and describe molecular mechanisms accounting for drug resistance in these isolates.

The Study

We conducted a survey during April 2014–July 2015 at the Nossa Senhora da Paz Hospital (HNSP), a reference center for the diagnosis and treatment of TB in the town of Cubal, Benguela Province, Angola. Patients >16 years of age with a diagnosis of pulmonary TB (i.e., patients with clinical symptoms and a positive smear result) and those infected with HIV who had suggestive clinical signs of pulmonary

Author affiliations: Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain (A. Rando-Segura, M.L. Aznar, M. Espasa, E. Sulleiro, C. Bocanegra, E. Gil, C. Escartin, J. Vegue, M.C. Vivas, M.C. Marina, J. Mendioroz, T. Pumarola, I. Molina, M.T. Tórtola); Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola (M.L. Aznar, M.M. Moreno, C. Bocanegra, E. Gil, A.N.E. Eugénio, A. Zacarias, D. Katimba, E. Gabriel, M.T. López)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2403.171562>

TB but negative sputum samples for acid-fast bacilli were eligible for enrollment in the study. We collected data on age, sex, HIV status, and any previous TB treatment.

Before the start of treatment, we collected sputum specimens from all case-patients and provided them to the Mycobacteriology Unit (a World Health Organization Supranational TB Reference Laboratory) at Vall d'Hebron University Hospital in Barcelona, Spain, for culture and drug-susceptibility testing. Positive cultures were tested by using GenoType MTBDRplus 2.0 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). Isolates identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) underwent drug-susceptibility testing with BD-MGIT-960 SIRE and PZA kits (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA). Isolates that were resistant to ≥ 1 drug were subjected to drug-susceptibility testing for second-line TB drugs by using the BD-MGIT-960 SIRE system.

We performed statistical analysis by using Stata 12 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA). We considered a p value <0.05 to be statistically significant. We calculated the percentage of patients with resistance patterns to first- and second-line TB drugs on the basis of total number of cases and the total number of MDR TB cases, respectively.

We included 422 cases; 44 were excluded because sputum specimen was not obtained (online Technical Appendix Figure, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/24/3/17-1562-Techapp1.pdf>). Of these cases, we classified 311 as new and the remaining 111 as retreatment cases. We isolated MTBC in 225 of the new cases. We observed no difference in the distribution of age, sex, or HIV status between case-patients with suspected or confirmed TB disease among the new cases. We isolated MTBC in 83 of the retreatment cases. We found case-patients in whom MTBC was not isolated were more frequently HIV-positive (14.3% compared with 4.8% in whom TB was confirmed; $p = 0.09$). We observed no difference in sociodemographic characteristics between patients with new and retreatment culture-positive cases (online Technical Appendix Table 1).

Eighteen (8.0%) of the 225 MTBC isolates from new cases demonstrated multidrug resistance. Other combinations of drug resistance were identified in 40 (17.8%) of new cases. The incidence of primary resistance was as follows: isoniazid, 47 cases (20.9%); streptomycin, 25

¹These authors were co-principal investigators for this article.

cases (11.1%); rifampin, 20 cases (8.9%); pyrazinamide, 13 cases, (5.8%); and ethambutol, 10 cases (4.4%) (Table 1). No isolates showed extensively drug-resistant TB (online Technical Appendix Table 2).

Among the 47 isoniazid-resistant isolates, *katG* mutations occurred in 26 (55.3%) and *inhA* mutations in 2 (4.3%); the remaining 19 isolates (40.4%) were classified as susceptible (Table 2). Among the 20 rifampin-resistant isolates, *rpoB* mutations occurred in 19 (95.0%), and 1 (5.0%) was classified as susceptible. Mutations detected included S531L (12 cases, 60.0%); D516V (4 cases, 20.0%); and H526Y (2 cases, 10.0%) (Table 2).

Fifty-nine (71.1%) of the 83 MTBC isolates from retreatment case-patients demonstrated multidrug resistance, and 33.9% of these case-patients had isolates that were resistant to all first-line drugs. Other combinations of drug resistance were identified in 10 case-patients (12.0%) (Table 1). No case-patients had extensively drug-resistant TB (online Technical Appendix Table 2).

Among the 66 isoniazid-resistant isolates, *katG* mutations occurred in 47 (71.2%) and *inhA* mutations in 4 (6.1%); the remaining 15 (22.7%) isolates were classified as susceptible (Table 2). Among the 61 rifampin-resistant isolates, *rpoB* mutations occurred in 58 (95.1%), and the remaining 3 (4.9%) were classified as susceptible. Mutations

detected included S531L (37 cases, 60.7%), D516V (11 cases, 18.5%), and H526D (3 cases, 3.7%) (Table 2).

Conclusions

We found a high prevalence of MDR TB among retreatment (71.1%) and new (8.0%) cases. These rates are >4 times the estimated prevalence of MDR TB for Angola (21% for retreatment cases, 2.8% for new cases) (1). The rates we describe represent the highest rates of MDR TB reported in sub-Saharan Africa (2,3); not even South Africa has reported a higher prevalence of MDR TB (4).

Our findings are part of a larger project to reinforce the capacities of the diagnostic laboratory by incorporation of the Xpert MTB/RIF test (Cepheid, Maurens-Scopont, France) (5). At the beginning of the project, none of the 18 provinces in Angola had access to the test; moreover, Nossa Senhora da Paz Hospital is a reference center for the diagnosis and treatment of TB, and these 2 factors might have generated a pull effect in more severe cases. Patients in the study might have largely consisted of TB patients referred because of poor treatment response or availability of second-line treatment, thus overrepresenting patients with resistance patterns, particularly among retreatment patients. This suggestion is supported by the high proportion of retreatment patients in the eligible study population

Table 1. Resistance to first-line antituberculosis drugs among *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates, Cubal, Angola, April 2014–July 2015*

Phenotypic drug susceptibility	Isolates from new cases, n = 225		Isolates from retreatment cases, n = 83	
	No.	% (95 CI)	No.	% (95 CI)
Susceptible to all 5 first-line drugs	167	74.2 (68.1–79.5)	14	16.9 (10.3–26.3)
Resistance to any drug	58	25.8 (20.5–31.9)	69	83.1 (73.7–89.7)
Any resistance to the following				
INH	47	20.9 (16.1–26.7)	66	79.5 (69.6–86.8)
RIF	20	8.9 (5.8–13.3)	61	73.5 (63.1–81.8)
STM	25	11.1 (7.6–15.9)	42	50.6 (40.1–61.1)
EMB	10	4.4 (2.4–8.0)	32	38.6 (28.8–49.3)
PZA	13	5.8 (3.4–9.6)	37	44.6 (34.4–55.3)
Overall monodrug resistance				
INH only	31	13.8 (9.9–18.9)	7	8.4 (4.1–16.4)
RIF only	21	9.3 (6.2–13.8)	4	4.8 (1.9–11.7)
STM only	1	0.4 (0.1–2.5)	2	2.4 (0.7–8.4)
EMB only	8	3.6 (1.8–6.9)	1	1.2 (0.2–6.5)
PZA only	1	0.4 (0.1–2.5)	0	0.0 (0.0–4.4)†
Overall multidrug resistance				
INH + RIF	18	8.0 (5.1–12.3)	59	71.1 (60.6–79.7)
INH + RIF + STM	4	1.8 (0.7–4.5)	12	14.5 (8.5–23.6)
INH + RIF + EMB	2	0.9 (0.2–3.2)	5	6.0 (2.6–13.3)
INH + RIF + PZA	0	0.0 (0.0–1.7)†	3	3.6 (1.2–10.1)
INH + RIF + STM + EMB	2	0.9 (0.2–3.2)	2	2.4 (0.7–8.4)
INH + RIF + STM + PZA	3	1.3 (0.5–3.8)	4	4.8 (1.9–11.7)
INH + RIF + EMB + PZA	1	0.4 (0.1–2.5)	9	10.8 (5.8–19.3)
INH + RIF + STM + PZA	1	0.4 (0.1–2.5)	4	4.8 (1.9–11.7)
INH + RIF + STM + EMB + PZA	5	2.2 (1.0–5.1)	20	24.1 (16.2–34.3)
Overall polydrug resistance				
INH + STM	9	4.0 (2.1–7.4)	3	3.6 (1.2–10.1)
INH + EMB	5	2.2 (1.0–5.1)	0	0.0 (0.0–4.4)†
INH + PZA	1	0.4 (0.1–2.5)	0	0.0 (0.0–4.4)†
INH + STM + EMB	2	0.9 (0.2–3.2)	0	0.0 (0.0–4.4)†
INH + STM + PZA	0	0.0 (0.0–1.7)†	1	1.2 (0.2–6.5)
INH + STM + EMB + PZA	0	0.0 (0.0–1.7)†	2	2.4 (0.7–8.4)
RIF + STM + PZA	1	0.4 (0.1–2.5)	0	0.0 (0.0–4.4)†

*EMB, ethambutol; INH, isoniazid; PZA, pyrazinamide; RIF, rifampin; STM, streptomycin.

†1-sided, 97.5% CI.

Table 2. Distribution of gene mutations associated with INH and RIF resistance, Cubal, Angola, April 2014–July 2015*

Phenotypic resistance	GenoType MTBDRplus			Isolates from new cases	Isolates from retreatment cases
	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>		
INH, n = 113				47	66
	Δwt, S315T1	–		23	42
	Δwt	–		3	5
	–	Δwt1, C15T		2	2
	–	Δwt1		0	1
	–	C15T		0	1
	–	–		19	15
RIF, n = 81				20	61
			–	1	3
			Δwt2	0	2
			Δwt2,3,4, D516V	1	8
			Δwt3,4, D516V	3	3
			Δwt4,5	0	1
			Δwt7	0	1
			Δwt7, H526Y	2	0
			Δwt7, H526D	0	2
			Δwt7,8, H526D	0	1
			Δwt8	1	3
			Δwt8, S531L	12	37

*INH, isoniazid; RIF, rifampin; –, no mutation inside region.

(26.3% where the expected population proportion would be 10%–15%) and the extremely high prevalence of MDR TB in this group (in particular compared with new patients). Also, for new patients, such selection bias might have occurred, for example, because TB patients who were contacts of known or suspected MDR TB patients were preferentially referred to this facility.

Regarding associated mutations, previous studies have shown that ≈95% of resistance mutations to rifampin are associated with the *rpoB* gene mutations, which cluster mainly in the region of codon 507–533. In our study, the distribution of gene mutations among rifampin-resistant isolates was 60.4% Ser531Leu, 18.5% Asp516Val, 3.7% His526Asp, and 2.5% His526Tyr; in 9.9% of cases, the mutation was detected by the absence of the wild-type hybridization signal. This distribution is different from that previously reported, reflecting different distribution of gene mutations associated with rifampin resistance in different geographic locations (6) or different levels of maturation of the MDR TB epidemic. In areas with high MDR TB prevalence and a high proportion of MDR TB cases attributed to transmission, mutations that confer resistance without loss of reproductive fitness will be selected out (7,8).

Whereas 40%–95% of isoniazid-resistant isolates are defined as having high-level drug resistance because of *katG* gene mutations, 75%–90% of which are recognized as mutations in the 315 codon of the *katG* gene, in our study, 57.5% of isoniazid-resistant isolates were associated with mutations in the 315 codon of the *katG* gene. Approximately 8%–43% of isoniazid-resistant isolates are defined as having low-level drug resistance because of mutations in the promoter region of *inhA*. In our study, this proportion was 5.3%. Furthermore, 10%–25% of isoniazid-resistant isolates are thought to have mutations outside the *katG* and *inhA* loci (9–11).

This work was supported by Probitas Foundation. Thanks to the financial support received from Probitas Foundation, it was possible not only to purchase the equipment and reagents to launch the study but to strengthen the capacity of the laboratory and local staff. The funder had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

About the Author

Ms. Rando-Segura is a predoctoral fellow in the Mycobacteriology Unit at the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Her primary research interest is the genetic determinants responsible for antibiotic resistance.

References

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: The Organization; 2016.
- Mauzies HJ, Moalosi G, Anisimova V, Gammimo V, Sentle C, Bachlmer MA, et al. Increase in anti-tuberculosis drug resistance in Botswana: results from the fourth National Drug Resistance Survey. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18:1026–33. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.13.0749>
- Kapata N, Mbulo G, Cobeleus F, de Haas P, Schaap A, Mwamba P, et al. The Second Zambian National Tuberculosis Drug Resistance survey—a comparison of conventional and molecular methods. *Trop Med Int Health*. 2015;20:1492–500. <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.12581>
- National Institute for Communicable Diseases. South African Tuberculosis Drug Resistance Survey 2012–12. Johannesburg (South Africa): The Institute; 2016.
- Fundación PROBITAS. Annual report 2013 [cited 2016 Sep 1]. <http://www.fundacionprobitas.org/documentos/14775454/14952167/annual+report+2013+%28english%29/2594c68b-6489-4044-8f48-3bbca85490c9>
- Zhang L, Ye Y, Duo L, Wang T, Song X, Lu X, et al. Application of genotype MTBDRplus in rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volume laboratory in Southern China.

- Mol Biol Rep. 2011;38:2185–92. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0347-0>
7. Cohen T, Bocerra MC, Murray MB. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. *Microb Drug Resist* 2004;10:280–5. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2004.10.280>
 8. Knight GM, Colijn C, Shrawaha S, Fofana M, Cobelens F, White RG, et al. The distribution of fitness costs of resistance-conferring mutations is a key determinant for the future burden of drug-resistant tuberculosis: a model-based analysis. *Clin Infect Dis* 2015;61(Suppl 3):S147–54. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ579>
 9. Vilcheze C, Jacobs WR Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:35–50. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.111606.122346>
 10. Riccardi G, Pasca MR, Bironi S. *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance and future perspectives. *Future Microbiol* 2009;4:597–614. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.09.20>
 11. Haebón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guarero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2640–9. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00112-06>

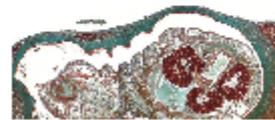
Address for correspondence: Maria Teresa Tortola, Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035, Barcelona, Spain; email: ttortola@vhobron.net

March 2013: Tuberculosis

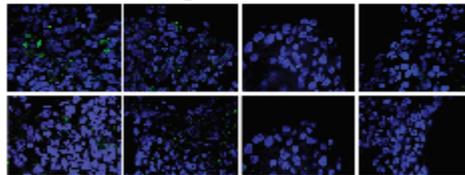


- Measles Elimination Efforts and 2008–2011 Outbreak, France
- Nontuberculous Mycobacterial Infection after Fractionated CO₂ Laser Resurfacing

- Human Betacoronavirus 2c EMC/2012-related Viruses in Bats, Ghana and Europe



- Human Leptospirosis Trends, the Netherlands, 1925–2008
- Parallels in Amphibian and Bat Declines from Pathogenic Fungi
- Increasing *Pneumocystis* Pneumonia, England, UK, 2000–2010
- Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Brazil, 1993–2011
- Tuberculosis and HIV Co-infection, California, 1993–2008
- Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by Using Outbreak Data, United States, 1998–2008
- Treatment Outcomes for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis and HIV Co-infection
- Foodborne Disease Prevention and Broiler Chickens with Reduced *Campylobacter* Infection
- Lack of Norovirus Replication and Histo-Blood Group Antigen Expression in 3-Dimensional Intestinal Epithelial Cells
- Effects of Vaccine Program against Pandemic Influenza A(H1N1) Virus, United States, 2009–2010
- Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa
- Mycobacterial Lineages Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis, Ethiopia
- Swine Influenza in Sri Lanka
- Unexpected Increase of Alveolar Echinococcosis, Austria, 2011
- *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 Serogroups and Cholera-like Diarrhea, Kolkata, India
- Hepatitis E Virus Mixed Infection in Immunocompetent Patient
- Virulence of Pertactin-Negative *Bordetella pertussis* Isolates from Infants, France
- Multidrug-Resistant Tuberculosis, Somalia, 2010–2011
- Swine Influenza in Sri Lanka Tuberculosis Outbreak in a Primary School, Milan, Italy
- Lymphogranuloma Venereum in Men Screened for Pharyngeal and Rectal Infection, Germany
- Prioritizing Tuberculosis Clusters by Genotype for Public Health Action, Washington



EMERGING INFECTIOUS DISEASES <https://wwwnc.cdc.gov/eid/articles/issue/19/3/table-of-contents>

Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a Rural Setting, Angola

Technical Appendix

Technical Appendix Table 1. Sociodemographic characteristics of study participants diagnosed with pulmonary TB in Cubal, Angola, April 2014–July 2015

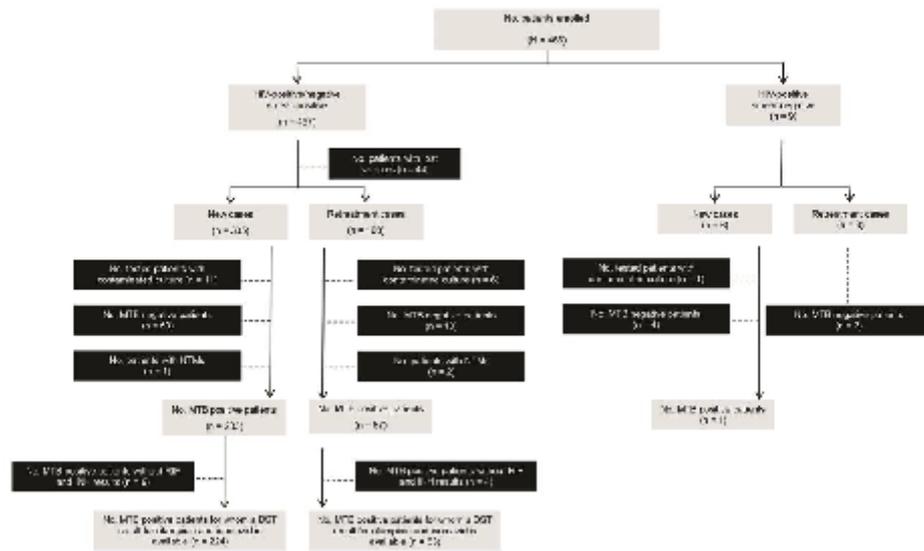
Characteristic		New cases (n = 311)		Retreatment cases (n = 111)	
		Confirmed TB (n = 225)	Suspected TB (n = 86)	Confirmed TB (n = 83)	Suspected TB (n = 28)
Age	Median (IRC)	28.5 (IRC: 23.5–38.5)	32.5 (IRC: 23.5–43.3)	30.5 (IRC: 25.0–35.5)	29.5 (IRC: 24.8–42.0)
Sex	Male	145 (64.4%)	53 (61.6%)	47 (56.6%)	16 (57.1%)
	Female	80 (35.6%)	33 (38.4%)	36 (43.4%)	12 (42.9%)
HIV	Positive	12 (5.3%)	8 (9.3%)	4 (4.8%)	4 (14.3%)
	Negative	210 (93.3%)	77 (89.5%)	79 (95.2%)	24 (85.7%)
AFB/ smear	Negative	6 (2.7%)	27 (31.4%)	5 (6.0%)	8 (28.6%)
	Low burden	25 (11.1%)	28 (32.6%)	7 (8.4%)	8 (28.6%)
	High burden	194 (86.2%)	31 (36.0%)	71 (85.5%)	12 (42.9%)

Abbreviations: AFB = acid fast bacilli. Definitions: "Low burden" were defined as patients with 1–9 AFB / 100 fields or 10–99 AFB / 100 fields. "High burden" were defined as patients with 1–10 AFB / field or >10 AFB / field.

Technical Appendix Table 2. Resistance to second-line anti-tuberculosis drugs among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates, Cubal, Angola, April 2014–July 2015

Phenotypic drug susceptibility	Isolates from new cases (n = 18)		Isolates from retreatment cases (n = 59)	
	No.	% (95 CI)	No.	% (95 CI)
Susceptible	16	83.3 (60.8 – 94.2)	50	84.7 (73.5 – 91.8)
Any resistance to FQ †	0	0.0 (0.0 – 17.6)*	0	0.0 (0.0 – 6.1)*
Any resistance to 2LJ ‡	2	16.7 (5.8 – 39.2)	9	15.3 (8.2 – 26.5)
Any resistance to both FQ † and 2LJ ‡ (XDR-TB)	0	0.0 (0.0 – 17.6)*	0	0.0 (0.0 – 6.1)*

Abbreviations: FQ = fluoroquinolones; 2LJ = second line injectable drugs; XDR = extensively drug resistant. (†) Drugs tested: ofloxacin at 2.0 µg/ml and moxifloxacin at 0.25 µg/ml. (‡) Drugs tested: amikacin at 1.0 µg/ml and capreomycin at 2.5 µg/ml. (*) one-sided, 97.5% confidence interval.



Technical Appendix Figure. Schematic overview of the study, Cubal, Angola, April 2014–July 2015.

Prevalence and risk factors of multidrug-resistant tuberculosis in Cubal, Angola: a prospective cohort study

M. L. Aznar,^{*†} A. Rando-Segura,^{*††} M. M. Moreno,[†] M. E. Soley,[‡] E. S. Igual,[‡] C. Bocanegra,^{*†}
E. G. Olivas,[†] A. Ninda Eugénio,[†] A. Zacarias,[†] D. Kafimba,[†] E. Gabriel,[†] J. Mendioroz,[‡]
M. T. López García,[†] T. P. Suñe,[‡] M. T. Tórtola Fernández,[‡] I. Molina Romero^{*}

^{*}Infectious Disease Department, Vall d'Hebron University Hospital, Programa de Salut Internacional de l'Institut Català de la Salut Barcelona, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; [†]Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola; [‡]Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Programme de Salut Internacional de l'Institut Català de la Salut Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, [§]Support Research Unit, Territorial Health Management of Central Catalonia, Barcelona, Spain

SUMMARY

BACKGROUND: Although the Republic of Angola is one of the 14 countries figuring in the three high tuberculosis (TB) burden country lists, the true multidrug-resistant TB (MDR-TB) situation is unknown.

MATERIAL AND METHODS: Patients aged ≥ 16 years with a diagnosis of pulmonary TB were prospectively enrolled from June 2014 to July 2015. Sputum samples were collected for culture and drug susceptibility testing in all patients, and for Xpert[®] MTB/RIF testing in all previously treated patients and in new patients whose sputum remained smear-positive after 2 months of treatment.

RESULTS: A total of 422 patients were included; *Mycobacterium tuberculosis* was isolated in 308 sputum samples. The prevalence of MDR-TB was 8.0%

(18/225) in new patients and 71.1% (59/83) in previously treated patients. Male sex (OR 2.95, 95%CI 1.35–6.44, $P=0.007$), previous anti-tuberculosis treatment (OR 20.86, 95%CI 9.53–45.67, $P<0.001$), presence of pleural thickening (OR 7.68, 95%CI 1.57–37.43, $P=0.012$) and duration of illness >4 months (OR 3.34, 95%CI 1.45–7.69, $P=0.005$) were independent risk factors for MDR-TB.

CONCLUSIONS: The prevalence of MDR-TB in Cubal, Angola, was higher than estimated by the World Health Organization for Angola and one of the highest worldwide. Facilities to diagnose and treat MDR-TB are urgently needed in Angola.

KEY WORDS: Xpert MTB/RIF; treatment outcomes; Africa; rural setting

TUBERCULOSIS (TB) REMAINS a major cause of morbidity and mortality worldwide, particularly in Asia and sub-Saharan Africa.¹ Multidrug-resistant TB (MDR-TB) is particularly difficult to treat. According to the World Health Organization (WHO) 2017 global tuberculosis report, an estimated 4.1% of new TB cases and 19% of previously treated cases have MDR-TB.²

The Republic of Angola is one of the 14 countries figuring in the WHO's three high TB burden country lists.² The estimated annual incidence of TB, including human immunodeficiency virus (HIV) infected cases, is 370 per 100 000 population (95% confidence interval [CI] 230–543), with 54% of notified pulmonary TB cases bacteriologically confirmed.³ The WHO estimates that 2.6% of new cases and 18% of previously treated cases are MDR-TB;² however,

the real situation of MDR-TB is not known. According to the 2017 WHO global report, the Republic of Angola is one of the three countries among the 30 high TB and MDR-TB burden countries in which a drug resistance survey has never been conducted.² Moreover, access to rapid diagnosis of TB and rifampicin (RMP) resistance was absent throughout the country when the study was conducted, while treatment for MDR-TB was available only in a single clinic in Luanda, Angola, and in Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP), Cubal, in South-East Angola, since May 2013.

HNSP is a reference centre for the diagnosis and treatment of TB.⁴ Due to the absence of data on MDR-TB, we implemented the first Xpert[®] MTB/RIF testing (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) in Angola at the HNSP.

The objectives of the present study were to assess the prevalence of and risk factors for MDR-TB in a cohort of patients treated at the HNSP, to determine

MLA and ARS were co-principal investigators.

Correspondence to: María Luisa Aznar Ruiz de Alegria, Infectious Disease Department, Vall d'Hebron University Hospital, Address: Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain. e-mail: maznarru@gmail.com
Article submitted 23 March 2018. Final version accepted 14 July 2018.

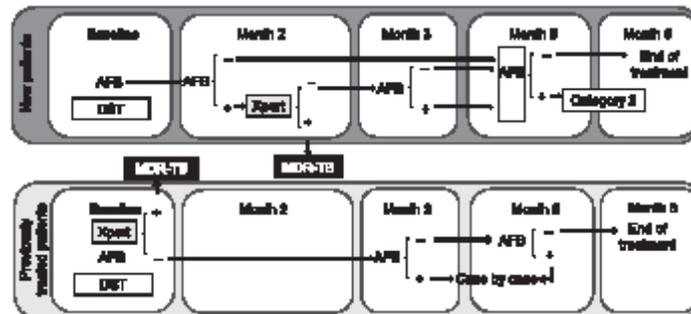


Figure 1 Flow chart of new and previously treated patients. AFB = acid-fast bacilli; DST = drug susceptibility testing; – = negative; + = positive; MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis.

the usefulness of Xpert testing and to describe the outcomes of TB patients.

METHODS

Study design

This prospective cohort study was conducted at the HNSP from June 2014 to July 2015. The study protocol was approved by the Vall d'Hebron Research Institute Ethics Committee, Barcelona, Spain; Angolan National Tuberculosis Programme, Luanda; and the University of Katyavala Bwila Ethics Committee, Benguela, Angola. Participation was voluntary, and written informed consent was required for study inclusion. All patients aged ≥ 16 years with a diagnosis of pulmonary TB based on smear-positive sputum were consecutively enrolled.

Data collection

Sociodemographic characteristics, symptoms, illness duration and treatment history were recorded. The case definitions and classifications used in the present study are consistent with the 2013 WHO revised TB definitions and reporting framework.⁵ All patients were offered HIV testing. Chest X-ray (CXR) was performed before starting treatment.

Sputum collection

Standard volumes of sputum samples were collected from all patients in a plastic container at the time of diagnosis. The containers were stored at -80°C and periodically transported to the Microbiology Department of Vall d'Hebron University Hospital in Barcelona, Spain, for culture and drug susceptibility testing (DST). Sputum samples were collected for Xpert at the time of diagnosis in previously treated patients and after 2 months of treatment in new patients whose sputum remained acid-fast bacilli (AFB) positive. A detailed description of microbiological techniques has been previously described by our research team.⁶ The patient flow chart is given in Figure 1.

Treatment and follow-up

We followed national guidelines to treat patients diagnosed with TB.⁷ New patients were started on first-line treatment consisting of 2 months of RMP, isoniazid (INH), ethambutol (EMB) and pyrazinamide (PZA), followed by 4 months of RMP and INH. Previously treated patients without RMP resistance detected on Xpert were started on WHO Category 2 treatment, i.e., 2 months of RMP, INH, ethionamide (ETH), PZA and streptomycin (SM) + 1 month of RMP, INH, ETH and PZA + 5 months of RMP, INH and ETH. If RMP resistance was detected on Xpert, an MDR-TB treatment regimen containing EMB, ETH, cycloserine (CS), ofloxacin (OFX) and a second-line injectable drug (kanamycin, capreomycin or amikacin, depending on availability from the national programme) for 8 months was initiated, followed by 12 months of EMB, ETH, CS and OFX. Directly observed treatment (DOT) was performed in all patients undergoing MDR-TB treatment during the first 8 months and during the first 2 months in patients receiving first-line and Category 2 treatment. Drugs were subsequently provided every month for all patients, and a relative was made responsible for providing community DOT. Sputum samples were collected from patients receiving first-line and Category 2 treatment at 2–3 months, 5 months and at the end of the treatment, and monthly in patients on MDR-TB treatment. If follow-up appointments were missed, a nurse attempted to contact the patient twice by telephone and/or a community health worker tried to locate the patient. If these efforts were unsuccessful, patient outcome was defined as lost to follow-up (LTFU). Treatment outcomes were based on 2013 WHO recommendations.⁵ Due to the limited budget, we could not perform follow-up culture, and treatment outcomes were based on smear results. A successful outcome included patients who met the definition of cure or treatment complete. Treatment outcomes were evaluated in September 2017.

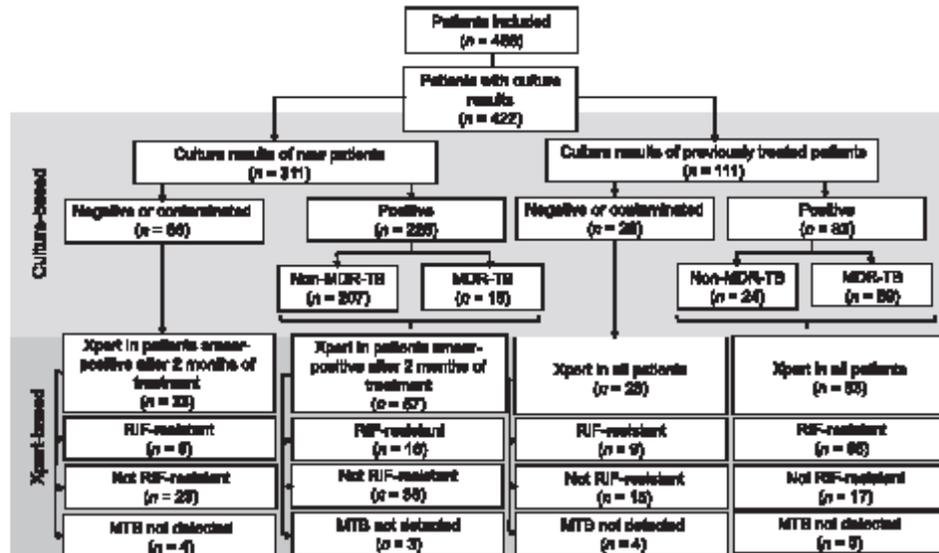


Figure 2 Culture and Xpert® MTB/RIF results in new and previously treated patients. MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis; RIF = rifampicin; MTB = *M. tuberculosis*.

Data analysis

Data analysis was only performed in patients with a sputum culture result. Descriptive statistics are presented as number (percentage) and median (interquartile range [IQR]) or mean (standard deviation [SD]), depending on variable normality. Univariate logistic regression models were used to calculate unadjusted odds ratios (ORs) to determine the risk of MDR-TB and treatment outcomes. Variables with a significance of $P < 0.05$ on univariate analysis and variables considered to be clinically important were included in the multivariate logistic regression analysis. Treatment outcomes and risk factors for MDR-TB were only analysed in patients with *M. tuberculosis* complex (MTC) isolated in their sputum. For treatment outcomes, we performed both a per-protocol (PP) analysis (excluding patients who did not complete treatment) and an intention-to-treat (ITT) analysis (including patients who did not complete treatment as unsuccessful outcome). Two-sided $P < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses. Analyses were performed using SPSS v23 (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTS

Of the 468 patients included in the study, culture results were available for 422. Two hundred and sixty (61.6%) were male, and the mean age was 32.3 years (SD 12.2). HIV co-infection was detected in 28

(6.6%) patients. There were 311 (73.7%) new patients. A median of two TB treatments had been received before the current episode (IQR 1–2). Two hundred and twenty-five new cases and 83 previously treated cases were sputum culture-positive. The demographics and clinical characteristics of culture-positive patients are shown in Appendix Table A.1.

Prevalence of multidrug-resistant tuberculosis

MDR-TB was diagnosed in respectively 59/83 (71.1%) and 18/225 (8.0%) sputum samples from previously treated and new patients. Using Xpert, 75/111 (67.6%) sputum samples from previously treated patients and 22/90 (24.4%) new patients with a positive smear after 2 months of anti-tuberculosis treatment were RMP-resistant (Figure 2).

Correlation between Xpert and drug susceptibility testing

Xpert detected *M. tuberculosis* in 33/38 (86.8%) sputum samples for which culture results were negative. Of 11 sputum samples, 3 (27.3%) were culture-positive for *M. tuberculosis*; however, *M. tuberculosis* was not detected using Xpert. All three samples were from new patients after 2 months of treatment (Table 1). The correlation between Xpert and DST is shown in Tables 2 and 3.

Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis

In the multivariate analysis, male sex (OR 2.95,

Table 1 Xpert® MTB/RIF assay and conventional DST results among mycobacterial culture-positive sputum samples

Xpert	Culture- and DST-based results							
	New cases who were smear-positive at 2 months of treatment (n = 90)				Retreatment cases (n = 111)			
	RMP ^S	RMP ^R	Negative	Contaminated	RMP ^S	RMP ^R	Negative	Contaminated
RMP ^S	38	0	15	8	16	1	8	7
RMP ^R	1	15	5	1	6	60	5	4
No <i>M. tuberculosis</i>	3	0	2	2	0	0	3	1

DST = drug susceptibility testing; RMP = rifampicin; RMP^R = RMP-resistant; RMP^S = RMP-susceptible.

95%CI 1.35–6.44, $P = 0.007$), previous treatment (OR 20.86, 95%CI 9.53–45.67, $P < 0.001$), pleural thickening (OR 7.68, 95%CI 1.57–37.43, $P = 0.012$) and duration of illness >4 months (OR 3.34, 95%CI 1.45–7.69, $P = 0.005$) were independent risk factors for MDR-TB (Appendix Table A.2).

Clinical and microbiological outcomes

At the end of treatment, 159/231 (68.8%) patients with non-MDR-TB had treatment success, 49/231 (21.2%) were LTFU, 7/231 (3.0%) experienced treatment failure, 14/231 (6.1%) died and 2/231 (0.9%) were transferred to other institutions. Of 77 patients with MDR-TB, 35 (45.5%) experienced treatment success, 27 (35.1%) were LTFU, 1 (1.3%) experienced failure and 14 (18.2%) died. The demographic and clinical characteristics related to successful and unsuccessful treatment outcomes are given in Appendix Tables A.3 and A.4. In ITT and PP multivariate analysis, patients infected with non-MDR-TB who did not achieve a successful treatment outcome were more likely to be sputum AFB-positive after 2 months of treatment (respectively OR 2.87, 95%CI 1.34–6.14, $P = 0.007$ and OR 10.58, 95%CI 2.54–44.11, $P = 0.001$).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first prospective cohort study reporting data on the prevalence of and risk factors for MDR-TB in Angola. It is also the first study to use Xpert testing for TB diagnosis in this setting. The proportion of MDR-TB was 71.1% in previously treated patients and 8% in new patients. This prevalence is much higher than estimated by the WHO,⁸ and it would rank Angola first in terms of MDR-TB among previously treated patients.⁹

MDR-TB prevalence in high TB burden sub-Saharan countries varies from 2% to 6.6% in new patients and 4.6% to 15% in previously treated patients.^{10–12} The high MDR-TB prevalence found in our study may have been due to the availability of MDR-TB treatment at the HNSP during the study period, which may have led to more referrals of patients with previous treatment failure. However, if only patients from Cubal are taken into account, 5.2% of new and 42.2% of previously treated patients had MDR-TB. It is also possible that the long civil war that devastated the country for 27 years and which hindered the development of health programmes¹³ was related to the high prevalence.

The usefulness of the Xpert test in the field is well-known.^{14–16} In our study, the accuracy of Xpert in predicting RMP resistance was comparable to that reported previously. One sample was found to be RMP-susceptible on Xpert but RMP-resistant on culture + DST. Although 95–97% of RMP-resistant *M. tuberculosis* samples harbour mutations in the RMP resistance-determining region of *rpoB* as detected using Xpert, other mechanisms conferring RMP resistance have been reported.¹⁷ Moreover, samples with mixed populations of RMP-susceptible and RMP-resistant bacilli may also cause false-negative results on Xpert.¹⁸ In contrast, silent mutations or mutations conferring low resistance to RMP detected on Xpert but missed by conventional DST have also been reported.¹⁹ This phenomenon could explain the six cases classified as RMP-resistant on Xpert but RMP-susceptible on culture + DST. *M. tuberculosis* was detected using Xpert in 33/38 sputum samples that were culture-negative. False-positive results on Xpert have been related to previous TB, low

Table 2 Test characteristics of Xpert for the detection of *M. tuberculosis* compared with culture, the gold standard

	Sensitivity % (95%CI)	Specificity % (95%CI)	PPV % (95%CI)	NPV % (95%CI)
Overall	97.9 (95.4–100)	13.2 (3.5–27.2)	80.7 (74.3–86.7)	62.5 (28.2–100)
New cases who were smear-positive after 2 months of treatment	94.7 (88.8–100)	9.1 (0–22.1)	73.0 (62.6–83.3)	40.0 (0–100)
Retreatment cases	100	18.7 (0–40.2)	86.5 (79.5–93.4)	100

CI = confidence interval; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value.

Table 3 Test characteristics of Xpert for detection of rifampicin resistance compared with culture, the gold standard

	Sensitivity % (95%CI)	Specificity % (95%CI)	PPV % (95%CI)	NPV % (95%CI)
Overall	98.7 (96.8–100)	88.7 (83.4–94.0)	91.5 (86.8–96.1)	98.2 (96–100)
New cases who were smear-positive after 2 months of treatment	100	97.5 (93.4–100)	93.8 (87.4–100)	100
Retreatment cases	98.4 (91.3–99.7)	72.7 (63.1–82.3)	90.9 (84.7–97.1)	94.1 (89.1–99.2)

CI – confidence interval; PPV – positive predictive value; NPV – negative predictive value.

mycobacterial DNA load and a CXR not compatible with active TB.²⁰ However, as all patients who were Xpert-positive, culture-negative in our study had symptoms suggestive of TB, we strongly believe that these patients were true TB cases. Because mycobacterial culture viability declines with time,²¹ the considerable distance to the reference laboratory may have affected our culture results. Conversely, Xpert failed to detect TB in samples collected after 2 months of treatment in three new patients whose sputum were initially culture-positive for TB. Although it has been reported that sputum samples evaluated using Xpert may remain positive for several months during treatment,²² it is also well known that a low bacillary load may reduce Xpert sensitivity,²³ and this may explain the Xpert-negative result in these three cases.

We observed that male sex, previous anti-tuberculosis treatment, presence of pleural thickening and duration of illness were independent risk factors for MDR-TB. Previous treatment has been consistently identified as a risk factor for MDR-TB.^{24,25} Being male appears to be associated with a higher risk of MDR-TB;²⁶ however, studies are not consistent, and the WHO suggests that the overall risk of MDR-TB is not influenced by sex.⁹ Duration of illness >60 days, sputum AFB smear score >3+ and the presence of cavities on CXR have also been recently associated with MDR-TB.²⁷ Although we observed a relationship between sputum AFB smear >3+ and presence of cavities on CXR and MDR-TB in the univariate analysis, no association was observed in the multivariate model. High rates of sputum smear positivity are associated with chest cavities,²⁸ and this association may overestimate the relationship between these two variables and MDR-TB if they are analysed together. In contrast, we observed that pleural thickening was related to MDR-TB. One possible explanation is that pleural thickening was related to a remote history of TB, and the patient may not have remembered being treated for it. HIV co-infection has also been reported to be a risk factor for MDR-TB; however, this association is not consistent in the literature.^{29,30} We did not find a relationship between HIV infection and MDR-TB.

With regard to treatment outcomes, we observed that respectively 68.8% and 45.5% of patients infected with non-MDR-TB and MDR-TB achieved

a successful outcome. These outcome results fall below WHO targets,³¹ but are similar to those for other sub-Saharan African countries.² A positive AFB smear after 2 months of anti-tuberculosis treatment was found to be a risk factor for an unfavourable outcome in patients with non-MDR-TB. This fact has been related to lung cavities,³² bilateral involvement of the lungs³³ and high pre-treatment smear grade.³⁴ We also observed that people aged <20 years were more likely to achieve a successful outcome, a fact that has been reported previously.³⁵ In patients with MDR-TB, we did not observe a relationship between the variables analysed and unsuccessful outcomes. This was probably due to the small number of patients included in the analysis.

Our study had four main limitations. First, cure criteria were based on smear microscopy rather than culture. This limitation reflects the reality of TB diagnosis and management in many resource-poor settings. Second, we performed Xpert exclusively in previously treated patients and in new patients who were smear-positive after 2 months of treatment, and not in all patients. The rationale for this strategy was to be able to reach the largest population with limited resources, thereby prioritising the population at greater risk of MDR-TB. Third, some study culture samples were negative or contaminated. Although this is a frequent problem when shipping samples over long distances, we need to reinforce storage and sample transportation in further studies. Fourth, as we only included smear-positive patients aged ≥16 years, our study may not be representative of the entire population. Furthermore, as HNRP is a specialised referral centre for TB, it may not represent the reality in other settings in Angola.

In conclusion, we observed that MDR-TB prevalence in Cubal, a rural setting in South-West Angola, was higher than estimated by the WHO and one of the highest worldwide. Facilities to diagnose and treat MDR-TB are therefore urgently needed in Angola.

Acknowledgements

This work was supported by Probitas Foundation, Barcelona, Spain. The funder had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest: none declared.

References

- Lawn SD, Zumla A I. Tuberculosis. *Lancet*. 2011; 378: 57-72.
- World Health Organization. Global tuberculosis report, 2017. WHO/HTM/TB/2017.23. Geneva, Switzerland: WHO, 2017
- World Health Organization. Tuberculosis country profile of Angola. Geneva, Switzerland: WHO, 2017.
- López T, Moreno M, Salvador F, et al. Tuberculosis diagnosed in a rural setting in Angola. Accuracy of follow-up sputum smears to predict outcome. *Pathog Glob Health* 2013; 107: 5-10.
- World Health Organization. WHO revised definitions and reporting framework for tuberculosis. *Euro Surveill* 2013; 18: 20455.
- Rando-Segura A, Aznar M L, Moreno M M, et al. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a rural setting, Angola. *Emerg Infect Dis* 2018; 24: 569-572.
- Angola Ministry of Health. Summary of Strategic Plan of the National TB Control Program. Luanda, Angola: MoH, 2008.
- World Health Organization. Tuberculosis country profile of Angola. Geneva, Switzerland: WHO, 2015.
- World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3. Geneva, Switzerland: WHO, 2010.
- Musa B M, Adamu A L, Galadanci N A, Zubayr B, Odoh C N, Aliyu M H. Trends in prevalence of multidrug-resistant tuberculosis in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 2017; 12: e0185105.
- Eshete S, Gizachew M, Dagnew M, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in Ethiopian settings and its association with previous history of anti-tuberculosis treatment: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 219.
- Samo Gudo P, Cuna Z, Coelho E, et al. Is multidrug-resistant tuberculosis on the rise in Mozambique? Results of a national drug resistance survey. *Eur Respir J* 2011; 38: 222-224.
- Agadjanian V, Prata N. Civil war and child health: regional and ethnic dimensions of child immunization and malnutrition in Angola. *Soc Sci Med* 2003; 56: 2515-2527.
- Ardizzone E, Fajardo E, Saranchuk P, et al. Implementing the Xpert® MTB/RIF diagnostic test for tuberculosis and rifampicin resistance: outcomes and lessons learned in 18 countries. *PLOS ONE* 2015; 10: e0144656.
- Cox H S, Mbhele S, Mohess N, et al. Impact of Xpert MTB/RIF for TB diagnosis in a primary care clinic with high TB and HIV prevalence in South Africa: a pragmatic randomised trial. *PLOS Med* 2014; 11: e1001760.
- Rabna P, Ramos J, Ponce G, et al. Direct detection by the Xpert MTB/RIF assay and characterization of multi and poly drug-resistant tuberculosis in Guinea-Bissau, West Africa. *PLOS ONE* 2015; 10: e0127536.
- Telemi A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341: 647-650.
- Zetola N M, Shin S S, Tumedji K A, et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 2422-2429.
- Mokaddas E, Ahmad S, Eldeen H S, Al-Mutairi N. Discordance between Xpert MTB/RIF assay and BACTEC MGIT 960 Culture System for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a country with a low tuberculosis (TB) incidence. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 1351-1354.
- Theron G, Venter R, Smith L, et al. False-positive Xpert MTB/RIF results in re-tested patients with previous tuberculosis: frequency, profile, and prospective clinical outcomes. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01696-17.
- Banda HT, Harries A D, Boeree M J, Nyirenda T E, Banerjee A, Salaniponi F M. Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 272-274.
- Friedrich S O, Rachow A, Saathoff E, et al. Assessment of the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF assay as an early sputum biomarker of response to tuberculosis treatment. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 462-470.
- Boehme C C, Nicol M P, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet* 2011; 377: 1495-1505.
- Faustini A, Hall A J, Perucci C A. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 2006; 61: 158-163.
- Mekonnen F, Tessema B, Moges F, Gelaw A, Eshete S, Kumeru G. Multidrug resistant tuberculosis: prevalence and risk factors in districts of Metema and West Armachifo, Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 461.
- Bantubani N, Kabera G, Connolly C, et al. High rates of potentially infectious tuberculosis and multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) among hospital inpatients in KwaZulu Natal, South Africa indicate risk of nosocomial transmission. *PLOS ONE* 2014; 9: e90868.
- Chuchottaworn C, Thanachartwet V, Sangsuyunth P, et al. Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis among patients with pulmonary tuberculosis at the Central Chest Institute of Thailand. *PLOS ONE* 2015; 10: e0139986.
- Goswami A, Chakraborty U, Mahapatra T, et al. Correlates of treatment outcomes and drug resistance among pulmonary tuberculosis patients attending tertiary care hospitals of Kolkata, India. *PLOS ONE* 2014; 9: e109563.
- Rockwood N, Abdullahi L H, Wilkinson R J, Meinjes G. Risk factors for acquired rifampicin and isoniazid resistance: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 2015; 10: e0139017.
- Mesfin Y M, Hailemariam D, Biadgilign S, Biadgilign S, Kibret K T. Association between HIV/AIDS and multidrug resistance tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 2014; 9: e82235.
- World Health Organization. Implementing the end TB strategy: the essentials. WHO/HTM/TB/2015.31. Geneva, Switzerland: WHO, 2015.
- Parikh R, Nataraj G, Kanade S, Khatri V, Mehta P. Time to sputum conversion in smear-positive pulmonary TB patients on category I DOTS and factors delaying it. *J Assoc Physicians India* 2012; 60: 22-26.
- Gaetano Mota P, Carvalho A, Valente I, Braga R, Duarte R. Predictors of delayed sputum smear and culture conversion among a Portuguese population with pulmonary tuberculosis. *Rev Port Pneumol* 2012; 18: 72-79.
- Lee J, Lee B J, Yoon H I, Lee C T, Lee J H. Influence of previous tuberculosis treatment history on acid-fast bacilli smear and culture conversion. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16: 1344-1348.
- Biez-Saldaña R, Delgado-Sánchez G, García-García L, et al. Isoniazid mono-resistant tuberculosis: impact on treatment outcome and survival of pulmonary tuberculosis patients in Southern Mexico 1995-2010. *PLOS ONE* 2016; 11: e0168955.

APPENDIX

Table A.1 Demographics and clinical characteristics of patients culture-positive for *M. tuberculosis*

	New patients (n = 225) n/N (%)	Previously treated patients (n = 83) n/N (%)	P value
Male sex	145 (64.4)	47 (56.6)	0.209
Age, years, median [IQR]	28 [23–38]	30 [24–35]	0.477
Place of residence			
Cubal	154 (71.0)	32 (38.6)	<0.001
<50 km from Cubal*	35 (16.1)	12 (14.5)	
>50 km from Cubal†	28 (12.9)	39 (47)	
HIV infection	12/222 (5.4)	4/83 (4.8)	1.000
Clinical signs			
Cough	215/215 (100)	77/77 (100)	
Fever	197/215 (91.6)	68/78 (87.2)	0.252
Haemoptysis	25/204 (12.3)	14/77 (18.2)	0.200
BMI, kg/m ² , median [IQR]	16.9 [15.6–18.7]	16.1 [14.9–18.4]	0.030
Duration of illness, months, median [IQR]	3 [2–5.7]	12 [6–24]	<0.001
Radiological findings, cm			
Cavitation			
Any size	29/215 (13.5)	22/78 (28.2)	0.005
≥5 cm	18/215 (8.4)	16/78 (20.5)	0.004
<5 cm	11/215 (5.1)	6/78 (7.7)	0.404
Lung infiltrates	120/215 (55.8)	47/78 (60.3)	0.497
Pleural thickening	5/215 (2.3)	8/78 (10.3)	0.004
Miliary TB	9/215 (4.2)	0/78 (0)	0.119
Pleural effusion	4/215 (1.9)	5/78 (6.4)	0.060
Drug susceptibility			
Susceptible to all first-line drugs	167/225 (74.2)	14/83 (16.9)	<0.001
Resistance to one drug	31/225 (13.8)	7/83 (8.4)	0.206
RMP only	1 (3.2)	2 (28.6)	
INH only	21 (67.7)	4 (57.1)	
SM only	8 (25.8)	1 (14.3)	
PZA only	1 (3.2)	0 (0)	
Total polydrug resistance	9/225 (4.0)	3/83 (3.6)	1.000
INH+SM	5 (55.5)	0 (0)	
INH+PZA	2 (22.2)	0 (0)	
INH+EMB	1 (11.1)	0 (0)	
INH+SM+PZA	0	2 (66.6)	
INH+SM+EMB	0	1 (33.3)	
RMP+SM+PZA	1 (11.1)	0	
MDR-TB	18/225 (8.0)	59/83 (71.1)	<0.001

* Includes the cities of Calimambo and Ganda.

† Includes the cities of Benguela, Lobito, Bahía Farta, Chongoroi and Catumbela.

IQR – interquartile range; HIV – human immunodeficiency virus; BMI – body mass index; TB – tuberculosis; RMP – rifampicin; INH – isoniazid; SM – streptomycin; PZA – pyrazinamide; EMB – ethambutol; MDR-TB – multidrug-resistant TB.

Table A.2 Risk factors associated with MDR-TB

	No MDR-TB (n = 231) n (%)	MDR-TB (n = 77) n (%)	P value	Univariate analysis		Multivariate analysis	
				OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value
Male sex	77 (33.3)	39 (50.6)	0.007	2.05 (1.22–3.47)	0.007	2.95 (1.35–6.44)	0.007
Previous anti-tuberculosis treatment	24 (10.3)	59 (76.6)	<0.001	28.41 (14.45–55.85)	<0.001	20.86 (9.53–45.67)	<0.001
Age, years							
<20	34 (14.8)	7 (9.1)	0.241	0.58 (0.24–1.36)	0.208		
20–40	147 (63.9)	57 (74)		1.61 (0.90–2.86)	0.106		
>40	49 (21.3)	13 (16.9)		0.75 (0.38–1.47)	0.404		
Chest X-ray							
Cavity >5 cm	18 (8.2)	16 (21.9)	0.001	3.15 (1.51–6.57)	0.002	1.38 (0.46–4.15)	0.565
Pleural thickening	3 (1.4)	10 (13.7)	<0.001	11.48 (3.07–42.99)	<0.001	7.68 (1.57–37.43)	0.012
Pleural effusion	6 (2.7)	3 (4.1)	0.695	1.53 (0.37–6.27)	0.556		
AFB >3+	117 (50.9)	28 (36.4)	0.027	0.55 (0.32–0.93)	0.028	1.29 (0.61–2.73)	0.500
HIV-infected	14 (6.1)	2 (2.6)	0.374	0.41 (0.09–1.84)	0.242		
Duration of illness >4 months	88 (38.1)	62 (80.5)	<0.001	6.72 (3.60–12.53)	<0.001	3.34 (1.45–7.69)	0.005
BMI <18.5	133 (57.6)	50 (64.9)	0.255	1.36 (0.80–2.33)	0.256		

MDR-TB – multidrug-resistant tuberculosis; OR – odds ratio; CI – confidence interval; AFB – acid fast bacilli; HIV – human immunodeficiency virus; BMI – body mass index.

Table A.3 Demographic and clinical characteristics related with successful and unsuccessful treatment outcome in patients with non-MDR-TB (intention-to-treat and per-protocol analysis)

	Successful outcome (n = 159)	Unsuccessful outcome (per-protocol analysis) (n = 21)	Unsuccessful outcome (intention-to-treat) (n = 72)	Per-protocol				Intention-to-treat			
				Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
				OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value
Male sex	103 (64.8)	16 (76.2)	51 (70.8)	1.74 (0.60-5.00)	0.304			1.32 (0.72-2.41)	0.367		
Age, years											
<20	29 (18.2)	1 (4.8)	5 (7)	0.22 (0.09-1.74)	0.152			0.34 (0.13-0.92)	0.033		0.27 (0.07-0.97) 0.046
20-40	95 (59.7)	16 (76.2)	52 (73.2)	2.16 (0.75-6.18)	0.153			1.84 (0.99-3.41)	0.051		
>40	35 (22.0)	4 (19.0)	14 (19.7)	0.76 (0.26-2.64)	0.757			0.87 (0.43-1.74)	0.695		
Place of residence											
Cubal	112 (72.3)	16 (76.2)	44 (62)	1.22 (0.42-3.95)	0.705			0.63 (0.34-1.13)	0.122		1.43 (0.68-3.01) 0.339
<50 km from Cubal*	24 (15.5)	3 (14.3)	13 (18.3)	0.91 (0.25-3.33)	0.886			1.22 (0.58-2.57)	0.594		
>50 km from Cubal*	19 (12.3)	2 (9.5)	14 (19.7)	0.75 (0.16-3.49)	0.718			1.76 (0.82-3.75)	0.144		
AFB >3+	76 (47.8)	10 (47.6)	41 (57.7)	0.99 (0.40-2.47)	0.993			1.49 (0.85-2.62)	0.164		
HIV-infected	9 (5.7)	3 (14.3)	5 (7.1)	2.76 (0.68-11.13)	0.154			1.27 (0.41-3.95)	0.675		
BMI <18.5 kg/m ²	88 (55.3)	15 (71.4)	45 (62.5)	2.01 (0.74-5.47)	0.168			1.34 (0.76-2.38)	0.309		0.97 (0.48-1.94) 0.925
Duration of illness >4 months	57 (35.8)	9 (42.9)	31 (43.1)	1.34 (0.53-3.38)	0.532			1.35 (0.77-2.39)	0.297		
Cavities >5 cm	12 (7.8)	2 (9.5)	6 (8)	1.24 (0.26-5.95)	0.791			1.16 (0.41-3.22)	0.782		
Previous anti-tuberculosis treatment	13 (8.2)	7 (33.3)	11 (15.3)	5.61 (1.39-16.37)	0.002			2.02 (0.86-4.77)	0.106		
AFB-positive at month 2 or 3*	26 (17.1)	7 (70.0)	19 (26.5)	10.33 (2.51-42.46)	0.001		10.58 (2.54-44.11) 0.001	2.88 (1.42-5.84)	0.003		2.87 (1.34-6.14) 0.007
INH resistance	22 (13.8)	5 (23.8)	14 (19.4)	1.95 (0.65-5.85)	0.236			1.50 (0.72-3.14)	0.278		1.56 (0.61-3.98) 0.354
TB treatment											
Category 1	145 (91.2)	14 (66.7)	61 (84.7)	0.19 (0.07-0.56)	0.002			0.53 (0.23-1.25)	0.147		0.54 (0.13-2.29) 0.407
Category 2	9 (5.7)	4 (19.0)	7 (9.7)	3.92 (1.09-14.12)	0.036			1.79 (0.64-5.03)	0.266		
Second-line	5 (3.1)	3 (14.3)	4 (5.6)	5.13 (1.13-23.29)	0.034			1.81 (0.47-6.96)	0.387		

*Includes the cities of Calimambo and Ganda.

*Includes the cities of Benguela, Lubito, Bahía Farta, Chongol and Carumbela.

*AFB performed at month 2 in patients who received first-line treatment and at month 3 in those who received Category 2 treatment.

MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis; OR = odds ratio; CI = confidence interval; AFB = add-fast bacilli; HIV = human immunodeficiency virus; BMI = body mass index.

Table A.4 Demographic and clinical characteristics related with successful and unsuccessful treatment outcome in patients with MDR-TB (intention-to-treat and per-protocol analysis)

	Successful outcome (n = 35) n (%)	Unsuccessful outcome (per-protocol analysis) (n = 15) n (%)	Unsuccessful outcome (intention-to-treat) (n = 42) n (%)	Per-protocol		Intention-to-treat	
				Univariate analysis OR (95%CI)	P value	Univariate analysis OR (95%CI)	P value
Sex, male	17 (48.6)	10 (66.7)	22 (52.4)	2.12 (0.60-7.48)	0.244	1.16 (0.47-2.86)	0.739
Age, years							
<20	5 (14.3)	2 (13.3)	2 (4.8)	0.92 (0.16-5.38)	0.929	0.30 (0.05-1.65)	0.167
20-40	22 (62.9)	12 (80)	35 (83.3)	2.36 (0.56-9.96)	0.241	2.95 (1.02-8.55)	0.046
>40	8 (22.9)	1 (6.7)	5 (11.9)	0.24 (0.03-2.13)	0.200	0.46 (0.13-1.55)	0.208
Place of residence							
Cuba	12 (34.3)	4 (28.6)	18 (46.2)	0.77 (0.20-2.97)	0.700	1.64 (0.64-4.20)	0.301
<50 km from Cuba ^a	6 (17.1)	2 (14.3)	4 (10.3)	0.81 (0.14-4.57)	0.807	0.55 (0.14-2.15)	0.391
>50 km from Cuba ^a	17 (48.6)	8 (57.1)	17 (43.6)	1.41 (0.40-4.92)	0.588	0.82 (0.33-2.05)	0.668
AFB >3+	13 (37.1)	8 (53.3)	15 (35.7)	1.93 (0.57-6.58)	0.291	0.94 (0.37-2.39)	0.897
HIV	1 (2.9)	0	1 (2.4)	2.67 (0.63-11.19)	0.180	0.83 (0.05-13.76)	0.896
BMI <18.5 kg/m ²	21 (60)	12 (80)	29 (69)	1.93 (0.36-10.38)	0.446	1.49 (0.58-3.81)	0.408
Duration of illness > 4 months	27 (77.1)	13 (86.7)	35 (83.3)	2.59 (0.64-10.56)	0.194	1.48 (0.48-4.59)	0.496
Cavities >4 cm	6 (17.6)	5 (35.7)	10 (25.6)	4.00 (0.63-25.32)	0.141	1.61 (0.52-5.02)	0.412
AFB-positive at months 2 to 3 ^b	11 (33.3)	4 (28.6)	14 (35.7)			1.75 (0.63-4.85)	0.282
						1.37 (0.46-4.13)	0.575

*Includes the cities of Calimambo and Gaiosa.

^aIncludes the cities of Bengueta, Lobo, Bahía Parí, Chongorí and Caltumbala.^bAFB performed at month 2 in patients who received first-line treatment and at month 3 in those who received Category 2 treatment.

MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis; OR = odds ratio; CI = confidence interval; AFB = acid fast bacilli; HIV = human immunodeficiency virus; BMI = body mass index.

RÉSUMÉ

CONTEXTE : La république d'Angola est l'un des 14 pays figurant dans les trois listes de l'Organisation Mondiale de la Santé [OMS] de pays durement frappés par la tuberculose (TB). La situation réelle de la TB multirésistante (TB-MDR) y est cependant inconnue.

MATERIEL ET MÉTHODES : Des patients âgés de ≥ 16 ans ayant eu un diagnostic de TB pulmonaire ont été prospectivement enrôlés entre juin 2014 et juillet 2015. Des échantillons de crachat ont été recueillis pour une culture et un test de pharmacosensibilité chez tous les patients, et pour le test de l'Xpert® MTB/RIF chez tous les patients déjà traités et chez les nouveaux patients dont les crachats sont restés positifs après 2 mois de traitement.

RÉSULTATS : Un total de 422 patients ont été inclus et *Mycobacterium tuberculosis* a été isolé dans 308

échantillons de crachat. La prévalence de la TB-MDR a été de 8,0% (18/225) des nouveaux patients et de 71,1% (59/83) des patients déjà traités. Le sexe masculin (OR 2,95 ; IC95% 1,35–6,44 ; $P = 0,007$), un traitement de TB préalable (OR 20,86 ; IC95% 9,53–45,67 ; $P < 0,001$), la présence d'un épaississement pleural (OR 7,68 ; IC95% 1,57–37,43 ; $P = 0,012$) et une durée de la maladie de > 4 mois (OR 3,34 ; IC95% 1,45–7,69 ; $P = 0,005$) ont été des facteurs de risque indépendants de TB-MDR.

CONCLUSION : La prévalence de la TB-MDR à Cubal est plus élevée que ne l'a estimé l'OMS pour l'Angola et est l'une des plus élevées dans le monde. Il est urgent que l'Angola dispose des structures de diagnostic et de traitement de la TB-MDR en Angola.

RESUMEN

MARCO DE REFERENCIA: La República de Angola es uno de los 14 países que aparecen en las tres listas de la Organización Mundial de la Salud de países con mayor carga de enfermedad tuberculosa. Sin embargo, la situación real de la tuberculosis multirresistente (TB-MDR) se desconoce.

MATERIAL Y MÉTODOS: Todos los pacientes de edad ≥ 16 años con un diagnóstico de TB pulmonar fueron incluidos desde junio de 2014 a julio de 2015 de manera prospectiva. En todas las muestras de esputo se realizó cultivo y sensibilidad a fármacos antituberculosos. Las muestras de esputo de todos los pacientes previamente tratados y de los pacientes nuevos con baciloscopia positiva al segundo mes de tratamiento se analizaron también mediante Xpert® MTB/RIF.

RESULTADO S: Se incluyeron un total de 422 pacientes,

aislándose *Mycobacterium tuberculosis* en 308 muestras de esputo. La prevalencia de TB-MDR fue del 8,0% (18/225) en pacientes nuevos y del 71,1% (59/83) en pacientes previamente tratados. El sexo masculino (OR 2,95; 95% CI 1,35–6,44; $P = 0,007$), el tratamiento antituberculoso previo (OR 20,86; 95% CI 9,53–45,67; $P < 0,001$), la presencia de engrosamiento pleural (OR 7,68; 95% CI 1,57–37,43; $P = 0,012$), y la duración de enfermedad mayor a 4 meses (OR 3,34; 95% CI 1,45–7,69; $P = 0,005$) fueron factores de riesgo independientes asociados a TB-MDR.

CONCLUSIONES: La prevalencia de TB-MDR en Cubal es más alta que la estimada por la OMS para Angola, y una de las más altas a nivel mundial. Se necesitan de manera urgente facilidades para diagnosticar y tratar la TB-MDR en Angola.

Treatment Outcomes and Adverse Events from a Standardized Multidrug-Resistant Tuberculosis Regimen in a Rural Setting in Angola

María Luisa Aznar,^{1,2*} Ailadna Rando Segura,^{3,†} María Milagros Moreno,² Mateu Espasa,³ Elena Sulleiro,³ Cristina Bocanegra,^{1,2} Eva Gil Olivares,² Ariete Nindia Eugénio,² Adriano Zacarias,² Domingos Katimba,² Estevo Gabriel,² Jacobo Mendioroz,² María Teresa López García,² Tomas Pumarola,³ María Teresa Tórtola,³ and Israel Molina¹

¹Tropical Medicine and International Health Unit Vall d'Hebron-Drassanes PROSICS Barcelona, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola; ³Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Support Research Unit, Territorial Health Management of Central Catalonia, Catalonia, Spain

Abstract. Treatment for multidrug-resistant tuberculosis (MDR TB) is associated with adverse events (AE). Patients treated with an MDR TB regimen in Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola, were prospectively enrolled from May 2013 to July 2015. Baseline characteristics, AE, and clinical and microbiological outcomes were recorded. A total of 216 patients were treated with an MDR TB regimen and 179 (82.9%) patients developed at least one AE. The most common AE were elevation of liver enzymes (46.8% of patients), elevated creatinine (4.4% of patients), and ototoxicity (40.7% of patients). Previous TB treatment was associated with the occurrence of AE (OR 4.89, 95% CI: 2.09–11.46, $P < 0.001$) and months on treatment was associated to severe AE (OR 1.11 95% CI: 1.04–1.18, $P = 0.001$). Successful treatment was achieved in 117 (54.2%) patients. Incidence of AE was associated with an unsuccessful outcome (OR 1.23, 95% CI: 1.09–1.40, $P = 0.001$). Patients treated with MDR TB treatment frequently experience AE, and these are related with previous TB treatment and duration of treatment. Given the high percentage of patients experiencing AE and the low treatment success rates, more effective and less toxic drugs to treat MDR TB are urgently needed.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) continues to be one of the top 10 causes of death worldwide and the emergence of resistance to TB drugs represents a persistent threat in TB control. Globally in 2017, an estimated 4% of new cases and 19% of previously treated cases had multidrug-resistance (MDR). Highly toxic, suboptimal effective drugs used for long durations contribute to higher proportion of unfavorable outcomes in MDR TB compared with susceptible TB.¹

Republic of Angola is one of the 14 countries listed in the three TB high-burden country lists.¹ A recent study in this setting observed a proportion of MDR TB of 71% in previously treated patients and 8% in new patients, reflecting one of the highest prevalence worldwide.² Until 2013, access to second-line drugs was only available in a single clinic in Luanda. In May 2013, hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP), a reference center of TB located in Cubal, southwest Angola, started to provide MDR TB treatment.

WHO recommends an 18–20-month fully oral regimens including fluoroquinolones (levofloxacin or moxifloxacin), bedaquiline, and linezolid because of adverse events (AEs) associated with the injectable.^{3–4} In eligible patients who were not previously treated with second-line drugs and in whom resistance to fluoroquinolones and second-line injectable agents was excluded or is considered highly unlikely, a standardized, shorter MDR TB regimen may be offered.⁴ However, access to some of the drugs used in these new regimens is challenging in some settings with high burdens of MDR TB,⁵ and some national TB programs have not yet incorporated the short regimen to their guidelines.

Consequently, the knowledge of the most frequent AE and the factors associated with unfavorable clinical outcomes related to a 20-month standardized MDR treatment are crucial in poor-resource settings, where access to new drugs is still difficult.

The objectives of this study were to describe the clinical characteristics, AEs, treatment outcomes, and factors associated with AE and unfavorable outcomes in a cohort of MDR TB patients treated with second-line drugs.

METHODS

Study area, study design, participants, and ethics. This prospective cohort study was conducted in HNSP, in Cubal, southwest Angola, from May 2013 to July 2015. The study was approved by the Vall d'Hebron Research Institute Ethics Committee, Angolan National Tuberculosis Program (PNLT), and the University of Katysvala Bwila Ethics Committee. Written informed consent was required to be included in the study. In patients < 16 years, the parents or legal guardians signed the consent form. All patients who were started on an MDR TB treatment regimen were consecutively enrolled in the study. Criteria for initiating MDR TB treatment were 1) confirmed rifampin (RIF) resistance by Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA) (incorporated in May 2014 as part of the TB diagnosis in the context of a clinical research),⁶ 2) suspected MDR TB in patients with a positive acid-fast bacilli (AFB) sputum with a history of failure after at least two previous TB treatments, and 3) contacts of MDR TB-confirmed cases with clinical and radiography signs, suggestive of active TB and in whom it was not possible to obtain a sputum sample.

Data collection. Sociodemographic characteristics, clinical symptoms, duration of illness, and history of previous treatment were recorded. Malnutrition was defined as BMI < 18.5 in patients older than 18 years, BMI-for-age < -2 SD

*Address correspondence to María Luisa Aznar, Infectious Disease Department, Vall d'Hebron University Hospital, Passeig Vall d'Hebron 119–129, Barcelona 08035, Spain. E-mail: maznaru@gmail.com
†These authors were contributed equally to this work.

in children between 5 and 18 years, and weight-per-age < -2 SD for children younger than 5 years.^{7,8} All patients were offered an HIV test. Chest X-rays were interpreted by the physician in charge of the patient's care.

Sputum collection. From each patient, three sputum samples from three different days were collected. The samples were examined through direct smear microscopy for the presence of AFB. All patients provided an additional sputum sample that was stored at -80° and were periodically transported to the Microbiology Department of Vall d'Hebron University Hospital in Barcelona, Spain, for culture and determination of drug susceptibility.² Patients who were included in the clinical research mentioned previously provided one more sputum sample after a smear-positive result used to perform the Xpert MTB/RIF.

Follow-up and AE monitoring. A daily follow-up while inpatient, a weekly follow-up during the first 2 months, and a monthly follow-up thereafter was performed by a team of physicians and nurses. If any symptoms suggesting AE or TB worsening developed, patients were instructed to contact the team before the scheduled appointment. Directly observed therapy was performed in all patients by a nurse during the first 8 months and by a relative afterward. A complete blood count, levels of serum creatinine, and serum transaminases were performed monthly. Sputum samples were collected every month. The following AEs were assessed at each clinic

appointment: ototoxicity, peripheral neuropathy, psychiatric disorders, gastrointestinal symptoms, dermatological disorders, nephrotoxicity, and hepatotoxicity. Nephrotoxicity was defined as any value of serum creatinine above 1.2 mg/dL and hepatotoxicity as any elevation of transaminases above 1.5 times the upper limit of normal (ULN). Diagnosis of clinical AEs was based on self-reported data using a standardized questionnaire form (Supplemental Appendix 1). Severity of adverse drug event was defined according the WHO Toxicity Grading Scale for Determining the Severity of AE in mild, moderate, severe, and life-threatening (Supplemental Appendix 1).⁹

Treatment. All patients included in this study received a standardized regimen for MDR TB containing ethambutol (EMB), isoniazid (INH), ethionamide (Eto), cycloserine (Cs), ofloxacin (Ofx), and a second-line injectable drug (kanamycin, capreomycin, or amikacin depending on the available drug from the PNLT) for 8 months, followed by 12 months of EMB, INH, Eto, Cs, and Ofx. Until August 2015, there were no available alternative agents to replace in case of intolerance. From August 2015, para-aminosalicylic acid sodium (PAS) was added to the regimen in case the offending drug was withdrawn. Patients with a concomitant diagnosis of HIV initiated treatment with tenofovir, emtricitabine, and efavirenz according to Angolan HIV guidelines.¹⁰ Treatment outcomes were based on WHO classifications.¹¹ Because it was not possible to perform follow-up cultures, we based treatment

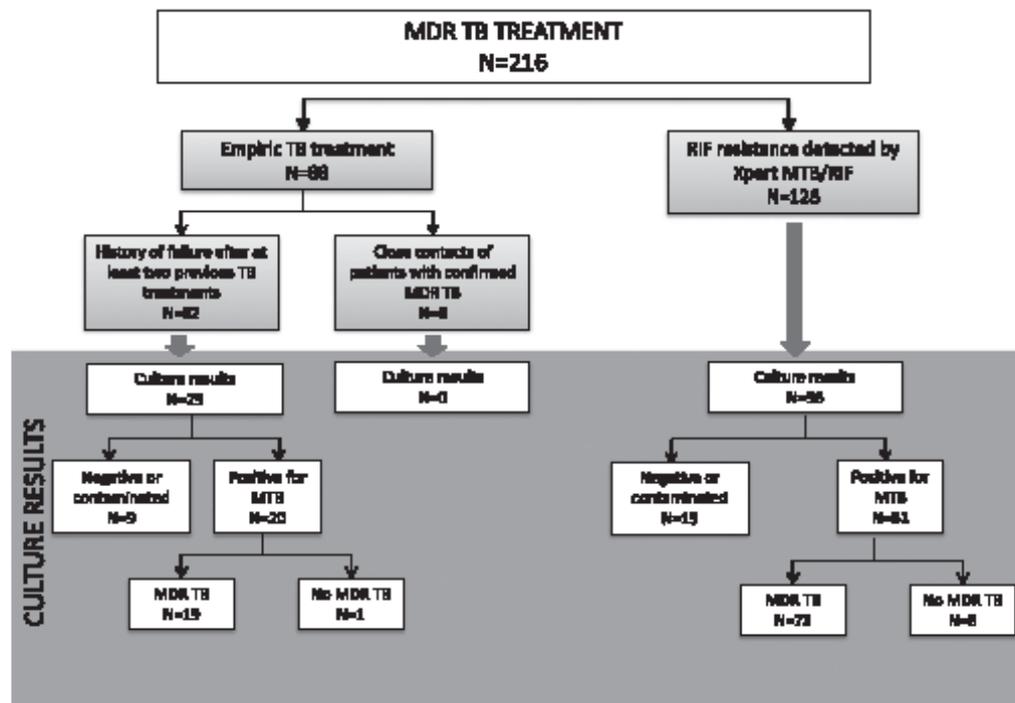


Figure 1. Culture results of patients initiated on multidrug-resistant tuberculosis treatment based on Xpert MTB/RIF results and clinical approach.

TABLE 1
Baseline characteristics of patients treated with MDR regimen

	N = 216, N (%)
Gender, male	124 (57.4)
Age, median (IQR)	30.0 (24.2–38.0)
City of origin	
Cuba†	83 (38.4)
<50 km from Cuba*	16 (7.4)
>50 km from Cuba†	117 (54.2)
HIV infection	13 (6.0)
Previous TB treatment	182 (84.3)
Clinical signs	
Cough	208 (96.3)
Fever	165 (76.4)
Hemoptysis	43 (19.9)
Malnutrition	141/192 (73.4)
Duration of illness months, mean (SD)	24.8 (24.2)
Radiological findings	
Cavity any size	61/185 (28.2)
Cavity ≥ 5 cm	50/185 (23.1)
Cavity < 5 cm	11/185 (5.9)
Lung infiltrates	111/185 (51.4)
Pleural thickening	20/185 (9.3)
Miliar TB	2/185 (0.9)
Pleural effusion	10/185 (4.6)
Hb (mg/dL), mean (DE)	10.3 (2.4)
Indication for treatment	
RIF resistance detected by Xpert	128 (59.3)
Presumptive MDR TB	88 (41.7)
Culture results	125 (57.9%)
MTB isolated in sputum	101/125 (80.8)
Susceptibility to antibiotics	
Resistance to one drug	5/101
RIF only	2/101
INH only	3/101
First-line polydrug resistance	
INH + STM + PZA	3/101
INH + STM + EMB	1/101
Confirmed MDR	92/101 (91.1%)
Any second-line resistance	21/100 (21%)
Am + Cm	2/92
Am + Eto	1/92
Cm	6/92
Cm + Eto	2/92
Eto	7/92
Eto + Mfx + Ofx	1/92
Eto + Ofx	1/92
Ofx	1/92

* Includes the cities of Calimambo and Garcia.

† Includes the cities of Bengala, Lobito, Bahía Fierro, Chongori and Cumbale.

Am = amikacin; BM = body mass index; Cm = capreomycin; EMB = ethambutol; Eto = ethionamide; INH = isoniazid; MDR = multidrug resistance; Mfx = moxifloxacin; MTB = *Mycobacterium tuberculosis*; Ofx = ofloxacin; PZA = pyrazinamide; RIF = rifampin; STM = streptomycin; TB = tuberculosis.

outcomes in smear results. A successful outcome included patients meeting the definition of cure or treatment complete. Two different definitions were used for unsuccessful outcome: a first one including patients lost to follow-up, patients who died, and patients who experience treatment failure and a second one including patients who died and patients who experience treatment failure.

Data analysis. Descriptive statistics are presented as number (percent) and median (interquartile range, IQR) or mean (SD) depending on variable normality. We used chi-squared tests or Fisher's exact tests to compare categorical variables and t-tests or Mann-Whitney tests to compare continuous variables. To palliate the problem of lower proportion of AE in patients with shorter treatment durations, a variable called AE incidence was created. It was defined as the rate of AE per 20 months of treatment (considering as if all

patients would have been followed for 20 months, experiencing the same rate of AE per month during missing follow-up period than during treatment follow-up period). Demographics, comorbidities, previous TB treatment, and months on treatment were considered as possible risk factors for developing an AE. Demographics, grading of basal AFB, comorbidities, previous TB treatment, AFB status at 2 months of treatment, incidence of AE, and resistance to second-line drugs were considered as factors that could be associated with an unsuccessful treatment outcome. Three models were developed using a multivariate analysis, including AE (at least one AE yes or not as dichotomous variable), severe AE (at least one severe or life-threatening AE yes or not as dichotomous variable), and treatment outcomes (successful and unsuccessful treatment outcome as dichotomous variable) as dependent variables. Variables with a *P*-value < 0.20 in the univariate analysis and variables considered a priori to be clinically important, were included in the multivariate logistic regression analysis. We performed two analyses to assess treatment outcomes; one of them in all patients and a second one restricted to patients with a confirmed RIF resistance TB based on either culture or Xpert TB/RIF. For treatment outcomes, we performed two different analyses considering the two different definitions used for unsuccessful outcomes previously mentioned. A two-sided *P*-value < 0.05 was considered statistically significant for all analyses. All analyses were performed using SPSS statistical software (IBM SPSS version 23, Armonk, NY).

RESULTS

From May 2013 to May 2015, 216 patients were treated with an MDR TB regimen. Twelve patients were younger than 15 years, with a median (IQR) age of 9.0 (2–11.5) years. Thirteen (6%) of them were HIV coinfecting, with a median (IQR) CD4 of 383 (154–509). *Mycobacterium tuberculosis* was isolated in 101 patients, and MDR TB was confirmed in 92 (91.1%) of them (See Figure 1). No cases of extensively drug-resistant TB were detected. Baseline characteristics of patients treated with MDR TB treatment are summarized in Table 1.

Adverse events. One hundred and seventy-nine (82.9%) patients developed at least one AE; and two patients committed suicide during the treatment (both on cycloserine treatment). All AEs were initially managed symptomatically. Dose adjustment for at least one drug was required in 42/216 (19.4%) patients, temporary interruption of at least one antibiotic in 12/216 (5.6%), and termination of at least one antibiotic in 42/216 (19.4%). All patients received an aminoglycoside for at least 5 months. Adverse events persisted in 58/179 (32.4%) patients after completion of treatment; hearing loss persisted in 38/179 (21.2%) patients, polyneuropathy in 8/179 (4.5%), and both polyneuropathy and hearing loss in 12 (6.7%) patients. Fifty-four (25%) patients experienced at least a severe or life-threatening AE; 13/216 (9.9%) with severe ototoxicity, 5/216 (2.3%) with severe peripheral neuropathy, 18/216 (8.3%) with severe or life-threatening psychiatric disorders, 2 (1%) with severe nephrotoxicity, 2/216 (1%) with convulsions, 1/216 (0.5%) with a severe dermatological reaction, and 8 (3.7%) experienced several severe AE (one with severe ototoxicity, polyneuropathy, and psychosis; four with both ototoxicity and polyneuropathy; one with ototoxicity, polyneuropathy, and vomiting; one with ototoxicity and nephrotoxicity; and one

Table 2
Patients who developed AE associated with MDR TB regimen

	Hepatitis	Nephrotoxicity	Ototoxicity	Peripheral neuropathy	Psychiatric disorders	GI disorders	Dermatological disorders	Arthralgias	Cyclosporine/Impotence	Convulsions
N (%)	101 (46.8)	96 (44.4)	88 (40.7)	69 (31.9)	46 (21.3)	50 (23.1)	25 (11.6)	13 (6.0)	12 (5.6)	2 (1.0)
Median (IQR) months until development of AE	3 (2-5)	4 (2-7)	4 (2-6)	5 (2-7.7)	6 (3.7-11)	1.5 (1-6)	6 (2-13)	4 (2.5-6)	7.5 (3.25-9)	3 (3-3)
Mild, N (%)	66 (65.3)	42 (43.7)	17 (19.3)	22 (31.9)	3 (6.5)	24 (48)	15 (60)	12 (92.3)	12 (100)	0
Moderate, N (%)	33 (32.7)	51 (53.1)	49 (55.7)	35 (39.8)	23 (50)	23 (46)	9 (36)	1 (7.7)	0	0
Severe, N (%)	2 (2.0)	3 (3.1)	22 (25)	12 (17.4)	12 (26.1)	3 (6.0)	1 (4)	0	0	2 (100)
Life-threatening, N (%)	0	0	0	0	8 (17.4)	0	0	0	0	0
Additional medication	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
Pyridoxine	-	-	-	58 (84%)	46 (100%)	-	-	-	-	-
Anxiolytics	-	-	-	-	12 (26.1%)	-	-	-	-	-
Antipsychotics	-	-	-	-	1 (2.2%)	-	-	-	-	-
Antiemetics	-	-	-	-	-	34 (68%)	-	-	-	-
Anti-acids	-	-	-	-	-	5 (10%)	-	-	-	-
Antiepileptics	-	-	-	1 (1.4%)	-	-	-	-	-	-
NSAID	-	-	-	-	-	-	-	2 (15.4%)	-	2 (100%)
Topic steroids	-	-	-	-	-	-	3 (12%)	-	-	1 (50%)
Dose reduction of antibiotics required	-	31*	32	0	3	0	0	0	0	0
Withdrawal of antibiotics required	1†	10	10	5‡	37§	0	0	0	2	1
Evolution of AEs										
Resolved, N (%)	86 (85.1)	71 (73.9)	14 (15.9)	45 (65.2)	28 (60.9)	50 (100)	0	13 (100)	0	2 (100)
Stable	1 (9.9)	5 (5.2)	56 (63.6)	12 (17.4)	1 (2.2)	0	15 (60)	0	12 (100)	0
Worsening	0	1 (1)	18 (20.4)	8 (11.6)	1 (2.2)	0	10 (40)	0	0	0
No follow-up	14 (13.9)	19 (19.8)	0	4 (5.8)	14 (30.4)	0	0	0	0	0
Death	0	0	0	0	2 (2.9)	0	0	0	0	0
Drugs more probably implicated	INH, Eto	SLI	SLI	INH, eto, Cs	Cs	Eto, INH	Ofo	INH, ofo	Eto	Eto, Cs

AE = adverse effect, Cs = cyclosporine, Eto = ethionamide, GI = gastrointestinal, INH = isoniazid, IQR = interquartile range, NSAID = non-steroidal anti-inflammatory, Ofo = ofloxacin, SLI = second-line injectable.

* Amphotericin (AQ) was stopped in all three patients who developed severe nephrotoxicity. Of 51 patients who developed moderate nephrotoxicity, seven required withdrawal of the AQ, 27 required dose reduction of the AQ, 11 raised their creatinine as far the eighth month of treatment, and six were lost to follow-up (FU).

† Of two patients who developed severe hepatotoxicity, one patient was lost to FU and no treatment adjustment could be done; isoniazid was stopped in the other patient.

‡ Isoniazid was stopped in two patients, Cs was stopped in the other two patients, and all antibiotics were stopped in one patient.

§ Cyclosporine was stopped in 30 patients, and all the antibiotics were stopped in seven patients because of psychiatric disorders. Cyclosporine was replaced by PAB in 17 patients.

with polyneuropathy and psychosis). Details on severity, management and evolution of AE are shown in Table 2. Cumulative AEs experienced during the follow-up period are shown in Figure 2. Cumulative AEs stratified by previous treatment is shown in Supplemental Figures 1 and 2. We observed that previous TB treatment was associated with both at least one AE and severe AE (OR 4.89, 95% CI: 2.09-11.46, $P < 0.001$ and OR 9.99, 95% CI: 2.47-40.34, $P = 0.002$, respectively) and months on treatment was associated with severe AE (OR 1.11 95% CI: 1.04-1.18, $P = 0.001$). This information is summarized in Table 3. When we analyzed the

most common AE separately, we observed that both previous TB treatment and months on treatment were associated with ototoxicity (OR 3.88, 95% CI: 1.46-10.31, $P = 0.007$ and OR 1.08, 95% CI: 1.03-1.12, $P = 0.001$), hepatotoxicity (OR 2.82, 95% CI: 1.20-6.60, $P = 0.017$ and OR 1.08, 95% CI: 1.03-1.23, $P < 0.001$), and nephrotoxicity (OR 3.86, 95% CI: 1.52-9.85, $P = 0.005$ and OR 1.10, 95% CI: 1.05-1.15, $P < 0.001$). Months on treatment and age were associated with polyneuropathy (OR 1.08, 95% CI: 1.03-1.13, $P = 0.002$) and (OR 1.04, 95% CI: 1.01-1.07, $P = 0.020$) (Table 4).

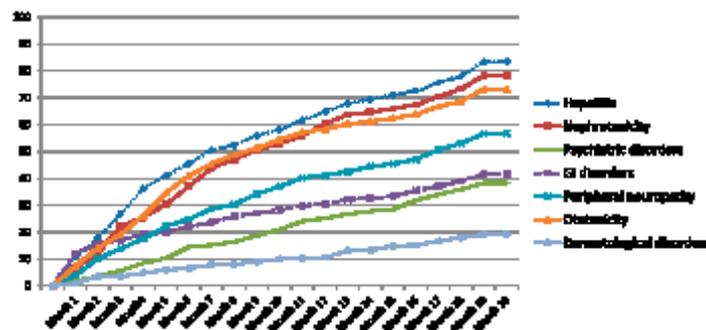


Figure 2. Cumulative adverse events experienced during the follow-up period. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

Table 3
Comparison of demographic and clinical characteristics in patients with and without any AEs

	Adverse effects, N = 170		Severe AEs, N = 53		No adverse effects, N = 37		Univariate analysis, OR (95% CI)		P-value		Multivariate analysis, OR (95% CI)		P-value		Multivariate analysis, OR (95% CI)		P-value	
Gender, male	107 (69.8%)	28 (52.8%)	30 (25.3%)	33 (27.5-39.0)	17 (45.9%)	1.75 (0.86-3.56)	0.124	2.02 (0.95-4.30)	0.068	1.32 (0.57-3.06)	0.521	1.03 (0.99-1.07)	0.146					
Age (years), median (IQR)	30 (25-37)	33 (27.5-39.0)	30 (23.5-41.5)	0.99 (0.96-1.02)	0.993	0.99 (0.96-1.01)	0.256											
Malnutrition	120 (73.6%)	39 (81.3%)	21 (72.4%)	1.06 (0.44-2.59)	0.496	0.67 (0.17-2.57)	0.509											
HIV coinfection	10 (5.8%)	3 (6.7%)	3 (8.1%)	0.87 (0.17-4.48)	0.881	1.14 (0.37-3.48)	0.780											
Baseline Hb, media (SD)	10.7 (2.4)	10.2 (2.7)	10.0 (2.0)	1.14 (0.87-1.48)	0.335	1.14 (0.87-1.48)	0.335											
Previous TB treatment	158 (98.9%)	49 (92.5%)	24 (64.9%)	4.28 (1.89-9.71)	0.001	4.89 (2.09-11.46)	< 0.001											
Total months on treatment, median (IQR)	20 (12-20)	17 (8.5-20)	5 (1-19.5)	0.98 (0.94-1.02)	0.263	0.98 (0.94-1.02)	0.263											

AEs = adverse events; Hb = hemoglobin; IQR = interquartile range; TB = tuberculosis.

Treatment outcomes. Information about treatment outcomes is summarized in Table 5. We observed that the incidence of AE was associated with an unsuccessful outcome in both the first analysis (patients lost to follow-up, patients who died, and patients who experience treatment failure considered as unsuccessful treatment) (1.23, 95% CI: 1.09-1.40, $P=0.001$) and in the second analysis (patients who died and patients who experience treatment failure considered as unsuccessful outcome) (OR 1.33, 95% CI: 1.09-1.61, $P=0.004$). Malnutrition was associated with unsuccessful outcome in the second analysis (4.73, 95% CI: 1.04-21.5, $P=0.044$). This information is shown in Table 6. Variables associated with unsuccessful outcomes restricted to patients whose sputum samples showed MTB RIF resistance is shown in Supplemental Table 1.

DISCUSSION

Similarly to the 2018 Global TB report and recent studies, we observed that 53.8% of patients experienced treatment success.^{1,12} Adverse events were common, and 25% of patients experienced a severe AE. Moreover, AE persisted in 32.4% patients after completion of treatment.

Recent studies reporting data of TB in Angola have observed a high proportion of MDR TB²²; however, access to MDR TB diagnosis is not available for all TB patients in Angola, and it leads physicians to empirically start a second-line regimen in patients with high risk of MDR TB. In fact, 41.5% of our patients were started empirically on MDR TB treatment. Despite the potential harms of empirical TB treatment, benefits including prevention of transmission and mortality and morbidity reduction make that empirical treatment is often used in high-burden settings.^{13,14}

We observed that 82.9% of patients developed at least one AE, and AEs were associated with previous TB treatment. Moreover, severe AEs were associated with both previous TB treatment and months of treatment. Overall, AEs in patients treated for MDR TB are common, although frequency differs depending on the type of drugs used, the duration of the regimen, and other clinical characteristics such as HIV coinfection, and previous TB history.¹⁵⁻²⁰ The association between previous TB treatment and AE has been previously described in the literature.²¹ It is possible that patients previously treated with TB drugs had experienced some persistent AE that predisposes the development of subsequent AEs. This has been well described with the use of aminoglycosides.²² Because a regimen containing streptomycin (category 2 treatment) was used in some of the previously treated patients, it may explain the association between previous TB treatment and ototoxicity. On the other side, we are not able to ensure if some of the AEs were already present before starting treatment because this information was not collected. Treatment duration has been also related to AEs,²³ and it is one of the reasons why shorter regimens have been proposed during the last years. However, shorter regimens currently recommended contain aminoglycosides, so may also be ototoxic. Therefore, shorter regimens without aminoglycosides are needed.

The percentage of patients developing both hepatotoxicity and nephrotoxicity in our study are higher compared with other cohorts of patients, probably because of different definitions (any elevation of transaminases above 1.5 times the ULN versus five times the ULN and any value of serum creatinine above 1.2 mg/dL versus a rise of serum creatinine of 0.5 mg/dL from baseline, respectively).²⁴⁻²⁶ Peripheral neuropathy and psychiatric disorders were more commonly

TABLE 4
Comparison of demographic and clinical characteristics in patients with and without specific adverse events

Otolotoxicity	Otolotoxicity (N = 88)	No ototoxicity (N = 128)	Univariate model		Multivariate model	
			OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Gender, male	58 (65.9%)	86 (51.6%)	1.82 (1.04–3.18)	0.037	1.88 (1.00–3.32)	0.051
Age (years), median (IQR)	30 (27–39)	29 (24–37)	1.03 (1.00–1.05)	0.041	1.02 (0.99–1.05)	0.101
Malnutrition	58 (73.4%)	83 (73.5%)	0.99 (0.99–1.91)	0.996		
HIV coinfection	6 (6.8%)	7 (5.5%)	1.26 (0.41–3.90)	0.683		
Previous TB treatment	82 (93.2%)	100 (78.1%)	3.83 (1.51–9.69)	0.005	3.88 (1.46–10.31)	0.007
Months on treatment, median (IQR)	20 (16–20)	18 (8.25–20)	1.07 (1.03–1.12)	0.001	1.08 (1.03–1.12)	0.001
Polynuropathy	Polynuropathy (N = 89)	No polynuropathy (N = 147)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Gender, male	41 (59.4%)	83 (56.5%)	1.13 (0.63–2.02)	0.682		
Age (years), median (IQR)	33 (27–39)	29 (24–37)	1.03 (1.01–1.06)	0.013	1.04 (1.01–1.07)	0.011
Malnutrition	48 (71.6%)	93 (74.4%)	0.87 (0.45–1.69)	0.680		
HIV coinfection	4 (5.9%)	9 (6.1%)	0.94 (0.28–3.18)	0.925		
Previous TB treatment	63 (91.3%)	119 (81.9%)	2.47 (0.97–6.28)	0.057	2.23 (0.84–5.93)	0.109
Months on treatment, median (IQR)	20 (16–21)	18 (8–20)	1.07 (1.02–1.12)	0.003	1.08 (1.03–1.13)	0.002
Psychiatric	Psychiatric disorders (N = 46)	Nonpsychiatric disorders (N = 170)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Gender, male	29 (63%)	95 (55.9%)	1.35 (0.69–2.63)	0.384		
Age (years), median (IQR)	29.5 (25.7–37)	30 (24–39)	1.00 (0.97–1.03)	0.899		
Malnutrition	30 (76.9%)	111 (72.5%)	1.28 (0.55–2.88)	0.581		
HIV coinfection	2 (4.3%)	11 (6.5%)	1.52 (0.32–7.12)	0.594		
Previous TB treatment	41 (89.1%)	141 (82.9%)	1.69 (0.61–4.63)	0.311		
Months on treatment, median (IQR)	19 (9–20)	19 (8.7–20.2)	1.00 (0.96–1.05)	0.89		
Hepatotoxicity	Hepatotoxicity (N = 101)	No hepatotoxicity (N = 115)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Sex, male	63 (62.4%)	61 (53%)	1.47 (0.85–2.53)	0.167	1.70 (0.94–3.06)	0.076
Age (years), median (IQR)	30 (24–36.5)	30 (25–39)	0.98 (0.96–1.01)	0.984	0.98 (0.95–1.00)	0.081
Malnutrition	68 (70.1%)	73 (76.8%)	0.71 (0.37–0.35)	0.291		
HIV coinfection	4 (4%)	9 (7.8%)	0.49 (0.14–1.63)	0.242		
Previous TB treatment	91 (90.1%)	91 (79.1%)	2.40 (1.09–5.30)	0.030	2.82 (1.20–6.60)	0.017
Months on treatment, median (IQR)	20 (14.5–21)	18 (5–20)	1.08 (1.03–1.12)	< 0.001	1.08 (1.03–1.23)	< 0.001
Nephrotoxicity	Nephrotoxicity (N = 98)	No nephrotoxicity (N = 119)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Gender, male	60 (62.5%)	64 (53.8%)	1.43 (0.83–2.48)	0.199	1.45 (0.79–2.64)	0.230
Age (years), median (IQR)	30 (25–38.5)	30 (24–38)	1.02 (0.99–1.04)	0.202	1.01 (0.99–1.04)	0.321
Malnutrition	70 (78.1%)	71 (71.7%)	1.25 (0.66–2.40)	0.493		
HIV coinfection	5 (5.2%)	8 (6.7%)	0.78 (0.24–2.41)	0.644		
Previous TB treatment	89 (92.7%)	92 (77.3%)	3.73 (1.55–9.00)	0.003	3.86 (1.52–9.85)	0.005
Months on treatment, median (IQR)	20 (17.2–20.7)	16 (6–20)	1.10 (1.05–1.15)	< 0.001	1.10 (1.05–1.15)	< 0.001

IQR = Interquartile range; TB = tuberculosis.

observed than those reported from other cohorts of MDR TB patients and like those reported from cohorts of HIV-infected patients.^{27,28} A possible explanation is that pyridoxine was not free provided by our program, so we cannot ensure that all patients received it. It is also possible that these AEs are underreported in studies that did not actively search for those. Cycloserine was stopped in 13.4% of patients who developed psychiatric symptoms, in contrast to previous studies in which psychiatric symptoms has been successfully managed without compromising MDR regimen.²⁹

We observed a high proportion of patients lost to follow-up compared with other cohorts of MDR TB patients.¹⁸ This may be due to several factors; many patients included in our study live far from the hospital; moreover, the proportion of AEs observed was also high, and AEs have been previously associated with lost to

FU.³⁰ By contrast, the proportion of treatment failure was low, similar to that in other cohorts of MDR TB patients from Africa.¹⁸ This low proportion of treatment failure may be due to the recent introduction of second-line treatment, with scarce prevalence of resistances to second-line drugs. Moreover, this number might be underestimated because cultures were not done during follow-up. We observed that incidence of AE was a risk factor for an unsuccessful outcome. It has been previously observed that the most common reason for stopping the treatment is AE.³⁰ It is easily understandable that either the patient or the physician decides to discontinue the treatment if an AE is not well controlled, and consequently, it is more unlikely to achieve a successful outcome.

Shorter regimens reporting treatment success rates > 80% have become available to treat MDR TB^{31,32}; however, recent

Table 5
Treatment outcomes based on WHO definition (modified by smear) stratified by confirmed and non-confirmed cases

	All patients who started an MDR TB regimen, N = 216	Patients with confirmed rifampicin resistance (either culture or Xpert MTB/RIF), N = 147
Cured	69 (31.9%)	42 (28.6%)
Treatment completed	48 (22.2%)	37 (25.2%)
Lost to follow-up	57 (26.4%)	41 (27.9%)
Treatment failure	4 (1.8%)	3 (2%)
Death	38 (18.3%)	24 (16.3%)
Definitions used for the first analysis*		
Successful treatment	117/216 (54.2%)	79/147 (53.7%)
Unsuccessful treatment	99/216 (45.8%)	68/147 (46.2%)
Definitions used for the second analysis†		
Successful treatment	117/168 (69.6%)	79/106 (74.5%)
Unsuccessful treatment	42/168 (25%)	27/106 (25.6%)

MDR TB = multidrug-resistant tuberculosis; rif = rifampin.
* First analysis: Considering unsuccessful outcomes as patients lost to follow-up, patients who died, and patients who experienced treatment failure.
† Second analysis: Excluding patients lost to follow-up and considering unsuccessful outcome as patients who died and patients who experienced treatment failure.

data have reported high proportions of resistance to some of the drugs of the regimen and controversies about the global implementation of these regimen have recently arise.^{33,34} In fact, in our study, 20/92 (21.7%) MDR TB-infected patients had resistance to at least 1 second-line drug included in the short regimen recommended by WHO. Moreover, access to second-line drug susceptibility testing is required to use the short regimen, and this is not the case in Angola. Consequently, although short regimens may help improve clinical outcomes of patients with MDR TB, it must be accompanied by improvements in laboratory capacity. New WHO recommendations recently published prioritize the use of all oral regimens not containing the use of injectables.⁴ The high proportion of ototoxicity related to aminoglycosides found in our study would support the use of these regimens. However, as mentioned earlier, access to some of the drugs that should be included in these regimens such as bedaquiline is very challenging in many countries.⁵

Our study has several limitations. First, diagnosis of MDR TB was not based on culture results in all patients and criteria of cure were based on smear microscopy rather than culture. These limitations reflect the reality of TB diagnosis and management in many poor-resource settings. Second, definition of AE was based on self-reported data; so, we may underestimate the real incidence of some AEs. Third, some of the common AEs related to MDR TB regimen such as hypothyroidism were not reported because of the absence of laboratory material, so we may underestimate the overall incidence of AE. Furthermore, we do not have data of some underlying medical conditions that may be associated with AE.

Patients treated with a long standardized MDR TB treatment frequently experience AE, and these are related with previous TB treatment and duration of treatment. Only the incidence of AE was associated with an unsuccessful treatment outcome. The adequate management of AE is critical to treat MDR TB patients.

Received March 1, 2019. Accepted for publication May 31, 2019.

Published online July 22, 2019.

Note: Supplemental appendix, figure, and table appear at www.ajtmh.org.

Acknowledgment: We acknowledge all of the collaboration from Hospital Nossa Senhora da Paz.

Table 6
Patient characteristics and their associations with unsuccessful treatment outcome

	Including patients lost to FU		Excluding patients lost to FU	
	Univariate analysis, OR (95% CI)	P value	Univariate analysis, OR (95% CI)	P value
Gender, male	1.18 (0.69–2.03)	0.550	0.93 (0.49–1.97)	0.929
Age, median (IQR)	1.01 (0.99–1.03)	0.545	1.02 (0.99–1.05)	0.221
City of origin				
Cubal	1.08 (0.62–1.87)	0.788	1.02 (0.49–2.11)	0.955
<50 km from Cubal	0.69 (0.24–1.97)	0.489	0.82 (0.21–3.15)	0.776
>50 km from Cubal	1.03 (0.60–1.76)	0.918	1.04 (0.51–2.11)	0.919
AE > 3*	1.07 (0.58–1.98)	0.826	1.48 (0.70–3.13)	0.302
HIV	1.41 (0.58–4.33)	0.511	0.92 (0.18–4.77)	0.928
Malnutrition	2.11 (1.06–4.20)	0.033	1.44 (1.09–32.92)	0.008
Previous TB treatment	0.94 (0.46–1.96)	0.876	1.34 (0.47–3.98)	0.593
Cavities > 5 cm	1.02 (0.53–1.97)	0.949	1.20 (0.52–2.74)	0.668
Positive AFB 2 months	0.99 (0.52–1.87)	0.968	1.50 (0.57–3.92)	0.408
Resistance to second-line drugs	0.57 (0.21–1.23)	0.264	0.65 (0.19–2.27)	0.500
AE incidence 20 months, mean (SD)‡	1.22 (1.09–1.37)	0.001	1.30 (1.10–1.53)	0.002
	6.91 (3.98)		4.73 (1.04–21.50)	0.044
	0.001		1.33 (1.09–1.61)	0.004

AE = adverse event; FU = follow-up; OR = odds ratio; CI = confidence interval.
* Unsuccessful outcomes, including patients lost to follow-up, patients who died, and patients who experienced treatment failure.
† Unsuccessful outcomes, including patients who died, and patients who experienced treatment failure.
‡ Adverse events/AE incidence: rate of AEs per 20 months of treatment considering as if all patients would have been followed-up for 20 months, expanding the numerator of AEs per month during missing follow-up period then during treatment follow-up period. For example if a patient was lost to follow-up after 10 months, and he/she experienced three AEs, then the rate of AEs per month would be 1, and the rate of AEs per 20 months would be 20.

Financial support: We are grateful for the financial support received from the Probitas Foundation, which not only made it possible to purchase the equipment and reagents to launch the Xpert study, but also strengthen the capacity of the laboratory and local staff.

Authors' addresses: María Luisa Aznar, Cristina Bocanegra, and Israel Molina, PROSICS Barcelona and Medicine Department, Tropical Medicine and International Health Unit, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, E-mails: maznar@gmail.com, cristinabocanegra@gmail.com, and israelmolina@gmail.com. María Magros Moreno, Eva Gil Olivas, Ariete Nidia Eugénio, Adriano Zacarias, Domingos Katimba, Estevao Gabriel, and Maria Teresa López García, Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola, E-mails: mlamor14@yahoo.es, evagilolivas1982@gmail.com, arieteindia@yahoo.com, adrianozacarias1967@yahoo.com, domingoskatimba1977@yahoo.com, estevaogabriel1968@yahoo.com, and mterefogs2@yahoo.es. Ariadna Rando Segura, Mateu Espasa, Elena Sulleiro, Tomas Pumarola, and Maria Teresa Tórtola, Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, E-mails: ariadnarando@gmail.com, mespasa@vhebron.net, esulleir@vhebron.net, t.pumarola@vhebron.net, and tortola@vhebron.net. Jacobo Mendioroz, Support Research Unit, Territorial Health Management of Central Catalonia, Catalonia, Spain, E-mail: jmendioroz.cc.es@gencat.cat.

REFERENCES

- World Health Organization, 2018. *Global Tuberculosis Report 2018*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/ris/handle/10665/274453>. Accessed March 15, 2019.
- Rando-Segura A et al., 2018. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a rural setting, Angola. *Emerg Infect Dis* 24: 569–572.
- World Health Organization, 2018. *WHO Treatment Guidelines for Drug-Resistant Tuberculosis—2016 Update*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization, 2018. *Rapid Communication: Key Changes to Treatment of Multidrug- and Rifampicin-Resistant Tuberculosis (MDR/RIF-TB)*. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Lessem E et al., 2015. Access to new medications for the treatment of drug-resistant tuberculosis: patient, provider and community perspectives. *Int J Infect Dis* 32: 56–60.
- Azner M et al., 2019. Prevalence and risk factors of multidrug-resistant tuberculosis in Cubal, Angola: a prospective cohort study. *Int J Tuberc Lung Dis* 23: 67–72.
- de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Slyam A, Nishida C, Siekmann J, 2007. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 85: 660–667.
- WHO Multicentre Growth Reference Study Group, 2006. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl* 450: 76–85.
- ICTDR Investigator Manual, 2003. *Monitoring and Reporting Adverse Events*. Rockville, MD: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).
- Angola Ministry of Health, 2003. *Plano Estratégico Nacional para as Infecções de Transmissão Sexual, VIH/SIDA 2003–2008*. Luanda, Angola: Ministério de Saúde, República de Angola.
- World Health Organization, 2013. *Definitions and Reporting Framework for Tuberculosis – 2013 Revision*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Xu C, Pang Y, Li R, Ruan Y, Wang L, Chen M, Zhang H, 2018. Clinical outcome of multidrug-resistant tuberculosis patients receiving standardized second-line treatment regimen in China. *J Infect* 78: 348–353.
- Theron G, Peter J, Dowdy D, Langley I, Squire SB, Dheda K, 2014. Do high rates of empirical treatment undermine the potential effect of new diagnostic tests for tuberculosis in high-burden settings? *Lancet Infect Dis* 14: 527–532.
- Lawn SD, Ayles H, Egwaga S, Williams B, Mukadi YD, Santos Filho ED, Godfrey-Faussett P, Ganich RM, Hantjes AD, 2011. Potential utility of empirical tuberculosis treatment for HIV-infected patients with advanced immunodeficiency in high TB-HIV burden settings. *Int J Tuberc Lung Dis* 15: 287–295.
- Yang TW, Paik HO, Jang HN, Yang JH, Kim SH, Moon SH, Byun JH, Lee CE, Kim JW, Kang DH, 2017. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea: a retrospective study. *Medicine (Baltimore)* 96: e7482.
- Schnippel K, Firnhaber C, Beharu R, Page-Shipp L, Sinanovic E, 2017. Adverse drug reactions during drug-resistant TB treatment in high HIV prevalence settings: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 72: 1871–1879.
- Nathanson E, Gupta R, Huamani P, Leimane V, Pasechnikov AD, Tupasi TE, Vink K, Jarantilo E, Espinal MA, 2004. Adverse events in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: results from the DOTS-Plus initiative. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 1382–1384.
- Huanga H, Bastard M, Kamene M, Wanjala S, Arnold A, Ocuho N, Chikwanha I, Vansine F, 2017. Outcomes from the first multidrug-resistant tuberculosis programme in Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis* 21: 314–319.
- Bhushan B, Chander R, Kajal NC, Ranga V, Gupta A, Bherli H, 2014. Profile of adverse drug reactions in drug resistant tuberculosis from Punjab, India. *Indian J Tuberc* 61: 318–324.
- Carroll MW et al., 2012. Frequency of adverse reactions to first- and second-line anti-tuberculosis chemotherapy in a Korean cohort. *Int J Tuberc Lung Dis* 16: 961–966.
- Wu S, Zhang Y, Sun F, Chen M, Zhou L, Wang N, Zhan S, 2016. Adverse events associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Am J Ther* 23: e521–e530.
- van Altena R, Dijkstra JA, van der Meer ME, Borjas Howard JF, Kostelnik JG, van Sodding D, van der Werf TS, Aiftenaar JW, 2017. Reduced chance of hearing loss associated with therapeutic drug monitoring of aminoglycosides in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 61: e01400–16.
- Modongo C, Paspanodya JG, Zetola NM, Williams SM, Sitogo G, Gumbo T, 2015. Amikacin concentrations predictive of ototoxicity in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 6337–6343.
- Lee SS et al., 2016. Frequency and risk factors of drug-induced liver injury during treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 20: 800–805.
- Keshavjee S, Gelmanova IY, Shin SS, Mishustin SP, Andrew YG, Atwood S, Furin JJ, Miller A, 2012. Hepatotoxicity during treatment for multidrug-resistant tuberculosis: occurrence, management and outcome. *Int J Tuberc Lung Dis* 16: 596–603.
- Törün T, Güngör G, Özmen I, Bölükbaşı Y, Maden E, Biçaklı B, Ataç G, Sevim T, Tahaoğlu K, 2005. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 1373–1377.
- Furin JJ et al., 2001. Occurrence of serious adverse effects in patients receiving community-based therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 5: 648–655.
- Isakidis P et al., 2012. Adverse events among HIV/MDR-TB co-infected patients receiving antiretroviral and second line anti-TB treatment in Mumbai, India. *PLoS One* 7: e40781.
- Vega P, Sweetland A, Acha J, Castillo H, Guerra D, Smith Fawzi MC, Shin S, 2004. Psychiatric issues in the management of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 749–759.
- Tupasi TE et al., 2016. Factors associated with loss to follow-up during treatment for multidrug-resistant tuberculosis, the Philippines, 2012–2014. *Emerg Infect Dis* 22: 491–502.
- Van Deun A, Maug AK, Salm MA, Das PK, Sarker MR, Dasu P, Rieder HL, 2010. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 684–692.
- Piubello A, Harouna SH, Souleymane MB, Boukary I, Morou S, Daouda M, Harki Y, Van Deun A, 2014. High cure rate with standardised short-course multidrug-resistant tuberculosis treatment in Niger: no relapses. *Int J Tuberc Lung Dis* 18: 1188–1194.
- Sotgiu G, Tiberi S, Centis R, D'Ambrosio L, Fuentes Z, Zumla A, Migliorini GB, 2017. Applicability of the shorter "Bangladesh regimen" in high multidrug-resistant tuberculosis settings. *Int J Infect Dis* 56: 190–193.
- Dheda K, Cox H, Esmail A, Wasserman S, Chang KC, Lange C, 2018. Recent controversies about MDR and XDR-TB: global implementation of the WHO shorter MDR-TB regimen and bedaquiline for all with MDR-TB? *Respirology* 23: 36–45.

1 **Title of the manuscript:** Molecular characterization of *rpoB* gene mutations in isolates from
2 tuberculosis patients in Cubal, Republic of Angola.

3 **Author's name:** Ariadna Rando Segura¹ (a), María Luisa Aznar¹ (b, c), María Milagros
4 Moreno (c), Mateu Espasa Soley (a), Elena Sulleiro Igual (a), Cristina Bocanegra Garcia (b,
5 c), Eva Gil Olivas (b, c), Arlete N.E. Eugénio (c), Carlos Escartin Huesca (a), Adriano
6 Zacarias (c), Josep Vegue Collado (a), Domingos Katimba (c), Maria Carmen Vivas Cano
7 (a), Estevao Gabriel (c), Maria Teresa López García (c), Tomas Pumarola Suñe (a), Israel
8 Molina Romero (b), María Teresa Tórtola Fernández (a).

9 ¹These authors were co-principal investigators.

10 **Affiliation/Institution:** (a) Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital,
11 PROSICS Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. (b) Infectious
12 Disease Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Universitat
13 Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. (c) Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal,
14 Angola.

15 **Contact Information - Corresponding Author:** Ariadna Rando Segura. Institution:
16 Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital. Address: Passeig Vall
17 d'Hebron 119 – 129, 08035, Barcelona, Spain. Telephone: +34688903725. E-mail:
18 a.rando@vhebron.net

19 **Running head:** Molecular characterization of rifampicin

20

21 **ABSTRACT**

22 **Background:** Remains unclear the importance of discordant strains with disputed *rpoB*
23 mutations. Here, we aimed to assess the frequency and types of disputed *rpoB* mutations in
24 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Cubal, Angola

25 **Methods:** Samples were collected from patients diagnosed of TB attended in Hospital
26 Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola. DNA sequencing of the *rpoB* gene and MIC by the
27 macrodilution method were performed to isolates that showed resistance to RIF by culture-
28 based DST but were identified as susceptible by GenoType MTBDR_{plus} or not gave
29 hybridization results with the mutation-specific probes, as well as, isolates that showed
30 susceptibility to RIF by culture-based DST but were identified as resistant by molecular
31 methods.

32 **Results:** Among our cases, disputed *rpoB* mutations led to rifampicin resistance in at least
33 10.3% (9/87) of the strains that also exhibited rifampicin resistance on the MRBDR_{plus}
34 assay.

35 **Conclusion:** Disputed *rpoB* mutations occur frequently, 10.3% of rifampicin resistant
36 isolates in Cubal, Angola. This resistance pattern is not always detected by current
37 phenotypic methods; thus, a lower concentration of RIF in DST or screening all
38 phenotypically drug-resistant MTB for *rpoB* mutations is required. However some of these
39 techniques still not readily available in routine clinical microbiology laboratories of high TB-
40 endemic areas where it is most needed.

41 **TEXT WORD ACOUNT:** 2456

42 **N° OF REFERENCES:** 21

43 **N° TABLES AND FIGURES:** 3

44