



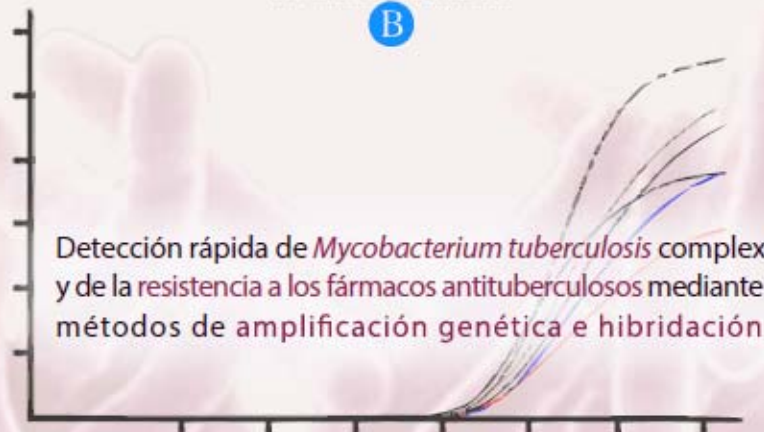
# Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* complex y de la resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación

Raquel Moure González

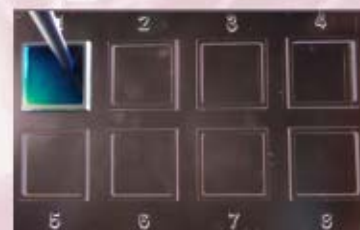
**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada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

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

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



Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* complex y de la resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación



Raquel Moure González

Tesis Doctoral. Programa de Biomedicina  
2013

**Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* complex y de la resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación**

Memoria presentada por Raquel Moure González, para optar al grado de Doctor con Mención Internacional\*, por la Universitat de Barcelona

**Programa de Doctorado en Biomedicina**

**Línea de Investigación: Metabolismo, señalización metabólica y patologías asociadas**

**Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge – Departament de Patologia i Terapèutica Experimental  
Hospital Universitari de Bellvitge**

Vº Bº del Director de Tesis

Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega  
Professor Agregat de la Universitat de Barcelona  
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Doctoranda

Raquel Moure González

L'Hospitalet de Llobregat, Noviembre de 2013

*\*En cumplimiento de la normativa vigente de la Mención Internacional de Doctorado (RD 99/2011, Artículo 48) el apartado de Summary y Conclusions están redactados en inglés.*



**Departament de Micobacteris. Servei de Microbiologia.**  
**Hospital Universitari de Bellvitge.**

**Departament de Patologia i Terapèutica Experimental.**  
**Facultat de Medicina. Campus de Bellvitge.**  
**Universitat de Barcelona.**

El Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega, Jefe del Laboratorio de Micobacterias del Hospital Universitari de Bellvitge y Profesor Agregado de la Universitat de Barcelona,

HACE CONSTAR:

que el trabajo experimental y la redacción de la memoria de tesis doctoral titulada:

**Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* complex y de la resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación**

han sido realizados por Raquel Moure González, y considera que es apta para la lectura y defensa pública delante de un tribunal, para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Barcelona.

Y para dejar constancia, firma el presente documento.

L'Hospitalet de Llobregat,                      de                      de 2013

Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega



**Departament de Micobacteris. Servei de Microbiologia.**  
**Hospital Universitari de Bellvitge.**

**Departament de Patologia i Terapèutica Experimental.**  
**Facultat de Medicina. Campus de Bellvitge.**  
**Universitat de Barcelona.**

El Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega, Jefe del Laboratorio de Micobacterias del Hospital Universitari de Bellvitge y Profesor Agregado de la Universitat de Barcelona,

HACE CONSTAR que las revistas científicas donde se recogen los artículos derivados de la tesis doctoral titulada “Detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* complex y de la resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación”, poseen los siguientes **factores de impacto** (Journal Citation Reports, publicado por Thomson Reuters, 2013):

Artículo 1

Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method.

**Moure R**, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcaide F.

*J Clin Microbiol.* 2011 Mar; 49(3):1137-1139. Factor de impacto: 4,068.

Artículo 2

Effectiveness of an integrated real-time PCR method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples in a low prevalence area.

**Moure R**, Martín R, Alcaide F.

*J Clin Microbiol.* 2012 Jan; 50(2):513-515. Factor de impacto: 4,068.

Artículo 3

GeneXpert for smear-negative pulmonary tuberculosis: does it play a role in low-burden countries?.

Muñoz L, **Moure R**, Porta N, González L, Guerra R, Alcaide F, Santín M.  
*Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013 Mar; 75(3):325-326. Factor de impacto: 2,260.

#### Artículo 4

Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by a molecular method based on GenoQuick technology.

**Moure R**, Torres M, Martín R, Alcaide F.

*J Clin Microbiol*. 2012 Jun; 50(6):2089-2091. Factor de impacto: 4,068.

#### Artículo 5

Detection of streptomycin and quinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a low-density DNA array.

**Moure R**, Tudó G, Medina R, Vicente E, Caldito JM, Codina G, Coll P, Español M, González-Martín J, Rey-Jurado E, Salvadó M, Tórtola MT, Alcaide F.

*Tuberculosis (Ed.)*. 2013 Aug; 93(5):508-514. Factor de impacto: 3,033.

#### Artículo 6

Characterization of the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Barcelona and rapid detection of main mutations related to ethambutol resistance using a low-density DNA array.

**Moure R**, Español M, Tudó G, Vicente E, Coll P, González-Martín J, Mick V, Salvadó M, Alcaide F.

*J Antimicrob Chemother*. Aceptado el 14 de Octubre de 2013; doi 10.1093/jac/dkt448. Factor de impacto: 5,338.

### **ANEXO**

Silent mutation in *rpoB* detected from clinical samples with rifampin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis*.

**Moure R**, Martín R, Alcaide F.

*J Clin Microbiol*. 2011 Oct; 49(10):3722. Factor de impacto: 4,068.

Y para dejar constancia, firma el presente documento.

L'Hospitalet de Llobregat,                      de                      de 2013

Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega



*A mis padres y a mi hermana.  
En memoria de Antonio y Jaime.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Muchos de los que llegan al final de una tesis doctoral, dicen frases como “si lo hubiera sabido, no habría empezado” o “esto no ha sido como yo imaginaba”. Mi etapa de tesis ha tenido momentos muy gratificantes pero, de igual forma, también ha tenido momentos duros. En especial, cuando tras un año y medio de esfuerzos con un proyecto, éste se viene abajo porque otro grupo de investigación se adelanta en publicar esos mismos resultados, lo que nos obliga a reorientar la tesis y cambiar de proyecto. En esos momentos, la idea de tirar la toalla coge fuerza y se hace difícil continuar. Pero lo hice... Ha hecho falta mucho esfuerzo, personal pero también ajeno. Por ello, no querría dejar de agradecer a las personas e instituciones sin las cuales haber llegado hasta aquí hubiera sido imposible, espero poder acordarme de todos ellos.

En primer lugar, agradecer a mi director, el Dr. Fernando Alcaide, por haber confiado en mí para llevar a cabo un proyecto de tesis. Siempre he sentido que depositaba una gran fe en mi capacidad. También quiero agradecerle su espíritu docente y su paciencia en enseñarme el lenguaje de la comunicación científica, al que estaba poco acostumbrada. A día de hoy, escribir un artículo es casi más fácil que escribir estas líneas...

Al Dr. Rogelio Martín, y en los últimos meses la Dra. M.Ángeles Domínguez, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge (HUB).

Muchas gracias también a la Dra. Fina Liñares que, sin tener responsabilidad directa conmigo, se ha interesado y ha intercedido en muchas ocasiones por mí.

Al Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) por otorgarme una beca pre-doctoral IDIBELL, sin la que todo esto no hubiera sido posible. A la Universitat de Barcelona, y al programa de Doctorado de Biomedicina. Gracias a la Dra. Teresa Vinuesa y a la comisión de doctorado que ha supervisado mi proyecto. También al Dr. Miquel Viñas, por hacer posible la financiación de la impresión de los ejemplares de la tesis.

Otro aspecto fundamental para la realización de esta tesis, ha sido la buena colaboración con los doctores de la Unidad Clínica de Tuberculosis del HUB, el Dr.

Miguel Santín y la Dra. Laura Muñoz. Me ha encantado participar en algunos de sus estudios clínicos, he aprendido muchísimo. Gracias por su profesionalidad, su disponibilidad y por implicarme siempre que han podido en sus proyectos.

También quiero agradecer a los investigadores del Grupo de Micobacterias de Barcelona, por su buen hacer en el proyecto FIS multicéntrico en el que hemos colaborado y del cual han surgido varios de los trabajos presentados en esta tesis: Julià González, Griselda Tudó y Emma Rey (Hospital Clínic); Pere Coll, Montserrat Español, Michel Montemayor y Rebeca Medina (Hospital de Sant Pau); Eva Vicente y Margarita Salvadó (Laboratori de Referència de Catalunya) y Núria Martín, M. Gemma Codina y M. Teresa Tórtola (Hospital de la Vall d'Hebron).

I would also like to thank Dr. Daniela Cirillo and the staff at the Emerging Bacterial Pathogens Unit of the Fondazione San Raffaele (Milano) where I did my 3-months stage for the International Mention of the PhD. It was an honour to be in such an outstanding research laboratory where I could learn new methodologies and the dynamic of work at a WHO Supranational Reference Laboratory for TB control.

El día a día con mis compañeros ha sido esencial. Gracias a los trabajadores del Departamento de Micobacterias, con especial cariño a Joaquim Parés. M'alegro que la teva jubilació hagi coincidit amb la fi de la meva tesi, es fa estrany el laboratori sense tu. T'admiro per la teva implicació i dedicació. Moltes gràcies pels consells i la col.laboració en fer que ens poguéssim compatibilitzar per utilitzar la cabina i el material...t'agraeixo molt la paciència i et desitjo el millor en la teva nova vida.

Y nadie mejor para entender las luces y sombras de un doctorado, que el resto de becarios que están también con la tesis. Muchas gracias por las charlas de “desahogo”, consejos y momentos de congresos con todos ellos, a Meritxell, a Carmen, a Arnau també pels vells temps de partits i sopars a casa teva, a Dora que ya pasó a mejor vida (entendida como la de post-doc, claro...) y que al ir un paso por delante siempre me aconsejaba y guiaba con los trámites del doctorado, y cómo no a Mariana, que merece una mención especial más adelante. No quiero olvidarme de Valentina, que también fue una persona importante cuando estuvo en el Servicio, que me dio buenos consejos profesionales y personales, y muchos momentos divertidos.

Gracias a los facultativos del Servicio de Microbiología del HUB y a los residentes porque también me han echado algún cable en alguna ocasión, como Dàmaris que me ayudó con alguna de las fotos incluidas en la introducción. También a los estudiantes en prácticas: Esmeralda, Jimena, Joan, Eduardo, Míriam,... gracias por las horas que dedicaron a colaborar con mis proyectos. Gracias en especial a Jose María (Caldito) por el año y pico compartido en el laboratorio y su ánimo siempre alegre, y a Ester con quien compartí el proyecto del cultivo celular en mi última etapa, ha estat un temps breu però m'ha encantat coincidir amb tu, i sobretot moltíssimes gràcies per l'ajut amb el disseny de portada de la tesi.

A los becarios y técnicos del Servicio de Microbiología del HUB que se han convertido en algo más que compañeros y considero mis amigos. A Raúl, el más veterano de ellos, creo que los dos hemos aprendido que la primera impresión a veces falla, ¿verdad? aquí estamos, 5 años después, compartiendo buenos momentos. A Cris (la otra floreta), qué pena haber coincidido contigo ya en la recta final, pero ha dado tiempo a pasar muy buenos ratos juntas dentro y fuera del HUB...También a Edu, otro de los veteranos que conozco hace más tiempo; aunque hemos pasado por varias etapas, creo que el cariño mutuo prevalece, ojalá se mantenga en el futuro. Finalmente a Mariana, no acabaría nunca de enumerar las mil y una anécdotas que hemos vivido juntas en lo laboral y en lo personal. Te admiro por ser tan luchadora en todos los aspectos de la vida, y sobre todo por ser tan buena persona. Siempre has estado ahí cuando he necesitado una mano, ¡gracias!.

A mis amistades fuera del hospital, por intentar comprender lo que hacía y animarme.

Y sobre todo a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermana. Soy una afortunada por teneros a mi lado, tengo la certeza de que no podría haber llegado hasta el final de esta etapa sin vuestra confianza en mí, vuestros ánimos y cariño.









Índice



<b>SUMMARY</b>	1
<b>ABREVIATURAS</b>	9
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA TUBERCULOSIS	17
1.1. Primeros indicios históricos de la enfermedad	17
1.2. El descubrimiento del bacilo tuberculoso	17
2. ETIOLOGÍA	17
2.1. Género <i>Mycobacterium</i>	18
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	19
2.2.1. Especies	19
2.2.2. Características estructurales y fisiológicas	20
2.2.3. Genómica y proteómica	20
3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN	21
3.1. Situación de prevalencia e incidencia en el mundo	21
3.2. Principales factores de riesgo de tuberculosis	23
3.3. Transmisión de la infección tuberculosa	25
3.4. Estudios epidemiológicos de la transmisión: técnica de tipado de cepas circulantes	25
3.4.1. IS6110	25
3.4.2. <i>Spoligotyping</i> (“Spacer oligotyping”)	27
3.4.3. MIRUs	28
4. CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA	29
4.1. Afectación pulmonar	29
4.2. Afectación extrapulmonar	30
4.2.1. Tuberculosis ganglionar (adenitis tuberculosa)	30
4.2.2. Tuberculosis pleural	31
4.2.3. Tuberculosis genitourinaria	31
4.2.4. Tuberculosis osteoarticular	31
4.2.5. Tuberculosis meníngea	31
4.2.6. Tuberculosis peritoneal	32
4.2.7. Tuberculosis miliar (diseminada)	32
5. PATOGENIA	32
5.1. Inmunología	32

5.1.1.	Interacción huésped-bacilo tuberculoso. Teoría clásica	32
5.1.2.	Hipótesis dinámica	33
5.2.	Virulencia de <i>M. tuberculosis</i> complex	35
6.	DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA	36
6.1.	Método convencional de diagnóstico de la ITL:	
	prueba de la tuberculina	36
6.2.	Nuevos métodos de diagnóstico de la ITL: detección de IFN $\gamma$	37
6.2.1.	QuantIFERON-TB Gold In-Tube (QF-IT)	38
6.2.2.	T-SPOT.TB (ELISPOT)	39
7.	DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA	40
7.1.	Toma de muestras	40
7.2.	Baciloscopia	41
7.3.	Cultivo	42
7.3.1.	Medios líquidos	43
7.3.2.	Medios sólidos	44
7.4.	Identificación a partir de aislamiento clínico	44
7.4.1.	Pruebas fenotípicas	44
7.4.2.	Pruebas cromatográficas	45
7.4.3.	Pruebas inmunocromatográficas	45
7.4.4.	Pruebas moleculares	46
7.4.4.1.	Sondas de ácidos nucleicos	46
7.4.4.2.	Pruebas basadas en amplificación genética	46
7.4.4.2.1.	PCR-RFLP del <i>hsp65</i> (PRA)	47
7.4.4.2.2.	Secuenciación del ADNr 16S	47
7.4.4.2.3.	Pruebas de hibridación en fase sólida	48
7.5.	Nuevos métodos para la detección directa en muestra	49
7.5.1.	Micobacteriófagos	49
7.5.2.	Técnicas moleculares	50
7.5.2.1.	Amplificación de la secuencia diana y posterior detección del producto amplificado	51
7.5.2.2.	Técnicas de PCR a tiempo real	53
8.	TRATAMIENTO	56
8.1.	Tratamiento de la enfermedad tuberculosa	56
8.1.1.	Principios del tratamiento farmacológico	56
8.1.2.	Principales fármacos antituberculosos (Grupo 1)	57
8.1.3.	Otros fármacos antituberculosos (Grupos 2-5)	58

8.1.4.	Pauta estándar de tratamiento farmacológico	59
8.1.5.	Pautas especiales de tratamiento farmacológico	60
8.1.6.	Nuevos fármacos en desarrollo	61
8.2.	Tratamiento de la infección tuberculosa latente	62
9.	<b>MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS PRINCIPALES FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS</b>	62
9.1.	Resistencia a la isoniazida	63
9.2.	Resistencia a la rifampicina	64
9.3.	Resistencia al etambutol	65
9.4.	Resistencia a la pirazinamida	66
9.5.	Resistencia a los inyectables (Grupo 2)	67
9.6.	Resistencia a las fluoroquinolonas (Grupo 3)	69
10.	<b>ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS</b>	70
10.1.	Métodos fenotípicos convencionales	70
10.2.	Métodos de detección rápida de la resistencia antibiótica	72
10.2.1.	Micobacteriófagos	72
10.2.2.	Técnicas moleculares	73
10.2.2.1.	<i>PCR-single-strand conformation polymorphism</i> (SSCP)	73
10.2.2.2.	Hibridación en fase sólida (tiras celulosa)	73
10.2.2.3.	Técnicas de PCR a tiempo real	76
10.2.2.4.	<i>Microarrays</i>	77
10.2.2.5.	Secuenciación	78
11.	<b>VACUNAS</b>	78
11.1.	Vacuna actual	78
11.2.	Nuevas vacunas profilácticas	79
11.2.1.	Vacunas basadas en subunidades antigénicas	80
11.2.2.	Vacunas basadas en bacilos vivos	80
11.3.	Nuevas vacunas terapéuticas	81
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	87
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	95
<b>IV.</b>	<b>PUBLICACIONES</b>	
	<u>Bloque 1</u>	
	Artículo 1	103

Artículo 2	109
Artículo 3	115
Artículo 4	119
<u>Bloque 2</u>	
Artículo 5	127
Artículo 6	137
<b>V. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>151</b>
<b>VI. CONCLUSIONS</b>	<b>169</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>177</b>
<b>VIII. ANEXO</b>	<b>201</b>

Summary





Tuberculosis remains one of the biggest health threats, causing around 8.5 million of new cases and 1.5 million deaths worldwide, each year. The two cornerstones for the tuberculosis control are rapid diagnosis and rapid detection of drug resistance, allowing prompt initiation of the adequate pharmacological treatment and avoiding the spread of the disease to other individuals.

Conventional microbiological methodologies for tuberculosis diagnosis are the smear microscopy and the mycobacterial culture. Nevertheless, the microscopy has low sensitivity (45-80% among tuberculosis culture-confirmed specimens) especially in cases of extrapulmonary tuberculosis (EPTB), and *Mycobacterium tuberculosis* complex culture is very low (up to 6 weeks until growth).

In the past two decades, molecular methodologies have emerged as valuable tools for rapid diagnosis in the field of tuberculosis. Techniques based on PCR (polymerase chain reaction) and posterior hybridization with DNA probes complementary to the amplified product, are probably the most relevant and frequently developed molecular methodologies in the area of rapid diagnosis of tuberculosis and drug resistance. In 2009, a new commercial system, the Xpert MTB/RIF assay (Cepheid, USA) was launched for detection of the presence of *M. tuberculosis* complex as well as its resistance to rifampin (RMP), directly in pulmonary clinical samples. This system integrates DNA extraction and a real-time PCR with 5 probes including the *rpoB* gene, which is the target related to RMP resistance. Another commercial system for direct detection of *M. tuberculosis* complex, developed in 2010, is the GenoQuick MTB (Hain Lifescience, Germany) which is based on a conventional PCR of the IS6110 and subsequent hybridization by lateral-flow dipstick.

On the other hand, in recent years, microarrays based on PCR and further hybridization with immobilized oligonucleotide probes, have been described as a useful methodology for rapid detection of main mutations related to anti-tuberculous drug resistance. In 2006, our study group (Mycobacteria study group in Barcelona) developed a low-density low-cost DNA microarray for rapid detection of multi-drug resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis* complex.

The aims of this thesis are divided into two topics: 1) direct detection of *M. tuberculosis* complex, and 2) rapid detection of anti-tuberculous drug resistance. In the first part, we focused on the evaluation of two new commercial techniques for

direct detection of *M. tuberculosis* complex, in pulmonary and also in extrapulmonary specimens, especially in those with negative smear microscopy. Secondly, we focused on rapid detection of anti-tuberculous drug resistance by designing and evaluating two microarray systems for the detection of main mutations related to resistance to injectable drugs, fluoroquinolones, and ethambutol.

In the first study, the first evaluation of the Xpert MTB/RIF focused only in smear-negative specimens, we determined the effectiveness of the test for direct detection of *M. tuberculosis* complex mostly in pulmonary specimens. The sensitivity of the Xpert MTB/RIF for the detection of *M. tuberculosis* complex was determined by the retrospective analysis of 85 culture-confirmed clinical specimens with *M. tuberculosis* complex (78 pulmonary). On the other hand, the specificity was determined by analyzing 20 smear-positive clinical samples having NTM (non-tuberculous mycobacteria), and 20 mycobacterial culture-negative specimens. Besides, seven of the pulmonary samples with *M. tuberculosis* complex were resistant to RMP. The Xpert MTB/RIF was able to detect *M. tuberculosis* complex in a 78.2% of the pulmonary samples, and it also detected 100% of the mutations related to RMP resistance. Moreover, the specificity was of 100% since the technique showed a negative result in all 40 samples without *M. tuberculosis* complex.

In a second study, the utility and accuracy of this technique for the diagnosis of EPTB was studied. The analysis of 108 extrapulmonary samples from different sources showed a global sensitivity of 58.3%. However, this sensitivity was variable depending on the origin of the sample. Thus, sterile specimens and especially pleural fluids showed the lower percentage of positivity (40.5% and 26.9%, respectively), whereas abscesses and lymph nodes showed the highest values of sensitivity, similar to pulmonary specimens.

Although the inoculum-dependance of the Xpert MTB/RIF was proven in both studies and despite the high economical cost of the test, we concluded that this system was fully suitable for direct detection of *M. tuberculosis* complex, due to the good results of sensitivity, specificity and predictive values, as well as the rapidity and simplicity of the technical performance.

Given the mentioned economical cost of the Xpert MTB/RIF, but once proven its advantages for rapid diagnosis, we tried to determine the potential cost-effectiveness of using this technique in daily routine, in an area of low-medium incidence of tuberculosis. Fifty cases of patients having pulmonary tuberculosis with a smear-negative microscopy, where the diagnosis was delayed until confirmation by culture or clinical complementary tests, were retrospectively compared to 100 control cases which had a positive smear therefore being early diagnosed. The 50 cases were analyzed by the Xpert MTB/RIF and the positive result of this test was used as a surrogate for smear-positive microscopy. We concluded that the use of the Xpert MTB/RIF could have advanced the tuberculosis diagnosis in 30% of the cases in our area. We also found out that the case group showed a delay on the starting of the treatment and contact tracing compared to the control group (9 and 22 days versus 2 and 4 days, respectively). In terms of economical costs, the case group expended much more resources than the control group (mean of 2,426.58 € versus 254.18 €). The conclusion is that Xpert MTB/RIF could have a potential cost-benefit if used in the daily practice, in cases of smear-negative microscopy and high suspicion of tuberculosis. As a consequence of our results, the Xpert MTB/RIF was implemented in our laboratory for daily routine practice in tuberculosis diagnosis. Besides, the first and second study (effectiveness of Xpert MTB/RIF in smear-negative pulmonary and extrapulmonary specimens) were included in a systematic review made by the Cochrane Institute, which serves as reference for the updated guidelines of the WHO regarding the use of Xpert MTB/RIF assay.

Besides, our laboratory carried out the first external evaluation worldwide using another technique for direct detection of *M. tuberculosis* complex, the GenoQuick MTB (Hain Lifescience). The analysis of 32 smear-positive samples and 64 smear-negative specimens (most of them pulmonary) showed a 100% and 78.1% of sensitivity, respectively. The specificity, when analyzing 15 NTM, was 92.9%. This technique resulted to be less expensive and less dependant of the inoculum size than other commercially available tests, though the performance was more complex and the risk of cross-hybridization was considerable.

In the first study of the second part of the thesis, a low-cost low-density microarray based on a previously developed platform for multi-drug resistance, was designed for the detection of the main mutations most frequently described to be related to streptomycin (SM), second-line anti-tuberculous injectable drugs and fluoroquinolones (FQ). The targets included were *rrs*, *rpsL* and *gyrA* genes. We

studied a collection of 108 resistant strains (to streptomycin and/or fluoroquinolones) and 20 susceptible isolates. The microarray detected 92.5% of the mutations related to SM and 87.5% to FQ. The total correlation of microarray results with sequencing was found in 82.4% of the isolates. The main limitation found in this microarray, was the cross-hybridization in *gyrA* due to the existence of polymorphisms next to informative codons (related to resistance). However, the good results of correlation with sequencing as well as the low cost, simplicity and flexibility of this system make this prototype to be considered a first approach into achieving a microarray for the detection of extensively drug-resistant tuberculosis.

The last study included in the thesis, consisted on a characterization of the resistance to ethambutol (EMB; included in the standard chemotherapy against tuberculosis) which was conducted to determine the most frequent mutations in *embB* in our area and to establish the relation of the presence of these mutations with levels of phenotypical resistance and epidemiological features. Among 53 EMB-resistant strains studied, mutations in codon 306 were predominant and found in 53.7% of the EMB-resistant isolates. There were other codons affected; *embB406* was mutated in 26.8% of the cases, and was related with higher levels of resistance (equal or higher than 15 mg/L) and multi-drug resistance. On the other hand, the role of these two main mutations (*embB306* and *embB406*) in phenotypic resistance was proven, as a wide collection (n=702) of EMB-susceptible strains showed a wild-type sequence in these positions. Finally, the results of this molecular characterization were the basis to design a microarray (same platform than previously described) for rapid detection of main mutations in *embB* (codon 306, 328, 378, 406, and 497). The 53 characterized EMB-resistant strains were analyzed by the microarray and it showed 100% of sensitivity and specificity, thus demonstrating to be a good method for the rapid detection of mutations related to EMB resistance.

In conclusion, molecular methodologies evaluated in this thesis, which were based on genetic amplification and further hybridization are valuable tools to be considered for rapid detection of *M. tuberculosis* complex and anti-tuberculous drug resistance. The integrated real-time PCR (Xpert MTB/RIF) demonstrated to be accurate and easy to perform, both in pulmonary and extrapulmonary specimens and can be cost-effective in an area of low-medium incidence of tuberculosis like ours, if applied to smear-negative cases with high suspicion of tuberculosis. Additionally, the PCR and lateral-flow dipstick technique, GenoQuick MTB, showed good sensitivity and

specificity, at a low cost, though with more complexity and risk of contamination. On the other hand, the microarray platform developed for rapid detection of SM, FQ and EMB showed up as an alternative for rapid diagnosis of drug resistance, with the advantage, compared to other commercially available techniques, of being lower cost and including more targets and codon substitutions, as well as the flexibility to exchange them, depending on the needs of each setting.



Abreviaturas





**A**

AAR	Ácido-alcohol resistencia
ACP	<i>Acyl carrier protein</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>

**B**

BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
------	-----------------------------------

**C**

CIM	Concentración inhibitoria mínima
-----	----------------------------------

**D**

DR	<i>Direct repeats</i>
----	-----------------------

**E**

E	Etambutol
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunosorbent spot</i>
ERDR	<i>Ethambutol resistance determining region</i>

**F**

FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FQ	Fluoroquinolonas
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>

**G**

GLC	<i>Gas-liquid chromatography</i>
-----	----------------------------------

**H**

HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
H	Isoniazida

**I**

ICER	<i>Incremental cost effectiveness ratio</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IGRA	<i>Interferon gamma release assay</i>
IS	<i>Interspersed repeats</i>
ITL	Infeción tuberculosa latente

**L**

LCR	Líquido ceforraquídeo / <i>Ligase chain reaction</i>
LRP	<i>Luciferase reporter phage</i>

**M**

MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MIRU	<i>Mycobacterial interspersed repetitive unit</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>

**N**

NAA	<i>Nucleic acid amplification</i>
NASBA	<i>Nucleic acid sequence-based amplification</i>

**O**

OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open reading frame</i>

**P**

pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POA	<i>Pyrazinoic acid</i>
PRA	<i>PCR-restriction enzyme pattern analysis</i>

**Q**

QRDR	<i>Quinolone resistance determining region</i>
------	--

**R**

R	Rifampicina
RRDR	<i>Rifampin resistance determining region</i>

**S**

S	Estreptomicina
SDA	<i>Strand displacement amplification</i>
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>

**T**

TDO	Tratamiento directamente observado
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TMA	<i>Transcription-mediated amplification</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TR	<i>Tandem repeats</i>

**V**

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VNTR	<i>Variable number tandem repeats</i>

**W**

WHO	<i>World Health Organization</i>
-----	----------------------------------

**X**

XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>
-----	-----------------------------------

**Z**

Z	Pirazinamida
---	--------------







# I. INTRODUCCIÓN GENERAL





## 1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA TUBERCULOSIS

### 1.1. Primeros indicios históricos de la enfermedad

La bacteria causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, ha acompañado al hombre desde hace millones de años. Gracias al estudio de restos humanos hallados en yacimientos arqueológicos, sabemos que la bacteria de la tuberculosis cuenta con un largo pasado evolutivo. En concreto, se cree que el género *Mycobacterium* se originó hace 150 millones de años y que las formas modernas de este complejo, tal como las conocemos a día de hoy, datan de hace más de 15.000 años [1].

Más adelante en la época de la revolución industrial, y a medida que la densidad poblacional comenzó a aumentar en las grandes ciudades de Europa y América, el hacinamiento y las malas condiciones de salubridad conllevaron la aparición de las grandes epidemias de la era moderna. En el siglo XVII, llegó la primera epidemia en Europa, denominada “la gran plaga blanca”, que se prolongó durante cerca de dos siglos y se convirtió en la primera causa de mortalidad durante muchos años.

### 1.2. El descubrimiento del bacilo tuberculoso

En el siglo XVI ya se especuló sobre la naturaleza contagiosa de la tuberculosis, introduciendo el concepto de “partículas” que podían transmitir la enfermedad de una persona a otra. Pero es a finales del siglo XIX cuando un científico alemán, Robert Koch (1843-1910) emitió su primera conferencia acerca de la etiología de la tuberculosis. Koch consiguió aislar, de lesiones pulmonares, el bacilo tuberculoso en medios artificiales de cultivo, definió al microorganismo como el verdadero agente causal de la enfermedad y le dio el nombre de “Bacterium tuberculosis”. En 1896, Lehmann y Neumann lo rebautizarían con el definitivo *Mycobacterium tuberculosis*. Koch desarrolló, además, nuevas tinciones basadas en azul de metileno y pardo bismarck, para la visualización del bacilo. Finalmente, Koch especuló con la posible inhibición del desarrollo de la infección mediante inoculación de un extracto purificado del propio bacilo, la tuberculina [2]. Aunque este extracto no resultó finalmente exitoso como terapia, sí constituye el fundamento de la técnica de Mantoux que se utiliza aún hoy día como método de referencia para el diagnóstico de la infección tuberculosa latente (apartado 6.1).

## 2. ETIOLOGÍA

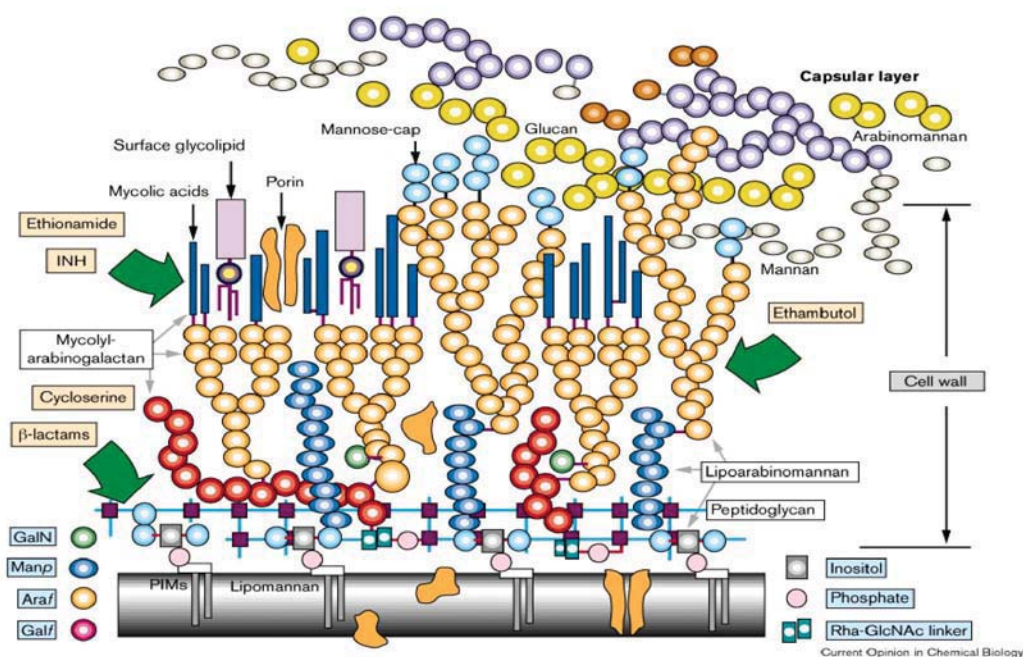
*Mycobacterium tuberculosis* complex pertenece al género *Mycobacterium*, único miembro de la familia *Mycobacteriaceae*, suborden *Corynebacterineae*, orden

*Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, clase *Actinobacteria*, filum *Firmicutes*, del reino *Eubacterias*.

### 2.1. Género *Mycobacterium*

Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito 165 especies hasta la fecha (<http://www.bacterio.net/m/mycobacterium.html>), aunque las nuevas técnicas genéticas y cromatográficas permiten identificaciones mucho más precisas conllevando, por tanto, la continua descripción de nuevas especies micobacterianas. De todas las especies del género *Mycobacterium*, sólo *M. tuberculosis* complex y *Mycobacterium leprae* son estrictamente patógenas, y el resto son más bien colonizantes saprófitos o patógenos oportunistas. Las micobacterias son microorganismos aerobios de 0,2-0,6 µm x 1-10 µm, de forma bacilar recta o ligeramente curvada, inmóviles y no esporulados. En cuanto a su morfología colonial, en medios de cultivo, es variable dependiendo de la especie: desde colonias rugosas-secas hasta cremosas, de color amarillento o ligeramente anaranjado. Algunas especies son capaces de formar pigmento en la oscuridad (escotocromógenas) o en presencia de luz (fotocromógenas).

Uno de los aspectos más particulares del género *Mycobacterium* es su pared celular, que posee un alto contenido lipídico y determina muchas de las características de este género (Figura 1). A parte de otros componentes (ácido meso-diamino pimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa), en la pared micobacteriana hallamos ácidos micólicos de cadena larga, lípidos libres y otros ácidos grasos entre los que destaca el 10-*R*-metilheptadecanoico (o ácido tuberculoesteárico), componente exclusivo del orden *Actinomycetales*. La composición de esta pared condiciona, entre otras cosas, el tipo de tinción empleada para su visualización microscópica. A pesar de que las micobacterias se consideran bacilos Gram positivos, su visualización con esta tinción es difícil. Por ello, es más adecuado emplear tinciones que reflejen la propiedad de ácido-alcohol resistencia (AAR) de las micobacterias: son capaces de retener el colorante básico tras una decoloración con alcohol y ácido. El elevado contenido lipídico confiere una gran hidrofobicidad a la bacteria, asociada a diversas ventajas para el microorganismo como inhibir la propiedad microbicida del huésped y adherirse mejor a las células de éste, o mejorar la adquisición de nutrientes esenciales.

**Figura 1.** Esquema de la pared micobacteriana (tomado de Chatterjee, 1997) [3].

Otro aspecto característico de las micobacterias es su composición nucleotídica en el genoma, ya que el porcentaje de G (guanina) y C (citosina) es inusualmente alto, oscilando entre 62-70%, excepto en *M. leprae* (55%).

Aunque la mayoría de especies del género no son especialmente exigentes en cuanto a requisitos nutricionales, requieren una importante fuente de lípidos debido a su composición estructural. Es por ello que el medio de cultivo sólido empleado más comúnmente para micobacterias (Löwenstein-Jensen) contiene yema de huevo, y los medios de cultivo líquidos contienen ácido oleico. La atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (5-10%) también favorece el crecimiento micobacteriano. Su tiempo de generación oscila entre las 2 y las 20 horas; así, se establecen dos grandes grupos: las micobacterias de crecimiento rápido (menos de 7 días hasta el crecimiento de un subcultivo, en medio Löwenstein-Jensen) y las de crecimiento lento (más de 7 días hasta el crecimiento de un subcultivo, en medio Löwenstein-Jensen).

## 2.2. *Mycobacterium tuberculosis* complex

### 2.2.1. Especies

*M. tuberculosis* complex está constituido por varias especies que poseen más de un 99,9% de homología genética y que, probablemente, descienden de un ancestro común. Las especies del complejo son: a) *M. tuberculosis* (la especie causal de tuberculosis más común en humanos); b) *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium*

*caprae* (causantes de tuberculosis en el ganado vacuno y vacuno o caprino, respectivamente. *M. bovis*, puede transmitirse al ser humano); c) *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium canetti* (causantes inusuales de tuberculosis en África) y d) *Mycobacterium microti* (tuberculosis en roedores) y *Mycobacterium pinnipedii* (patógeno en focas que puede causar tuberculosis zoonótica ocasional en el hombre).

### 2.2.2. Características estructurales y fisiológicas

Además de las características generales del género *Mycobacterium*, las especies de *M. tuberculosis* complex se caracterizan, entre otras cosas, por su elevado tiempo de generación (12-24 horas). Hay varias hipótesis acerca de la razón para esta lentitud replicativa, pero las más plausibles son: a) la limitación en la captación de nutrientes (debido a la gran impermeabilidad de la pared y a la presencia de pocas porinas en la membrana celular) y b) la existencia de tan sólo un operón para la síntesis de ARN [4].

Otro aspecto característico de *M. tuberculosis* complex es la presencia de un componente especial en la capa superficial de la pared celular: la trehalosa 6,6'-dimicolato, también denominado "cord factor". Esta molécula confiere a *M. tuberculosis* complex la capacidad de agregación en forma de "cuerdas" conformadas por agrupaciones de bacilos, visibles en la observación microscópica y fenómeno asociado con características de virulencia del bacilo [5].

Al igual que el resto de especies del género *Mycobacterium*, las especies de *M. tuberculosis* complex son aerobias. Sin embargo, en determinadas circunstancias puede comportarse como microaerófilas y utilizar lípidos como fuente de carbono [6].

Las especies tuberculosas son considerablemente resistentes a condiciones ambientales desfavorables. Tal es el caso de su tolerancia al pH ácido, que le permite resistir a la destrucción en el interior de los macrófagos del huésped. Asimismo, sobreviven a temperaturas extremadamente bajas (resisten a la congelación) durante tiempos prolongados, sin apenas perder su viabilidad.

### 2.2.3. Genómica y proteómica

En los años 90, se inició un proyecto para la secuenciación del genoma completo de varias cepas de *M. tuberculosis* complex, entre ellas la cepa *M. tuberculosis*

H37Rv, que culminó con la publicación de S.T. Cole en 1998 [7], gracias al cual se tiene un mayor conocimiento de las características genéticas del agente causal de la tuberculosis.

El genoma de *M. tuberculosis* H37RV está compuesto por ADN circular de 4.411.532 pb, un tamaño similar al de *Escherichia coli*. Mediante la bioinformática se ha podido inferir los ORFs (*open reading frames*) y se ha estimado la existencia de 4.043 genes que codifican 3.995 proteínas y 50 ARNs estables. Sin embargo, tan sólo la mitad de todos estos ORFs tienen una función biológica asignada; la del resto permanece desconocida [8]. Existe, además, un predominio de los nucleótidos G y C en su ADN (65,6%) y de ciertos aminoácidos: alanina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina. Por otro lado, el genoma de H37Rv incluye elementos de inserción de ADN repetitivo, claves para el estudio epidemiológico de transmisión (apartado 3.4).

### **3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN**

#### **3.1. Situación de prevalencia e incidencia en el mundo**

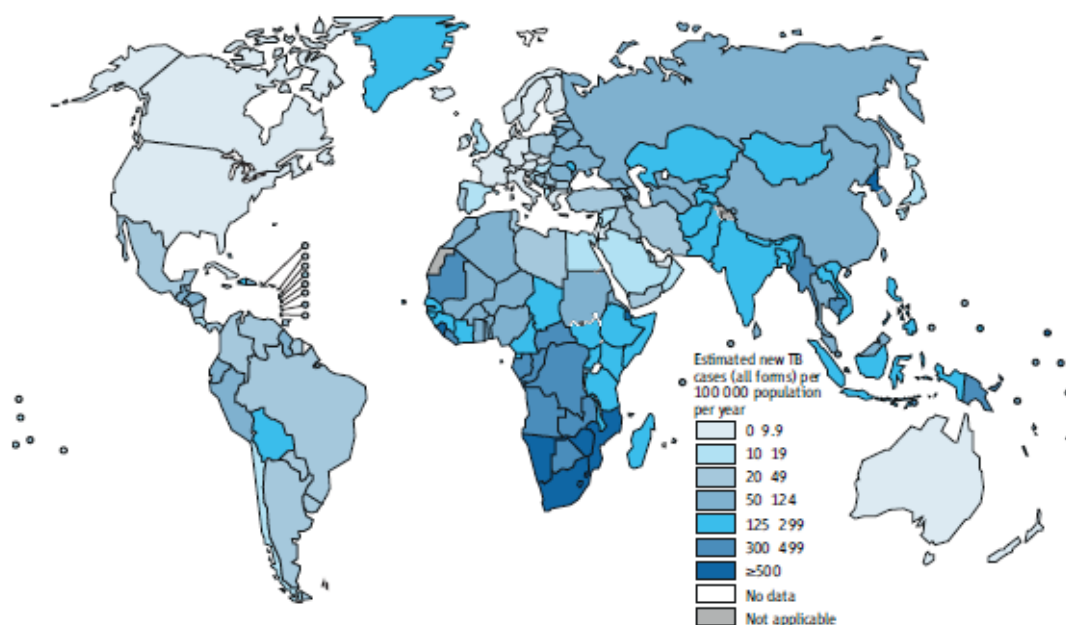
En pleno siglo XXI, la tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes causantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población está infectada con el bacilo de Koch y, aunque en la mayoría de las personas esta infección permanece en fase latente en el huésped a lo largo de toda su vida, cada año aparecen millones de casos nuevos de enfermedad tuberculosa activa.

En el 18º informe de la OMS sobre tuberculosis se estimó la aparición de 8,6 millones de casos nuevos en el año 2012 (intervalo, 8,3 millones-9,0 millones) lo que supone 122 casos por 100.000 habitantes. En cuanto a la distribución por regiones continentales, Asia fue la que concentró el mayor número de casos (58%), seguida por África (27%), la región del Este Mediterráneo (8%), Europa (4%) y América (3%). Si se mira la distribución por países, los 5 con una mayor incidencia son: India (2-2,4 millones), China (0,9-1,1 millones), Sudáfrica (0,4-0,6 millones), Indonesia (0,4-0,5 millones) y Pakistán (0,3-0,5 millones) (Figura 2).

La estimación de prevalencia de la enfermedad en el 2012 fue de 12 millones de casos a nivel mundial (intervalo, 11-13 millones).

Además, la OMS cifró en 0,32 millones las muertes entre las personas co-infectadas con el VIH, y 0,94 millones entre las personas no infectadas con el VIH [9].

**Figura 2.** Distribución mundial de incidencia de tuberculosis, 2013 (OMS, 18º Informe Anual, 2013) [9].



En cuanto a España, los datos epidemiológicos hablan de una incidencia bastante estable a lo largo de los últimos 5 años. El número de casos declarados en el 2011 fue de 6.762, equivalente a una tasa de 14,7 casos por 100.000 habitantes, un poco superior a la media de los países de la Unión Europea [10]. No obstante, es bien sabido que los datos recogidos no reflejan totalmente la realidad, debido a la infradeclaración, por lo que la verdadera incidencia probablemente sea superior.

Además, las tasas de incidencia oscilan considerablemente entre comunidades autónomas, siendo Ceuta, Galicia, Melilla, y la Rioja las comunidades con mayores tasas globales, aunque destacando Catalunya, Andalucía y Madrid como las que más casos declaran [11].

En la comunidad catalana, los últimos datos epidemiológicos disponibles corresponden al año 2011. La tasa de incidencia de tuberculosis fue de 17,9 casos por 100.000 habitantes (1.370 casos declarados) [12].

### 3.2. Principales factores de riesgo de tuberculosis

Si bien la tuberculosis ha estado presente entre la población humana desde hace siglos, su distribución diferencial entre áreas geográficas y grupos sociales ha sido evidente a lo largo de toda la historia, dejando bien patente que existe una clara relación de esta enfermedad con ciertos factores, principalmente socio-económicos.

**a) Pobreza.** Aunque la tuberculosis no es una enfermedad exclusiva de la población pobre, sí se observa una asociación clara entre pobreza y tuberculosis. Si se analiza la tasa de incidencia de esta enfermedad en cada país, se observa que ésta es inversamente proporcional a la renta *per cápita*, lo que demuestra su relación directa. Así, los países de baja renta son los que poseen las tasas más elevadas de enfermedad y mortalidad atribuible a la tuberculosis (unas 20 veces superior a los países de renta alta). Asimismo, la distribución de la enfermedad tuberculosa dentro de un país también es desigual, siendo superior en las áreas o grupos más desfavorecidos socio-económicamente [13].

**b) Tabaquismo.** La adicción al tabaco es otro factor de riesgo para padecer la enfermedad tuberculosa. La OMS estima que más del 20% de la incidencia mundial de tuberculosis puede relacionarse con el tabaquismo. De hecho, se calcula que el tabaquismo multiplica por 2,5 el riesgo de padecer tuberculosis [14].

**c) Co-infección con el VIH.** La aparición de la pandemia del VIH a principios de los años 80, ha ejercido un efecto dramático en el aumento de casos de tuberculosis. La OMS estima que, entre los 34 millones de personas infectadas con el VIH, más de 1 millón desarrollaron tuberculosis en el año 2011, representando 1/8 parte del total de nuevos casos de tuberculosis. Además, de los 1,6 millones de muertes por el VIH en 2011, se estima que 430.000 fueron atribuibles a la tuberculosis [15]. Debido a las características de inmunodepresión de los enfermos infectados con el VIH, su riesgo de desarrollar la enfermedad tuberculosa activa y el mal pronóstico de la misma son notablemente más elevados que en la población general (entre 21 y 34 veces más).

En el año 1996, se implantó el tratamiento antirretroviral de alta eficiencia, conocido como TARGA. Con este tratamiento, la esperanza y calidad de vida de las personas infectadas por el VIH ha mejorado drásticamente. Sin embargo, en caso de co-infección con la tuberculosis, la combinación de tratamientos para ambas enfermedades presenta problemas de interacciones secundarias (especialmente

entre los inhibidores de proteasa contra el VIH y la rifampicina contra la tuberculosis), lo que dificulta el manejo clínico en estos casos de co-infección [16].

**d) Flujo migratorio desde regiones endémicas.** En la actualidad, no hay duda de que el flujo migratorio desde poblaciones con tasas elevadas de tuberculosis, está suponiendo una complicación en el control de esta enfermedad. En los países más ricos del planeta se observa que, mientras que el número de casos de tuberculosis en la población autóctona sigue una curva descendente, en la población inmigrante siguen un ascenso o se mantienen constantes, provocando un enlentecimiento del descenso en la curva de la población global de esos países. En España y más concretamente en Catalunya, el flujo migratorio se ha hecho más acusado desde principios del siglo XXI, tanto así que la tuberculosis en inmigrantes supuso el 47,7% del total de casos declarados en la comunidad catalana, en 2011 [12].

Si bien está contrastado que la prevalencia de infección tuberculosa es mayor en inmigrantes procedentes de zonas endémicas, también se ha constatado que los inmigrantes aportan pocos casos de enfermedad activa inmediatamente después de su llegada. Mayoritariamente, el desarrollo de la enfermedad se produce dentro de los 5 años siguientes a su ingreso al nuevo país. Éste y otros aspectos, ponen en duda las razones reales de su relevancia como “factor de riesgo” de tuberculosis. Existen 2 teorías que explican el mayor número de casos de tuberculosis en población inmigrante. Una es la teoría de la “reactivación endógena” (activación de una infección adquirida en el país de origen), la cual está apoyada por tres observaciones: 1) la mayor incidencia de enfermedad activa en estos países, 2) la mayor prevalencia de infección latente, y 3) la ausencia de *clusters* (grupos clonales) de cepas circulantes entre la población inmigrante, evidenciada en los estudios de epidemiología molecular. Sin embargo, existe otra teoría: la de la “infección o reinfección exógena” (adquirida en el nuevo país), que defiende que la población inmigrante es más propensa a una nueva infección (o reinfección) en el país de destino, debido a las condiciones de hacinamiento y poca salubridad que determinados sectores de la inmigración padecen en los primeros años de estancia en el nuevo país. Esta última teoría, relevaría el factor “país de origen” a un segundo plano y remitiría de nuevo a la razón más puramente socio-económica, como verdadero factor de riesgo para padecer la enfermedad tuberculosa. Probablemente ambas teorías son complementarias y de importancia relativa variable, en función de múltiples factores [17].



### 3.3. Transmisión de la infección tuberculosa

Desde mediados del siglo XX, se conoce que el principal mecanismo de transmisión de la infección tuberculosa es por vía aérea de persona a persona, mediante la inhalación de pequeñas gotas de aerosoles, emitidas por la persona enferma fundamentalmente al hablar o toser, que contienen bacilos tuberculosos.

El tiempo de exposición a dichos aerosoles, la carga bacilar contenida en ellos así como el diámetro de los mismos, son algunos de los aspectos clave en la probabilidad de la transmisión de la infección de un individuo enfermo a otro sano. Las partículas emitidas mayores de 5  $\mu\text{m}$  caen al suelo o, en caso de llegar a la nariz, quedan atrapadas en el sistema mucociliar y son eliminadas. Sin embargo, las de menor tamaño (1-5  $\mu\text{m}$ ) quedan suspendidas en el aire y, en el caso de ser inhaladas, sí son capaces de llegar hasta los alvéolos y desencadenar la infección [18]. Los enfermos bacilíferos, es decir, que contienen en su esputo bacilos visibles mediante microscopía (BAAR), son los más contagiosos. Se estima que un bacilífero puede contagiar a unas 20 personas antes de ser diagnosticado de tuberculosis. Sin embargo, se ha comprobado que también los enfermos no-bacilíferos pueden ser transmisores de la enfermedad, hasta en un 17% de los casos [19].

### 3.4. Estudios epidemiológicos de la transmisión: técnicas de tipado de cepas circulantes

El tipado o clasificación clonal de las diferentes cepas de *M. tuberculosis* complex es fundamental en el estudio de la distribución geográfica de dichas cepas y su transmisión en la población. Este tipado se consigue gracias a técnicas de epidemiología molecular, las cuales se basan en el análisis de diferentes secuencias de ADN repetitivo que *M. tuberculosis* complex posee a lo largo de su genoma. La presencia de estas repeticiones de ADN es una característica común en el genoma de bacterias y células eucariotas, y tienen que ver con modificaciones fisiológicas y con la organización celular. En micobacterias destacan dos grandes grupos de secuencias repetitivas de ADN: las *tandem repeats* (TR) y las secuencias de inserción (*interspersed repeats*; IS).

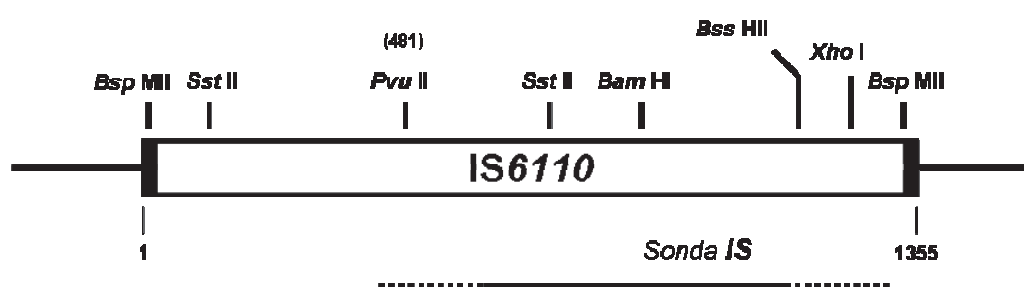
#### 3.4.1. IS6110

Las IS se dividen en 3 familias: IS3, IS5 e IS21. Dentro de la familia IS3, se halla la IS más abundante en *M. tuberculosis* complex: la IS6110, de 1.355 pb, que se encuentra en un número variable de veces a lo largo del genoma, entre 1 y 25

veces [20]. Ésta ha sido tradicionalmente la secuencia de repetición utilizada en el método de referencia de tipado de cepas de *M. tuberculosis* complex (Figura 3). Este método está basado en el número y posición de las repeticiones del IS6110 a lo largo del genoma de *M. tuberculosis* complex, y consta de una digestión enzimática (*PvuII*, con una única diana en la secuencia IS6110), electroforesis con marcadores de peso molecular de referencia (de entre 0,9 y 10 Kb) y transferencia a membrana donde se realiza una hibridación con sondas complementarias marcadas con peroxidasa. El patrón de bandas generado que refleja el número y la posición de estas IS6110, se analiza mediante un programa informático específico [21].

La variabilidad de la IS6110 se considera lo suficientemente grande como para distinguir clones y bastante estable como para emparentar cepas de pacientes relacionados epidemiológicamente. Se estima que el tiempo de estabilidad media de un patrón de bandas IS6110 de una cepa es de 3-4 años. Las cepas que poseen el mismo número y posición de las bandas se considera que pertenecen al mismo clon. Si difiere en tan solo 1 o 2 bandas, se consideran emparentadas en el pasado, y si hay más de 2 bandas de diferencia se consideran dos clones totalmente separados epidemiológicamente.

**Figura 3.** Esquema de una zona de inserción IS6110 (tomado de van Embden *et al*, 1993) [21].



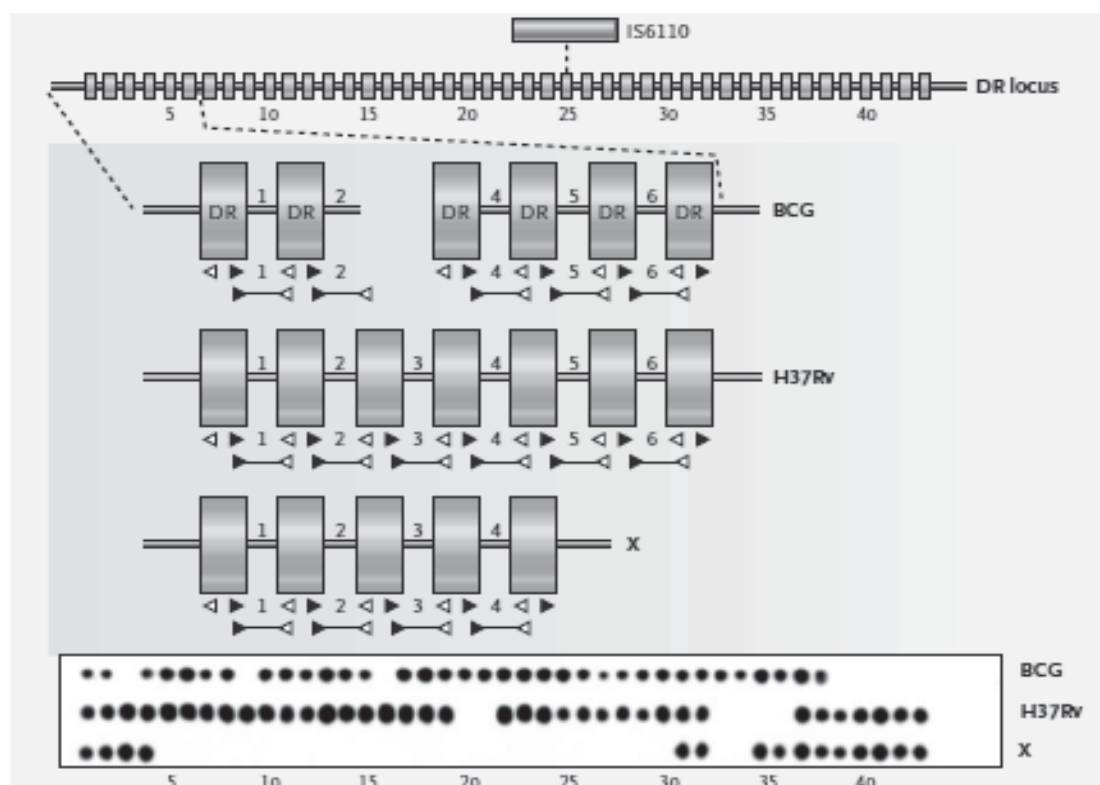
Esta técnica posee algunas limitaciones, como la necesidad de disponer de un elevado inóculo de la cepa a estudiar (no siempre fácil de obtener) para que la técnica sea sensible. Por otro lado, la complejidad metodológica (que además va unida a la dificultad de reproducibilidad entre laboratorios) y el coste económico, son considerables. Sin embargo, la mayor limitación que presenta la técnica de la IS6110 es que algunas cepas de *M. tuberculosis* complex poseen 5 o menos copias

de esta secuencia de inserción en todo su genoma, con lo que el poder discriminatorio de este método es insuficiente. Por todo ello, otras técnicas de tipado molecular han ganado importancia en los últimos años.

### 3.4.2. *Spoligotyping* (“*Spacer oligotyping*”)

La técnica que recibe este nombre, explora la variabilidad polimórfica del ADN dentro de las DR (*direct repeats*), que son secuencias cortas (36 pb) de repetición, y *hot-spots* de inserción de la IS6110. Estas DR están separadas por espaciadores, de 34-41 pb. La técnica se basa en la amplificación de estas zonas espaciadoras, y una posterior hibridación en membrana con espaciadores sintéticos (Figura 4) [22].

**Figura 4.** Esquema de las regiones espaciadoras (*spacers*) e imagen de la hibridación en membrana, del *spoligotyping* (tomado de Barnes y Cave, 2003) [23].



El método *spoligotyping* de tipado de cepas de *M. tuberculosis* complex ofrece dos ventajas respecto a la basada en la IS6110. Por un lado no es necesario disponer de un inóculo tan elevado de la cepa (incluso es posible trabajar con muestra directa en vez de cultivo puro), y otra es que el resultado se define como presencia/ausencia de la zona espaciadora, con lo cual éste puede expresarse con un formato numérico. La principal limitación es que es menos discriminatoria que la

IS6110, a pesar de que permite distinguir más fácilmente cepas no idénticas que formen parte de una familia o un clon grande.

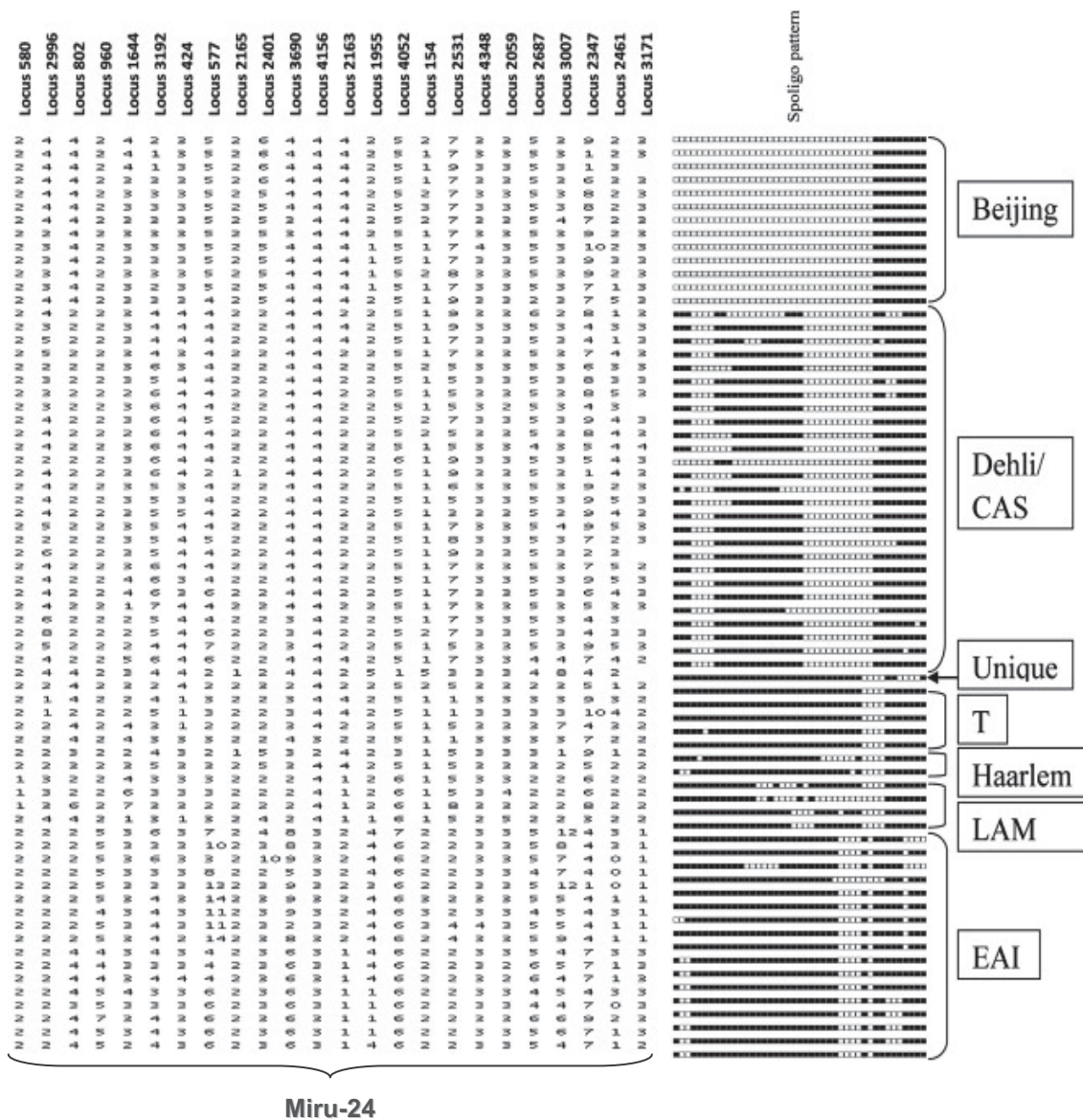
### 3.4.3. MIRUs

Las TR, estimadas en unas 200-300 en *M. tuberculosis* complex [24], son unidades monoméricas que se repiten periódicamente. A su vez, algunos de estos monómeros varían en cuanto al número de repeticiones, con lo que se llaman *variable number tandem repeats* (VNTR).

De entre las TR, destacan las *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs), que son secuencias homólogas de 46 a 101 pb dispersas en regiones intergénicas a lo largo del genoma. En *M. tuberculosis* complex se ha descrito la existencia de 41 *loci* de presencia de MIRUs, y de ellos, al menos 12 ofrecen una variabilidad (polimorfismo) entre cepas suficiente como para usarlas como marcador para tipado epidemiológico [25]. Así, se desarrolló una técnica de tipado molecular, que se basa en calcular el número de VNTR en cada uno de estos 12 *loci*, de manera que cada cepa poseerá un código de 12 cifras. El número de VNTRs de cada *locus* se infiere a través del tamaño del fragmento generado mediante PCR (*polymerase chain reaction*) [26],[27]. Esta técnica de tipado representa una alternativa a la de referencia (IS6110) ya que es mucho más sencilla (al basarse tan sólo en la amplificación genética por PCR).

Actualmente, se puede realizar esta técnica ampliando a 15, y hasta 24, los *loci* a analizar, para conseguir una mayor discriminación epidemiológica [28]. Combinada con el spoligotyping, se ha propuesto recientemente como la estrategia de referencia en el tipado molecular de *M. tuberculosis* complex [29] (Figura 5).

**Figura 5.** Esquema de la propuesta de estrategia de referencia para el tipado de *M. tuberculosis* complex (spoligotyping+MIRU 24).



## 4. CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA

### 4.1. Afectación pulmonar

La mayoría de los casos de tuberculosis activa son de afectación pulmonar (80%, en individuos no-VIH). En función del tiempo de latencia (tiempo desde la infección hasta la enfermedad activa) se distinguen dos clases de tuberculosis pulmonar. En los casos en que la enfermedad se desarrolla inmediatamente posterior a la infección se habla de tuberculosis primaria, y se da especialmente entre la población infantil y las personas inmunodeprimidas (por VIH o tratamientos inmunosupresores). El foco o localización es normalmente la zona pulmonar

intermedia y es frecuente el derrame pleural. En casos graves, la lesión primaria puede producir una lesión necrosante. Es frecuente la aparición de adenopatías, y la afectación de ganglios linfáticos, los cuales pueden determinar el paso de los bacilos al torrente sanguíneo y, por tanto, provocar la diseminación a varios órganos.

La tuberculosis secundaria (o posprimaria, propia del adulto), en cambio, ocurre debido a una reactivación endógena de una infección antigua latente. Es la más frecuente y se localiza normalmente en los lóbulos superiores del pulmón (ya que el oxígeno existente en éstos favorece el crecimiento de las micobacterias). Habitualmente comienza con un foco (infiltrado) debajo de la clavícula o la primera costilla, la cual suele acabar caseificando y fibrosando, formando las denominadas cavernas. La caverna tiende a licuarse, liberando bacilos que pueden diseminarse a través del árbol bronquial y generar lesiones satélites.

Sin duda, el síntoma clásico de la tuberculosis es la tos, que aparece en forma seca inicialmente, pero acaba siendo purulenta, y en ocasiones hemoptoica, en estadios más avanzados de la enfermedad. Otros de los síntomas de la tuberculosis pulmonar (aunque pueden ser inespecíficos en las primeras fases) son la febrícula y sudoraciones vespertinas o nocturnas, pérdida de peso, astenia y anorexia.

#### **4.2. Afectación extrapulmonar**

Tal y como se ha comentado anteriormente, una tuberculosis primaria puede acabar dando lugar a una forma de tuberculosis extrapulmonar, por diseminación linfática o hematógena de los bacilos. En individuos co-infectados con el VIH, en especial entre los que habitan en países de renta baja, los casos de tuberculosis extrapulmonar constituyen el 40-60% de los casos totales. La manifestación clínica de la tuberculosis extrapulmonar es más inespecífica aún que la pulmonar, lo cual hace más difícil su diagnóstico clínico [30],[31].

##### **4.2.1. Tuberculosis ganglionar (adenitis tuberculosa)**

Es la más frecuente de las formas extrapulmonares, y se caracteriza por la inflamación indolora de ganglios de las regiones cervical y supraclavicular, fundamentalmente. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante examen (microscopía y cultivo) de una muestra obtenida por punción del ganglio con aguja fina o mediante biopsia.

#### **4.2.2. Tuberculosis pleural**

Se produce por la penetración de bacilos al espacio pleural. El derrame pleural puede ser escaso o abundante y dar síntomas como fiebre, dolor torácico y disnea. El líquido pleural producto de un derrame tuberculoso es de color pajizo o hemorrágico, abundante en proteínas y ligeramente ácido, con alto contenido de leucocitos. Sin embargo, el diagnóstico microbiológico es difícil ya que la tuberculosis pleural se caracteriza por ser muy paucibacilar (pocos bacilos presentes en la zona afectada), de modo que rara vez la microscopía revela la presencia de bacilos y el cultivo tan sólo es positivo en un tercio de los casos de tuberculosis pleural [32],[33].

#### **4.2.3. Tuberculosis genitourinaria**

Son más frecuentes los casos de tuberculosis urinaria, con síntomas locales como poliaquiuria, disuria y hematuria. Aunque en el 90% de los casos de tuberculosis urinaria el examen de orina es negativo, se puede obtener un mayor rendimiento del diagnóstico microbiológico si se cultivan las tres primeras muestras de orina de la mañana.

La tuberculosis genital es más infrecuente, y se diagnostica más a menudo en mujeres, donde afecta a las trompas de Falopio y el endometrio. El diagnóstico se realiza mediante biopsia o legrado.

#### **4.2.4. Tuberculosis osteoarticular**

Suele estar relacionada con la diseminación de vasos linfáticos próximos a huesos y articulaciones. Las articulaciones de columna, cadera y rodilla son las más comúnmente afectadas. De ellos, la tuberculosis vertebral (enfermedad de Pott o espondilitis tuberculosa) es la más frecuente, y en casos graves puede degenerar en una cifosis. El cultivo de biopsia o punción del absceso del hueso o articulación afectada tiene un buen rendimiento para diagnóstico microbiológico de una tuberculosis osteoarticular.

#### **4.2.5. Tuberculosis meníngea**

Representa tan sólo el 5% de los casos de tuberculosis extrapulmonar y afecta sobre todo a niños y pacientes infectados por el VIH. Suele derivar de la rotura de un tuberculoma hacia el espacio subaracnoideo o diseminación hematogena de la lesión pulmonar primaria, y genera un cuadro meníngeo de evolución más larga que la meningitis bacteriana piógena (1 ó 2 semanas). Es frecuente la paresia y la

hidrocefalia. El diagnóstico se realiza mediante examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) que, en el caso de la tuberculosis meníngea, se caracteriza por tener un aspecto opalino/turbio, con proteínas elevadas, baja concentración de glucosa y un aumento moderado de los leucocitos con predominio linfocitario. Microbiológicamente, se trata de una muestra *paucibacilar* que permite el diagnóstico rápido por baciloscopia en un porcentaje muy bajo de los casos, especialmente si se toma una sola muestra. El cultivo micobacteriano sin embargo, permite el diagnóstico hasta en el 80% de los casos.

#### **4.2.6. Tuberculosis peritoneal**

Se produce por diseminación hematógena desde otras regiones o por siembra de bacilos desde órganos o vasos linfáticos adyacentes. El cultivo de un gran volumen de líquido ascítico puede aumentar las posibilidades del diagnóstico microbiológico, ya que pocas veces se descubren bacilos en las tinciones para microscopía. Muchas veces es necesaria una biopsia peritoneal para confirmar el diagnóstico.

#### **4.2.7. Tuberculosis miliar (diseminada)**

Es la causa de una diseminación hematógena de un foco de infección primario o bien de una reactivación (tuberculosis secundaria) que genera lesiones granulomatosas amarillentas de 1-2 mm. Las manifestaciones clínicas asemejan a la tuberculosis pulmonar, con predominio de fiebre y adicionalmente puede causar molestias abdominales, hepatomegalia, esplenomegalia y adenopatías. El diagnóstico clínico es complejo debido a la sintomatología inespecífica y a que en las primeras fases del proceso la radiografía de tórax puede ser anodina, si bien a veces se observan infiltrados intersticiales. En la mayoría de los casos, la baciloscopia del esputo es negativa. El lavado broncoalveolar, la biopsia transbronquial o la biopsia de hígado o hueso, son las mejores muestras para el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis miliar.

## **5. PATOGENIA**

### **5.1. Inmunología**

#### **5.1.1. Interacción huésped-bacilo tuberculoso. Teoría clásica.**

El mecanismo fundamental de defensa del huésped ante la infección tuberculosa es de tipo celular. Tras la llegada de los bacilos tuberculosos al pulmón, generalmente a los lóbulos inferiores, la primera e inespecífica respuesta inmunológica corre a cargo de los macrófagos alveolares, que fagocitan los bacilos. No obstante, estos macrófagos poco especializados apenas hacen frente a la multiplicación del bacilo



e incluso pueden llegar a ser destruidos por la gran cantidad de microorganismos albergados en su interior. Sin embargo, estos macrófagos producen determinadas quimiocinas (como el TNF- $\alpha$ ) y otras citocinas que atraen a los neutrófilos y monocitos al foco de infección. Los neutrófilos actúan como bactericidas y a la vez como reguladores de respuesta antiinflamatoria, y los monocitos fagocitan los bacilos que han destruido a los macrófagos alveolares; con todo, tampoco ellos están activados, por lo que más bien ejercen una función indeseada de ambiente replicativo en su interior, excelente para los bacilos. Además, estos monocitos contenedores de bacilos, pueden migrar vía hematogena a nódulos de zonas distantes, extendiendo así la infección.

Cuando la cantidad de antígeno llega a un umbral y las células presentadoras de antígeno, situadas en los ganglios linfáticos, son capaces de estimular a los linfocitos T *naïve* (no estimulados previamente) comienza la auténtica respuesta inmunológica específica contra el bacilo tuberculoso. Los linfocitos se convierten en CD4 (o *helper*, *Th*) que actúan tanto en el foco inicial como en los secundarios, y se forma el granuloma, entidad característica de la enfermedad, que está conformado por macrófagos infectados, células de Langhans (formados por la fusión de diversos macrófagos activados), linfocitos CD4, fibroblastos y capilares.

En los casos en que la carga antigénica no es demasiado alta y la hipersensibilidad del huésped es buena, este granuloma tiene una buena resolución y el tejido acaba cicatrizando. Pero cuando la carga bacilar es muy alta, se puede formar una necrosis incompleta originando el material caseoso, que es inestable y con tendencia a licuarse pudiendo generar las denominadas cavernas tuberculosas, las cuales albergan un alto contenido bacilar en su interior de forma que éstos pueden diseminarse por vía hematogena a otros órganos del huésped. En la mayoría de los casos, los linfocitos CD4 destruyen el 95% de los bacilos tuberculosos. La población bacilar restante, en el 90-95% de los casos, acaba siendo destruida previa fibrosis y reabsorción del granuloma, y sólo en un 5-10% de los casos (en población inmunocompetente) los bacilos quedan en estado durmiente dentro de los macrófagos generando la denominada tuberculosis latente.

### **5.1.2. Hipótesis dinámica**

A principios de siglo XXI, surgió una nueva teoría acerca del ciclo de infección del bacilo tuberculoso, la denominada “hipótesis dinámica” [34]. Esta teoría trata sobre los motivos de la reinfección e infección latente. Según la hipótesis dinámica,

cuando los macrófagos infectados que rodean el granuloma del pulmón (denominados macrófagos espumosos) son expulsados hacia el árbol bronquial, hay un cierto reflujo inverso, ya que el fluido alveolar también es el origen de los aerosoles generados con la inhalación de aire desde el exterior. Este proceso hace posible que los bacilos latentes en el interior de estos macrófagos generen de nuevo una infección en el parénquima pulmonar, ante la cual los linfocitos T no pueden actuar (ya que la inmunidad específica se produce solamente tras la migración de células dendríticas de los nódulos linfáticos). Además, los bacilos que se hallan dentro de estos macrófagos espumosos pueden reproducirse libremente, ya que se encuentra lejos del foco granulomatoso donde la presión inmunogénica es mayor (sobre todo de citocinas protectoras como el  $\text{IFN-}\gamma$ ) [35]. Así, se producen nuevas reinfecciones y una tuberculosis latente que podría evolucionar a activa. Esta teoría contrasta con la tradicional, expuesta previamente, en la que los bacilos no-replicativos que quedan dentro de los macrófagos del granuloma serían el foco de la tuberculosis latente, los cuales, en condiciones adecuadas, se reactivarían y provocarían la tuberculosis activa (Figura 6).

**Figura 6.** Teoría estática y teoría dinámica de la infección tuberculosa (tomado de Cardona, 2009) [34].

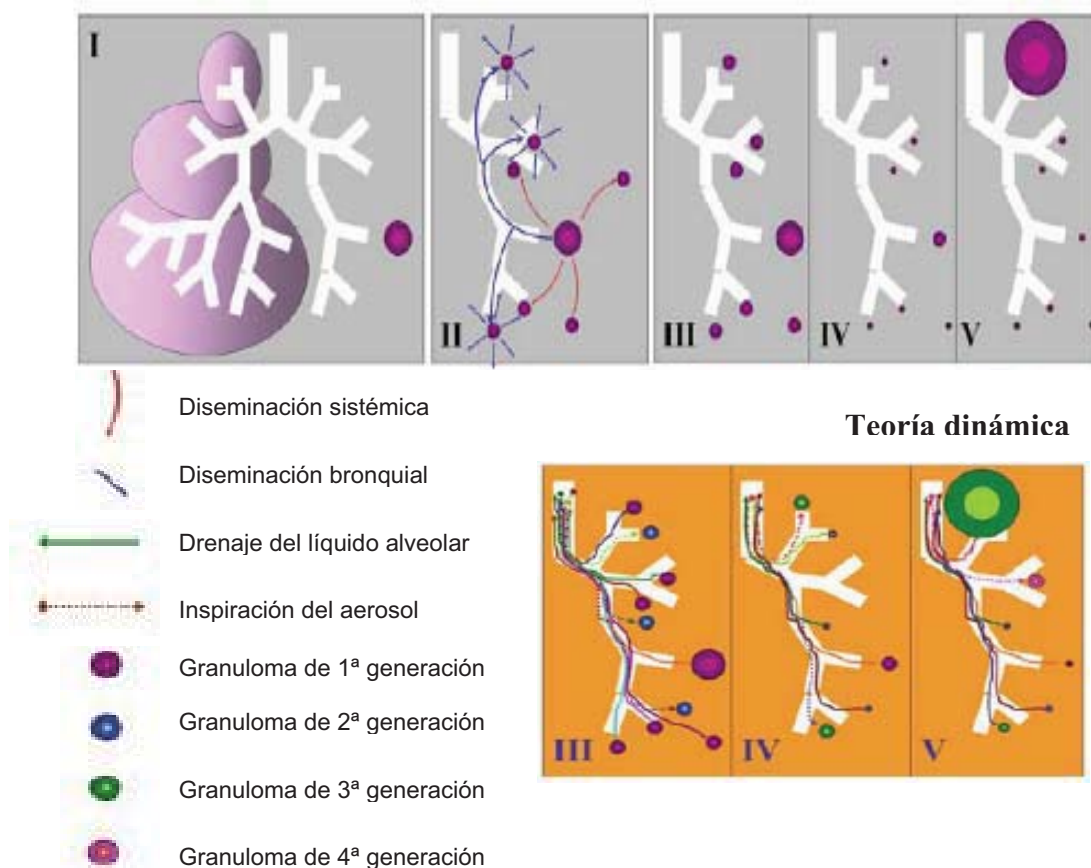


Fig 6. Leyenda: I) Formación de la primera lesión tuberculosa. Ésta se disemina y genera granulomas secundarios (II) hasta que el sistema inmune contiene el avance de la enfermedad (III). A partir de aquí, las dos teorías divergen, en la clásica, la lesión permanece en las zonas de bacilos durmientes (IV) hasta que se puede dar una reactivación en las condiciones adecuadas (V). En la teoría dinámica, se produce un reflujo constante de bacilos (IV) que pueden retornar al árbol bronquial y generar nuevas cavitaciones (V).

## 5.2. Virulencia de *M. tuberculosis* complex

El empleo de la bioinformática y la proteómica, así como la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis* complex, han permitido corroborar la función de diversos productos codificados por varios genes, en la patogénesis de la tuberculosis. Los resultados hallados ponen de manifiesto que la virulencia del bacilo es multifactorial.

Existen factores de virulencia de tipo proteico, como la proteína *Hspx* (análoga de la proteína de 16 kDa). Esta proteína se considera un importante elemento controlador de la latencia de *M. tuberculosis* complex, puesto que su sobreexpresión inhibe el crecimiento del microorganismo, el cual permite al microorganismo sobrevivir a condiciones ambientales de estrés, como las que encuentra dentro de los macrófagos. Se conoce además otra proteína, la *OmpA*, que juega un papel fundamental en la respuesta bacteriana frente a condiciones de pH ácido. Por otro lado, una lipoproteína de 19 kDa, inhibe ciertas respuestas del macrófago al IFN- $\gamma$  y la presentación de antígenos. Esta inhibición posiblemente promueve la evasión de *M. tuberculosis* complex a la respuesta inmunitaria mediada por las células T, lo que implica la persistencia de la infección. Otro de los factores de virulencia proteicos conocidos son el *HBHA*, el *MTP40* y el complejo antigénico 85 (*Ag85*). Además, se encuentran elementos importantes como el *Esat6/CF-10*, proteínas de filtrado celular presentes en todas las cepas virulentas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

También se han descrito factores de virulencia de tipo lipídico, entre ellos los glicolípidos y lipoglicanos, y polisacáridos que confieren protección al bacilo. El lipoarabinomano (Man-LAM) y los fosfatidilinositol manósidos, son los contribuyentes más importantes para la evasión de *M. tuberculosis* complex a la respuesta inmune del huésped, ya que ambas moléculas participan en la inhibición de la activación de los macrófagos infectados [36].

## 6. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA

El cribado de la infección tuberculosa latente (ITL) es crucial en ciertos grupos de personas, como aquéllas que han estado recientemente expuestas al bacilo (estudio de contactos) o personas inmunodeprimidas. El objetivo de este cribado es evitar la evolución de infección a enfermedad.

### 6.1. Método convencional de diagnóstico de la ITL: prueba de la tuberculina

Esta prueba, denominada también test de Mantoux, es la utilizada desde hace más de 100 años como método de referencia para el cribado de la ITL. Se basa en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD; en España se utiliza la variante RT-23, con Tween 80 como antiadsorbente) que contiene más de 200 antígenos tuberculosos, aunque algunos de ellos no son exclusivos de *M. tuberculosis* y están compartidos por varias especies micobacterianas, incluida la cepa vacunal *M. bovis* BCG. Esta inyección antigénica provoca, en el caso de que el individuo haya estado previamente en contacto con el bacilo, una reacción de hipersensibilidad tardía que consiste en la reacción inflamatoria por focalización de monocitos y linfocitos que, mediante el torrente sanguíneo, llegan a la epidermis y reconocen los antígenos tuberculínicos. Esta reacción se evidencia macroscópicamente por la aparición de una induración y enrojecimiento de la piel alrededor de la zona de inoculación, cuyo diámetro se ha de medir a las 48-72 horas (Figura 7).

La reacción tuberculínica pretende clasificar los individuos en infectados o no por *M. tuberculosis* complex. En individuos no vacunados con BCG, se considera una prueba tuberculínica positiva cualquier reacción de 5 mm o más. Sin embargo, ya que el PPD incluye antígenos compartidos entre la cepa tuberculosa y la vacunal BCG, se puede producir una reacción de hipersensibilidad cruzada en las personas vacunadas, sin haber estado en contacto con tuberculosis. Es difícil discernir en estos casos, pero según los consensos actuales en nuestro país se sigue considerando el punto de corte de 5 mm de induración en individuos vacunados con contacto reciente o con lesiones aparentes en la radiografía de tórax, es decir, en las personas con riesgo elevado de enfermar. En los vacunados sin factores de riesgo a enfermar, el límite de positividad se ha establecido en 15 mm. Por otro lado, se consideran signos probables de infección por el bacilo de Koch la presencia de vesiculación o necrosis en la zona inflamada. Finalmente, en los individuos inmunodeprimidos (VIH, trasplantados, tratamientos biológicos

moduladores de la respuesta inmunitaria, etc.) cualquier grado de induración tiene valor diagnóstico positivo de infección tuberculosa [37].

**Figura 7.** Imagen de la induración resultante de la prueba de la tuberculina (ITL positiva).



A pesar de seguir siendo el método de referencia, la prueba de Mantoux presenta algunos problemas. Además de la baja especificidad en individuos vacunados por BCG, también está demostrado que la sensibilidad de la prueba de la tuberculina disminuye en los pacientes inmunodeprimidos, debido a que éstos presentan por definición una escasa reacción inflamatoria y por lo tanto pueden no presentar induración dérmica a pesar de estar infectados por el bacilo de Koch. Asimismo, se puede producir situación de anergia en niños de corta edad (menores de 2 años) en los cuales la función inmunitaria no está bien establecida. Finalmente, la lectura del resultado (reacción inflamatoria de la dermis) puede ser subjetiva, y la logística es complicada ya que son necesarias 2 visitas médicas: una para la administración del PPD, y otra para la lectura del resultado.

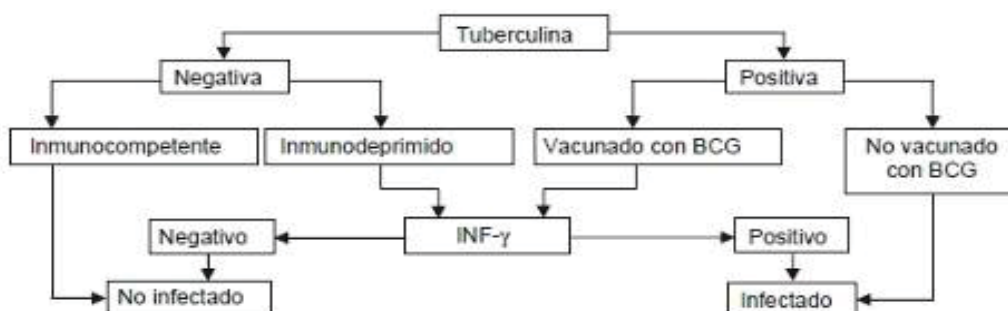
## **6.2. Nuevos métodos de diagnóstico de la ITL: detección de IFN $\gamma$**

Con el fin de intentar superar los problemas que presenta la prueba de la tuberculina, se han desarrollado nuevas técnicas basadas en la producción de IFN- $\gamma$  (IGRA, *interferon gamma release assay*), citocina secretada por los linfocitos T sensibilizados con antígenos específicos de *M. tuberculosis* complex.

Existen actualmente 2 técnicas de IGRA comerciales: el QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold In-Tube y el T-SPOT<sup>®</sup>.TB. A pesar de presentar algunas diferencias entre sí, básicamente metodológicas, ambas tienen en común que utilizan antígenos de estimulación del linfocito T específicos de *M. tuberculosis* complex, evitando así reacciones cruzadas con la vacuna BCG y la mayoría de micobacterias no-tuberculosas (MNT), excepto *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* y *Mycobacterium szulgai*. Además, en cada ensayo, se incluye un tubo con mitógeno

(fitohematoglutinina) que estimula los linfocitos y sirve como control positivo en el grupo de inmunodeprimidos que posean pocas, o no funcionales, células CD4. En general, estas técnicas son más sensibles y específicas que la prueba de la tuberculina y, aunque pueden verse afectadas por un entorno de inmunodepresión o en etapas extremas de la vida, siguen siendo más precisas que la tuberculina también en estos casos. Presentan además una mejor correlación con factores de riesgo de infección tuberculosa. En la actualidad, se consideran complementarias y normalmente la técnica IGRA se realiza en casos donde la tuberculina no es concluyente (Figura 8).

**Figura 8.** Algoritmo para el diagnóstico de la infección tuberculosa latente (tomado de González-Martín *et al*, 2010) [37].



### 6.2.1. QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QF-IT)

Se basa en la cuantificación de IFN- $\gamma$  producido por las células T efectoras. Se extrae sangre del paciente y se inocula en 3 tubos denominados: “Nulo”, donde se medirá la producción basal de IFN- $\gamma$ , “Antígeno”, donde se encuentran los antígenos específicos de *M. tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 y TB 7.7, de manera que se estimularán los linfocitos T efectoras ya sensibilizados por contacto previo con el bacilo, y “Mitógeno” (se incluye sólo en caso de inmunodepresión) que contiene fitohemaglutinina con el fin de estimular la producción de IFN- $\gamma$ . Este tubo sirve para poner de manifiesto los casos de inmunodepresión grave, en que no habrá producción de IFN- $\gamma$  ni siquiera en el tubo de “Mitógeno”, con lo que el resultado de la prueba será indeterminado (fundamentalmente, evita otorgar un falso negativo en estos casos).

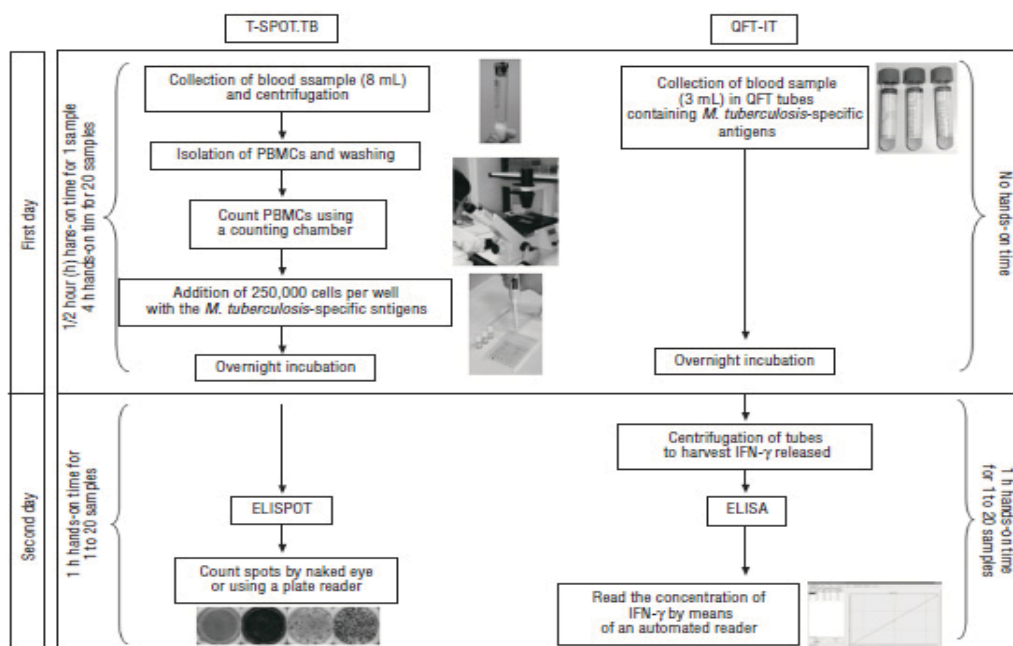
Después de 16-24 horas de incubación de la sangre entera en estos tubos, se centrifuga para recuperar el suero y en él se hace la cuantificación de IFN- $\gamma$ ,

mediante una técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). La técnica tiene unos puntos de corte ya establecidos para la producción diferencial observada entre los tubos, que dará un resultado de Positivo, Negativo o Indeterminado.

### 6.2.2. T-SPOT.TB (ELISPOT)

A diferencia del QFT-IT, el ELISPOT (*enzyme-linked immunosorbent-SPOT*) cuantifica directamente el número de células T efectoras, productoras de IFN- $\gamma$ . Metodológicamente también presentan diferencias con el QFT-IT (Figura 9). En el T-SPOT.TB se toma una muestra de sangre y se separan las células periféricas mononucleares mediante centrifugación, se hace un recuento y se deposita un determinado número en una placa *microtiter*. Después de una incubación de 12 horas con antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 y CFP-10) se visualiza cada célula T efectora como un *spot* (precipitado colorimétrico visible al ojo). Al igual que en el QFT-IT se dispone de un control positivo con fitohemaglutinina, que permite comprobar la correcta funcionalidad celular. Según el número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido en el recuento (*spots*), el paciente estará o no infectado por el bacilo tuberculoso.

**Figura 9.** Comparación metodológica de las dos técnicas comerciales de IGRA: ELISPOT y QFT-IT (tomado de Domínguez *et al*, 2009) [38].



Con los datos de estudios publicados hasta la fecha, parece que el ELISPOT sería ligeramente menos específico pero más sensible que el QFT-IT en la población

general [39] e incluso parece que también en pacientes infectados por el VIH [40], aunque la evidencia es un poco escasa por el momento.

## **7. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA**

### **7.1. Toma de muestras**

Ante la sospecha clínica de padecer la enfermedad tuberculosa, se procede a recoger una o varias muestras de la región anatómica afectada, para su estudio en el laboratorio de microbiología. Las muestras más frecuentes, por ser la afectación más usual, son las respiratorias. La muestra idónea, siempre que sea posible, es el esputo. Debe recogerse por la mañana, cuando la carga bacilar es mayor (más concentrada) y en ayunas. Preferiblemente se recoge este esputo (5-10 ml) de tres días consecutivos. Si no es posible recoger el esputo por expectoración natural, se puede inducir mediante aerosoles, aunque su naturaleza es más acuosa (menos concentrada). Cuando no haya expectoración o sea insuficiente para recoger una buena muestra, el jugo gástrico, obtenido por aspiración, también es una muestra válida para procesar. En último caso, se recurre a las pruebas broncoscópicas (broncoaspirado, lavado broncoalveolar o cepillado bronquial con catéter telescopado). Hay que tener en cuenta que estas últimas muestras han de procesarse con una mayor urgencia, ya que durante la técnica de extracción se suele utilizar un anestésico local (lidocaína) que puede inhibir el crecimiento de las micobacterias.

En caso de sospecha de tuberculosis extrapulmonar que atañe a regiones estériles (por ejemplo, tuberculosis meníngea, pleural, peritoneal o pericárdica) debe recogerse el mayor volumen posible ya que son muestras mucho más paucibacilares que el de otras localizaciones. En el caso de biopsias, los tejidos deben remitirse al laboratorio suspendidos en suero fisiológico o medio líquido 7H9 de Middlebrook. Si la sospecha es de una tuberculosis vesical, se toma la muestra de la primera micción del día (mínimo 40 ml) como si se tratase de un urocultivo convencional. En cuanto a las heces, se recomienda recoger tres muestras de 1 gr aproximadamente, resuspendidas en 40 ml de suero fisiológico o medio 7H9 de Middlebrook. Finalmente, si se sospecha de una tuberculosis diseminada, se recomienda recoger la muestra de sangre directamente en un frasco de hemocultivo para sistemas de incubación y detección automáticos no radiométricos. Si no fuera posible, se transportaría al laboratorio en un tubo con anticoagulante como el SPS o la heparina, pero no con EDTA.

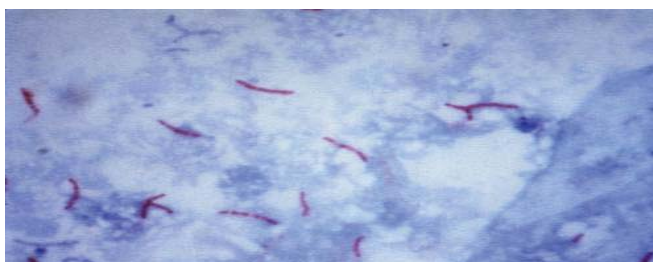


## 7.2. Baciloscopia

Además de dar una rápida orientación diagnóstica, también permite identificar a los pacientes más contagiosos, ya que tradicionalmente se ha considerado que son los individuos bacilíferos los más propensos a propagar el microorganismo. Las tinciones empleadas para la detección de micobacterias mediante microscopía se basan en su propiedad de ácido-alcohol resistencia; las más empleadas son: a) tinción de Ziehl-Neelsen, en la que se utiliza la fucsina como colorante primario, posteriormente se decolora con un ácido-alcohol y por último se utiliza un contraste con azul de metileno. Los BAAR se visualizan de color rojo (han podido retener la fucsina tras la decoloración) y el resto de bacterias se ven de color azul (Figura 10), y b) tinción con auramina-rodamina, fluorocromos que permiten la visualización de los BAAR de color amarillo-verdoso fluorescente mediante microscopía con luz ultravioleta. Para la visualización con la tinción de Ziehl-Neelsen se requiere un aumento microscópico de x1.000, mientras que en las técnicas fluorescentes es de x250 aumentos, con lo que es necesario observar menos campos para cubrir la extensión. Sin embargo, la técnica de la auramina es más propensa a dar falsos positivos (artefactos) por lo que es imprescindible la confirmación, mediante Ziehl-Neelsen, de cualquier muestra dudosa.

La morfología que presentan las especies de *M. tuberculosis* complex en la microscopía es de bacilos finos y alargados que, a diferencia de las MNT, frecuentemente forman unas “cuerdas” también llamadas “coronas de espinas” cuando la tinción se hace a partir de un cultivo líquido positivo. La visualización de al menos 3 bacilos por cada 300 campos, debe considerarse positiva. Es recomendable, además, establecer una semicuantificación de la carga bacilar. Según la nomenclatura de los CDC: 1+ (1- 9 bacilos por 100 campos), 2+ (1-9 bacilos por cada 10 campos), 3+ (1-9 bacilos por campo) y 4+ (>9 bacilos por campo). Según la nomenclatura de la OMS: 1+ (10-99 bacilos/100 campos) 2+ (1-10 bacilos/campo) y 3+ (>10 bacilos/campo).

**Figura 10.** Visualización de BAAR mediante microscopía. Tinción de Ziehl-Neelsen.



Además de su sencillez y bajo coste económico, las técnicas de microscopía son bastante específicas. Sin embargo, la sensibilidad es baja. Para que los bacilos sean detectables en la extensión, el inóculo mínimo debe ser de 5.000-10.000 bacilos/ml. Se estima que tan sólo un 45-80% de las muestras cuyo cultivo es positivo para *M. tuberculosis* complex, contienen BAAR visibles en la extensión para microscopía. La baja sensibilidad de la baciloscopia es especialmente notable en muestra extrapulmonares, que son por definición más paucibacilares que las respiratorias. En los líquidos biológicos estériles, la sensibilidad puede disminuir de forma notable y aún más acusadamente en líquidos pleurales, muestras con carga bacilar extremadamente baja donde la sensibilidad de la baciloscopia alcanza tan sólo un 5% [32],[33]. Una baciloscopia negativa, por tanto, nunca es excluyente de diagnóstico de tuberculosis. Por otro lado, dado que la característica AAR no es exclusiva de *M. tuberculosis* complex, el valor predictivo de tuberculosis de la microscopía puede descender hasta el 50-80% en determinadas áreas geográficas con elevada prevalencia de MNT.

### 7.3. Cultivo

Es el método de referencia para el diagnóstico microbiológico de tuberculosis. Su sensibilidad es más elevada que la de la baciloscopia (10-100 bacterias/ml). Además ofrece la ventaja de permitir aislar el microorganismo y así poder manipularlo para pruebas posteriores de identificación, sensibilidad a los antimicrobianos y epidemiología molecular.

Previamente a la siembra del cultivo micobacteriano, es necesario un procesamiento de las muestras que elimine la flora contaminante presente en la matriz orgánica y que podría interferir en el crecimiento de las micobacterias. A la vez, este proceso sirve también para concentrar el inóculo micobacteriano. En el caso de las muestras procedentes de regiones estériles, este pretratamiento previo a la microscopía y siembra en los medios de cultivo no es necesario.

Existen varios métodos de pretratamiento (homogeneización, descontaminación y concentración) de muestras para la detección microbiológica de micobacterias, aunque el más utilizado, sobre todo con los sistemas automáticos de cultivo y detección, es el método de Kubica [41]. Esta técnica se fundamenta en la combinación de dos reactivos: a) el hidróxido sódico (NaOH) al 2%, que sirve como descontaminante por sus propiedades alcalinas, y b) la N-acetil-L-cisteína, que

actúa como mucolítico, imprescindible para la disgregación de la matriz orgánica de la muestra y liberación de los microorganismos.

Las micobacterias en general requieren medios ricos en nutrientes. Es recomendable, según el tipo de muestra a sembrar, utilizar medios con sustancias inhibitoras de la flora acompañante, como por ejemplo el verde de malaquita. Existen diversas estrategias de cultivo, actualmente la más utilizada es la siembra en medio de cultivos líquidos automatizados, que son más rápidos y por lo general más sensibles que los sólidos. Aún así, dado que en alguna ocasión el medio sólido recupera el microorganismo en muestras donde el medio líquido no lo consigue y a que permiten la visualización morfológica de las colonias de *M. tuberculosis* complex (en forma de “miga de pan”), se recomienda sembrar los dos tipos de medio: uno líquido y uno sólido.

### 7.3.1. Medios líquidos

La mayoría están automatizados, con lo que la incubación y lectura son objetivas, y pueden utilizarse también para realizar las pruebas de sensibilidad antibiótica. Los sistemas de cultivo líquido más empleados son, el BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, EEUU), el MB/BacT ALERT 3D (BioMérieux, Francia) y el VersaTrek (TREK Diagnostics, EEUU) (Figura 11A, 11B, 11C). Se basan en un medio base (normalmente Middlebrook 7H9), al que se incorporan suplementos de enriquecimiento y antibiótico inhibitor de flora acompañante. Para la detección, el MGIT 960 incorpora un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio); así, con el consumo de O<sub>2</sub> debido al crecimiento micobacteriano, se visualiza un brillo anaranjado fluorescente bajo luz UV. En el caso del BacT ALERT 3D, el crecimiento micobacteriano se detecta por la producción de CO<sub>2</sub>, que produce un cambio del pH detectable por el aparato. El VersaTREK detecta el consumo de oxígeno mediante sensores de presión. Todos están monitorizados y ofrecen un resultado cualitativo.

**Figura 11A.** MGIT 960



**Figura 11B.** Bact Alert



**Figura 11C.** VersaTrek



### 7.3.2. Medios sólidos

Uno de los más utilizados es el Löwenstein-Jensen, fabricado con huevo (fuente de lípidos) y dispensado en “pico de flauta”. Incluye verde de malaquita como inhibidor de la flora acompañante, tiene una elevada sensibilidad de recuperación de micobacterias e inhibición de productos tóxicos que pueda contener la muestra (Figura 12A).

Entre los medios que contienen agar son conocidos el 7H10 y 7H11 de Middlebrook en placa (Figura 12B), que permiten un crecimiento un poco más rápido que los medios con huevo.

**Figura 12A.** Cultivo positivo de *M. tuberculosis* complex en medio de Löwenstein-Jensen.



**Figura 12B.** Morfología de *M. tuberculosis* complex en medio 7H10 o 7H11 de Middlebrook.



Los medios sólidos para la detección de *M. tuberculosis* complex suelen incubarse a 37°C y una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5-10%, hasta un máximo de 6 semanas; si no se visualiza crecimiento tras este tiempo se considera el cultivo como negativo.

### 7.4. Identificación a partir de aislamiento clínico

Tras detectarse crecimiento micobacteriano en un medio de cultivo, es necesaria su identificación, con el fin de determinar que se trata de *M. tuberculosis* complex o bien se trata de una micobacteria no tuberculosa.

#### 7.4.1. Pruebas fenotípicas

Tal como se ha descrito anteriormente, *M. tuberculosis* complex tiene un crecimiento muy lento y ausencia de pigmento, y presenta una morfología bastante característica (“miga de pan”) en medios sólidos. Además, en cuanto a las pruebas bioquímicas más importantes, muestra reacción positiva para reducción de nitratos, acumulación de ácido nicotínico (prueba de la niacina positiva) y catalasa (detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) termolábil.

#### 7.4.2. Pruebas cromatográficas

Se basa en el análisis del componente lipídico de la pared celular micobacteriana, característica de cada especie. Existen tres tipos de técnicas, la cromatografía de gases (GLC), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la de capa fina (TLC) (aunque esta última es poco discriminativa y apenas se usa).

Tanto la GLC como la HPLC constan de una extracción de ácidos grasos de la muestra y posterior separación en columna en función de su longitud de la cadena. El resultado final viene dado con una curva que contiene un determinado número de picos, cada uno correspondiente a un ácido graso. La diferencia entre ambas técnicas es el proceso de extracción: en la GLC los ácidos grasos se muestran como metil-ésteres, y en la HPLC como ésteres de bromofenacil capaces de adsorber la luz UV y por tanto de ser leídos mediante espectrofotometría. La HPLC da una variedad de picos más amplia, hasta 37, y por ello es más discriminativa que la GLC. *M. tuberculosis* complex presenta patrones inespecíficos, con lo que la mayoría de veces estas técnicas son simplemente de exclusión y no tanto de identificación [42]. Además el método es laborioso y se requiere de equipamiento y personal especializado.

#### 7.4.3. Pruebas inmunocromatográficas

Estas técnicas constituyen un avance muy reciente dentro de los métodos de identificación a partir de cultivo. El más novedoso, es el basado en el antígeno MPT64 y está comercializado bajo tres marcas diferentes: Capilia TB (TAUNS, Japón y Nippon Becton Dickinson Co, Ltd, Japón), SD TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics, Corea) y BD MGIT TBc Identification Test (Becton Dickinson). Se basa en la reacción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno MPT64, una de las proteínas predominantes excretadas por *M. tuberculosis* complex, con la excepción de algunas subcepas de *M. bovis* BCG [43].

La técnica se realiza a partir de cultivo, añadiendo a la tira un cierto volumen del cultivo líquido o una resuspensión de colonias del cultivo sólido. Esta tira de nitrocelulosa lleva inmovilizado los anticuerpos anti-MPT64 los cuales a su vez están conjugados con partículas de oro coloidal, que facilitan la visualización colorimétrica (color rosado), en un máximo de 15 minutos (Figura 13). Es un método sencillo y de bajo coste, por lo que se ha convertido en alternativa a las sondas de ácidos nucleicos en la práctica de rutina (apartado 7.4.4.1). Estudios de meta-análisis demuestran una sensibilidad del 97-99% y una especificidad del 99-

100% en aislamientos clínicos, sin diferencias estadísticamente significativas entre los 3 métodos comercialmente disponibles [44].

**Figura 13.** Resultado positivo del test BD MGIT TBc (arriba) y SD TB Ag MPT64 Rapid (abajo).



#### 7.4.4. Pruebas moleculares

##### 7.4.4.1. Sondas de ácidos nucleicos

Se trata de sondas de ADN que hibridan con el ARN ribosómico de las micobacterias. Las más utilizadas, desde hace años, son las sondas AccuProbe MTC (GenProbe, EEUU) que permiten identificar *M. tuberculosis* complex y otras MNT de relevancia clínica (*Mycobacterium avium*, *M. avium-intracellulare*, *Mycobacterium gordonae* y *M. kansasii*), en menos de 2 horas. La desventaja es que hace falta una primera orientación macro o microscópica para decantarse por la sonda a utilizar, ya que en cada ensayo sólo se puede realizar una determinación.

##### 7.4.4.2. Pruebas basadas en amplificación genética

Se basan en la amplificación de ácidos nucleicos (NAA), normalmente por PCR, de una región del genoma micobacteriano y posterior análisis del producto amplificado. En estas técnicas, se trabaja a partir de una extracción del ADN genómico de unas 4-5 colonias del medio sólido, o unos 500 microlitros del cultivo líquido. En la mayoría de los casos basta con un choque térmico (ebullición), durante unos 20 minutos, para lisar las células y obtener el ADN para trabajar.

#### 7.4.4.2.1. PCR-RFLP del *hsp65* (PRA)

El gen *hsp65* codifica una proteína *heat-shock* de 65KDa, cuya secuencia tiene zonas conservadas y zonas variables, las cuales permiten discernir entre las diferentes especies del género micobacteriano. Tras la amplificación con los *primers* (o cebadores) *TB11* y *TB12*, se realiza una digestión enzimática con *BstEII* y *HaeIII*, del producto amplificado. El polimorfismo genético entre especies hará que las dianas de corte de estas enzimas se encuentren en un número de veces y posiciones diferentes, con lo que finalmente podremos observar, por electroforesis, un patrón de bandas característico según la especie e, incluso, subespecie [45]. Así, *M. tuberculosis* complex presenta un patrón de PRA de 235/120/85 con *BstEII* y 150/130/70 con *HaeIII*, diferente al resto de micobacterias (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). Esta técnica es sencilla, rápida y de bajo coste económico. Las desventajas son la baja sensibilidad de amplificación, la frecuente aparición de nuevos patrones y la escasa actualización de la base de datos disponible.

#### 7.4.4.2.2. Secuenciación del ADNr 16S

Se basa en la amplificación genética (PCR convencional) mediante *primers* específicos diseñados para amplificar la zona de interés (normalmente el ADNr del 16S o la región intergénica del 23S), con la peculiaridad de que los nucleótidos incorporados durante la síntesis de cadena están marcados con 4 fluoróforos diferentes (uno por cada nucleótido) de manera que el secuenciador puede crear un cromatograma de la secuencia de pares de bases. La secuencia obtenida se introduce en una base de datos (GenBank: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> o bien RIDOM 16S rDNA: [www.ridom-rdna.de/](http://www.ridom-rdna.de/)) para determinar, por mayor grado de homología obtenida, de qué especie se trata. Sin embargo, la aplicación sistemática de la secuenciación en rutina se ve dificultada por la laboriosidad de la técnica, su considerable coste económico y a que, en ocasiones, la secuenciación no lleva a una identificación definitiva si no está complementada con una o varias pruebas fenotípicas. Por estos motivos, la secuenciación se realiza casi exclusivamente en laboratorios de referencia con equipamiento y personal cualificados.

Sin embargo, el futuro de la secuenciación es muy prometedor, y se está trabajando en el desarrollo de nuevas metodologías que permitan reducir el coste, la complejidad metodológica e incluso el tiempo de respuesta, con el fin de poder realizar lo que se ha denominado “secuenciación masiva”. Una de estas metodologías es la pirosecuenciación. Surgió hace casi una década [46] y consiste

en un proceso semi-automatizado de secuenciación donde, en lugar de detectar la fluorescencia que emiten los nucleótidos al sintetizarse la cadena, como ocurre en la secuenciación convencional, se trata de detectar la luz que emite una luciferasa tras la liberación del pirofosfato en la síntesis de ADN. La cantidad de luz emitida, proporcional al número de nucleótidos incorporados, se refleja en forma de pirogramas. La pirosecuenciación permite secuenciar genomas completos en un solo día a un menor coste económico que la secuenciación convencional.

#### 7.4.4.2.3. Pruebas de hibridación en fase sólida

En este caso, tras una amplificación específica se realiza una hibridación con sondas cortas (alrededor de 20 nucleótidos) marcadas e inmovilizadas en un soporte sólido, siendo los más comunes las tiras de nitrocelulosa y los *microarrays*. Los *microarrays* de ADN para la identificación de *M. tuberculosis* complex a partir de cultivo, son una herramienta mucho más reciente, con buenas expectativas de futuro pero con aún poca experiencia.

En cuanto a las técnicas basadas en tiras de nitrocelulosa como fase sólida de hibridación, existen dos sistemas comerciales: INNO-LiPA (Innogenetics, Bélgica) y GenoType Mycobacterium (HainLifescience, Alemania). En el caso del INNO-LiPA la diana es el espacio intergénico 16S-23S, y el 23S en el caso del GenoType. Ambos identifican *M. tuberculosis* complex y otras MNT relevantes. El INNO-LiPA consta de 16 sondas que identifican *M. tuberculosis* complex, *M. kansasii* (subtipos I, II y III), *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium xenopi*, *M. gordonae*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium marinum/ulcerans*, *Mycobacterium celatum*, *M. avium-intracelulare* complex, *M. avium*, *M. intracelulare* (grupo 1 y 2), *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium chelonae* complex (grupo 1 y 2), complejo *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium smegmatis*.

El sistema GenoType incluye dos primeras tiras para identificación dentro del género *Mycobacterium*. Una primera (CM) para 14 especies: *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracelulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium peregrinum*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *Mycobacterium interjectum* y *M. marinum/ulcerans*. Si el aislamiento no fuese identificado, existe una segunda tira (AS) que aparte de repetir *M. kansasii* incluye: *M. simiae*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *Mycobacterium*



*lentiflavum*, *Mycobacterium heckeshornense*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium phlei*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *Mycobacterium asiaticum*, y *Mycobacterium shimoidei*.

El GenoType además incluye un kit (GenoType MTBC) de identificación de especie dentro de *M. tuberculosis* complex, permitiendo diferenciar entre *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis ssp. bovis*, *M. bovis ssp. caprae* y BCG [47].

### 7.5. Nuevos métodos para la detección directa en muestra

Tal como se ha explicado anteriormente, aunque el diagnóstico de tuberculosis se realiza muchas veces a través de la sospecha clínica y evidencias radiológicas, se necesita una confirmación microbiológica que, sobre todo en los casos de baciloscopia negativa, puede demorarse varias semanas (hasta la obtención de un cultivo positivo). Es por ello que en las últimas dos décadas se ha trabajado en el campo del diagnóstico directo a partir de muestra clínica, con el objetivo de obtener sistemas de detección rápidos, sensibles y de coste razonable que detecten la presencia del bacilo tuberculoso directamente en muestras clínicas.

#### 7.5.1. Micobacteriófagos

Desde mediados del siglo pasado, se han desarrollado sistemas basados en la infección con micobacteriófagos, para la detección de *M. tuberculosis* complex directamente en muestra clínica. Existen varias estrategias, con una gran variabilidad en cuanto a valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos [48],[49]. Se dispone de varios métodos comerciales, basados en dos tipos de técnicas: **Luciferase reporter phage assay** (LRP) o el **Phage amplified assay** (PhaB o MAB). La primera se basa en la detección de luminiscencia como resultado de la expresión del gen *fflux*, insertado en el genoma del fago y que se expresa cuando éste infecta *M. tuberculosis* complex. El segundo método se basa en la capacidad del fago de replicarse y lisar las células micobacterianas; la presencia de *M. tuberculosis* complex se detecta gracias a la aparición de calvas en el crecimiento confluyente (“césped”) de *Mycobacterium smegmatis* (micobacteria huésped) causadas por los fagos liberados tras la lisis micobacteriana (Figura 14).

Si bien estas metodologías son sencillas, de bajo coste económico y de elevada especificidad, su sensibilidad ha demostrado ser menor cuando el inóculo de *M. tuberculosis* complex en la muestra es escaso (especialmente en aquellas muestras con cultivo positivo pero con baciloscopia negativa).

**Figura 14.** Ejemplo de la metodología *Phage amplified assay*: método *PhageTek MB Assay* (PhaB) (tomado de Alcaide *et al*, 2003) [49].

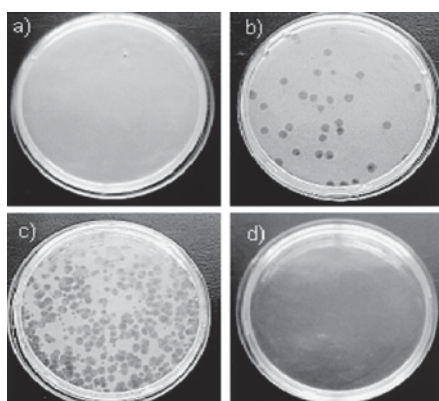


Fig 14. Leyenda: a) resultado negativo; b) resultado positivo para *M. tuberculosis* complex: placas aisladas de lisis; c) resultado positivo para *M. tuberculosis* complex: placas confluentes de lisis; d) resultado positivo para *M. tuberculosis* complex: lisis total.

### 7.5.2. Técnicas moleculares

Sin duda, los métodos de biología molecular desarrollados en los últimos años constituyen el gran avance en el diagnóstico rápido de las enfermedades infecciosas como la tuberculosis. Su utilidad ha sido ampliamente evaluada [50-52] y existen guías para su uso en rutina [53]. Estas técnicas ofrecen varias ventajas frente a los métodos de detección convencionales (cultivo); la más importante es el menor tiempo de respuesta, que puede adelantar el diagnóstico de varias semanas a unas pocas horas. Además, los procedimientos de extracción-amplificación y reactivos de estas técnicas son más sensibles que aquéllos de las técnicas de identificación en cultivo, ya que la concentración bacilar en muestra clínica es mucho menor que cuando se trabaja a partir de cultivo.

Aunque el coste económico que suponen estas técnicas (la mayoría comerciales) puede ser más o menos elevado, la mayoría muestran una buena relación coste-beneficio siempre que se apliquen en los casos de alta sospecha clínica [54],[55]. Existen múltiples sistemas, caseros y comerciales (Tabla 1), aunque se recomienda el uso de los sistemas comerciales ya que están estandarizados y cuentan con la aprobación de diferentes organismos internacionales.

### 7.5.2.1. Amplificación de la secuencia diana y posterior detección del producto amplificado

Estos métodos se fundamentan en la amplificación de una región genética específica (normalmente por PCR), donde la detección del producto amplificado se realiza posteriormente, normalmente por técnicas de hibridación en fase sólida, o también por secuenciación.

Uno de los primeros sistemas en ser aprobado en los años 90 por la FDA (*Food and Drug Administration*) tanto para muestras con baciloscopia positiva como negativa, fue el **AMTD2** (*Amplified M. tuberculosis direct assay*; Gen-Probe Inc.) y es una de las denominadas técnicas TMA (*transcription-mediated amplification*). A diferencia de la PCR, la TMA es una reacción isotérmica (42°C) con un primer paso de transcripción inversa del 16S ARNr. Después hay una hibridación con sondas de ADN, específicas de *M. tuberculosis* complex, que están marcadas con moléculas de ésteres de acridina. La detección del producto es por quimioluminiscencia, aunque la desventaja es que no hay automatización ni controles internos. El resultado está disponible en unas 2 horas y media. Los estudios publicados avalan su buena sensibilidad y especificidad, sobre todo en muestras pulmonares con baciloscopia positiva (91-100%), mientras que los valores descienden al 65-92% si la baciloscopia es negativa. En muestras extrapulmonares, los valores son muy variables en función de la baciloscopia, con intervalos del 88-100% y el 63-100% en casos de baciloscopia positiva y negativa, respectivamente. La especificidad también es muy elevada (92-100%) y no se han hallado casos de reacciones cruzadas con MNT [56-57].

Otro sistema es el **Cobas AmpliCor Mycobacterium tuberculosis test** (Roche Diagnostic System Inc., Suiza), basado en la amplificación del 16S ARNr por PCR y posterior hibridación con sondas oligonucleotídicas, dando lugar a una detección colorimétrica del híbrido. Este sistema también cuenta con la aprobación de la FDA para muestras respiratorias con baciloscopia positiva y a diferencia del sistema anterior, sí que puede automatizarse la extracción del ADN (AmpliPrep); además, se dispone de un control interno que amplifica conjuntamente con la muestra y permite detectar la presencia de inhibidores internos. El resultado está disponible en 6-7 horas. Los estudios de evaluación con esta técnica han mostrado valores buenos de especificidad (91-100%) y muy variables en cuanto a sensibilidad. En muestras respiratorias con baciloscopia positiva está en un 90-100%, y un intervalo de 50-96% en baciloscopia negativa. En extrapulmonares los valores son muy

variables, entre el 27 y el 85%. Sin embargo, se han detectado algunos falsos positivos por reacciones cruzadas con algunas MNT [58].

La técnica **LCx** (Abbot Laboratorios, EEUU) es un método semi-automatizado de detección directa basado en la amplificación por LCR (*ligase chain reaction*) de un gen que codifica la PAB (proteína antigénica b) y aunque tuvo unos buenos valores de efectividad en muestras respiratorias (sensibilidad de 65-90% y especificidad de 90-100%) [59],[60], la técnica LCx fue retirada del mercado europeo en 2002.

Cabe mencionar también las técnicas SDA (*strand displacement amplification*). Entre ellas, el **BD ProbeTec ET Direct TB System** (Becton Dickinson) es el test comercial más conocido. Se trata de una reacción isotérmica (52,5°C) donde, por un proceso enzimático, se originan múltiples copias de dos dianas genéticas: 16S ARNr e IS6110. La detección final es por fluorescencia y se completa en unas 3-4 horas. Las cifras de especificidad son altas (98-100%), así como las de sensibilidad en muestras con baciloscopia positiva, sobre todo en respiratorias (alrededor del 90-95%) [61-63]; en negativas desciende hasta un 30-85% según los estudios.

Otros métodos interesantes son los basados en la técnica NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*). El NASBA es un método autocatalítico e isotérmico que utiliza 3 enzimas: una retrotranscriptasa, una ARNasa y una ARN polimerasa. El test comercial más conocido es el **GenoType Mycobacteria Direct** (HainLifescience), que detecta el 23S ARNr de *M. tuberculosis* complex, además del de otras 5 MNT patógenas. El resultado de la amplificación se revela mediante hibridación en fase sólida (resultado colorimétrico en una tira de celulosa). Esta técnica apareció a inicios del año 2000 y no existe demasiada evidencia bibliográfica, si bien los resultados de sensibilidad y especificidad de que se disponen son buenos y comparables a otros métodos de detección directa por amplificación convencional [64-67], aunque inferiores en muestras baciloscopia-negativas [68].

Dentro de las técnicas más recientes, está la tecnología GenoQuick (HainLifescience) que apareció en el año 2010 para la detección directa de MRSA y Bordetella [69],[70]. Recientemente se ha desarrollado una prueba para *M. tuberculosis* complex, el **GenoQuick MTB**. Se trata de una PCR convencional, con el IS6110 como región diana, y una posterior hibridación y detección en una tira de nitrocelulosa mediante hibridación en flujo lateral (*lateral-flow dipstick*). La

extracción de ADN puede ser manual o automatizada. La aplicación de las tiras en la mezcla post-amplificación es manual. El tiempo de respuesta es de unas 3 horas y, según validaciones internas, es apto tanto para muestras respiratorias como extrapulmonares, con un límite de detección de 500-1.000 bacterias/ml [71].

#### 7.5.2.2. Técnicas de PCR a tiempo real

La aparición de estas técnicas de detección directa, a inicios del siglo XXI, ha supuesto un gran avance en el diagnóstico molecular de la tuberculosis. Esta metodología se basa en la amplificación e hibridación simultánea del producto amplificado con sondas complementarias marcadas con fluorescencia (las más comunes: *TaqMan*, *molecular beacons*, *bioprobes* o *FRET*). Ello permite visualizar el resultado a tiempo real, a través de un gráfico donde se observa al grado de fluorescencia emitido, en función de la ausencia/presencia y cantidad de ADN de *M. tuberculosis* complex existente en la reacción. En muchos casos, el resultado que ofrecen estas técnicas es semi-cuantitativo, es decir, permite obtener una idea de la concentración inicial de ADN micobacteriano, en función del ciclo umbral de fluorescencia (ciclo en el que se detecta el incremento de la fluorescencia, respecto al nivel basal).

Una de estas técnicas comerciales, basada en la detección del 16S ARNr mediante detección con sondas *TaqMan*, es la técnica **Cobas TaqMan MTB** (Roche Diagnostics) [72],[73], derivada de la Cobas Amplicor MTB (PCR convencional) de la misma casa comercial. Aunque según algunos estudios, la versión a tiempo real no supone una mejora significativa en términos de sensibilidad, sí se aprecia un incremento de la especificidad y un descenso de resultados inválidos respecto a la versión convencional [74].

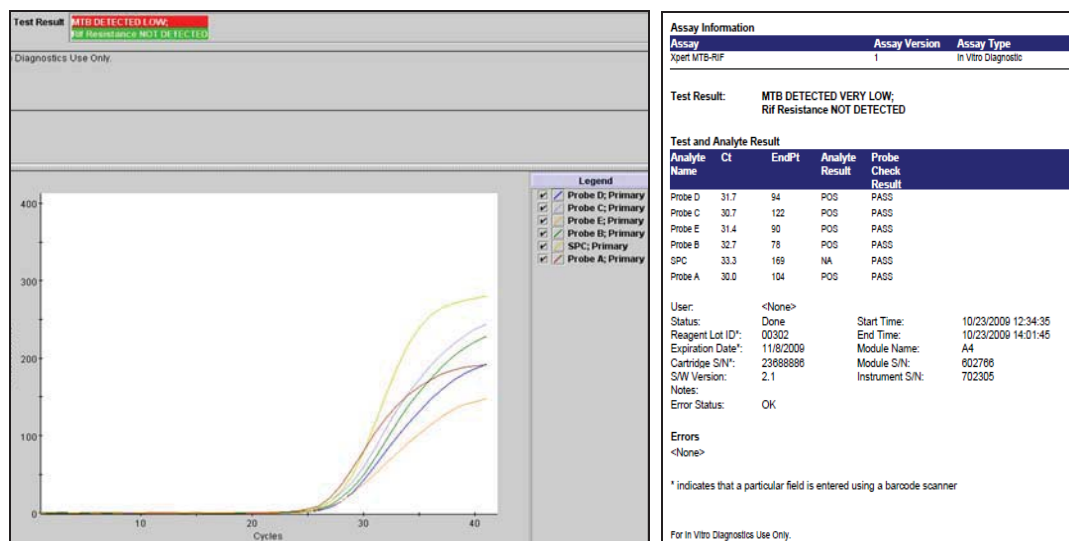
El **FluoroType MTB** (HainLifescience) es un sistema de muy reciente aparición (2011). Se trata de una PCR a tiempo real, aunque no integrada (la extracción de ADN puede ser automatizada pero en un aparato aparte) que detecta *M. tuberculosis* complex en 3 horas. Su diana es el IS6110, y las sondas de tiempo real son las denominadas *Hybeacon*. Las sondas *Hybeacon* se unen al producto amplificado y emiten fluorescencia, pero a medida que desciende la temperatura se separan, descendiendo también la fluorescencia. El software reconoce la curva de fluorescencia característica de *M. tuberculosis* complex. Las evaluaciones internas revelan una buena sensibilidad y especificidad pero aún no se dispone de estudios externos publicados que avalen su efectividad real.

El **Anyplex plus MTB/NTM/DR-TB** (Seegene Inc., Corea) es un sistema prometedor, de PCR a tiempo real con oligonucleótidos marcados, integrada, que sirve para la detección no sólo de *M. tuberculosis* complex, sino de otras micobacterias, en tan sólo 2 horas. Además, en caso de resultar un test positivo para *M. tuberculosis*, es posible determinar la resistencia a los principales fármacos antituberculosos (isoniazida y rifampicina) en un segundo test adicional que dura tan sólo 40 minutos. Sin embargo, aún no hay datos publicados acerca de su efectividad.

Recientemente, han aparecido nuevas técnicas que reducen a la mínima expresión la manipulación de la muestra y por tanto el riesgo de contaminación cruzada. El método más revolucionario en este sentido es el sistema GeneXpert (Cepheid, EEUU y FIND Diagnostics, Suiza), con el ensayo específico **Xpert MTB/RIF** para la detección de *M. tuberculosis* complex y resistencia a la rifampicina. Este sistema apareció en el año 2009, y los primeros estudios de evaluación fueron publicados a principios de 2010 [75]. La novedad que ofrece este sistema es que integra en un solo cartucho la extracción de ADN, la amplificación genética y la detección por hibridación con sondas a tiempo real (*molecular beacons*). La diana de amplificación que utiliza este sistema es la región *core* del gen *rpoB* que, como se detallará en el apartado 9.2, es la región determinante de la resistencia a rifampicina, con lo que el sistema Xpert MTB/RIF se presenta no sólo como un método de detección directa de *M. tuberculosis* complex, sino también de detección rápida de mutaciones relacionadas con la resistencia a la rifampicina. La detección a tiempo real se consigue gracias a la hibridación con 5 sondas complementarias a la región *core* del *rpoB*. La hibridación de al menos 3 de ellas significa detección de *M. tuberculosis* complex, y a su vez la hibridación de 3 ó 4 (todas menos 1 ó 2) evidencia al menos una sustitución nucleotídica en la secuencia *wild-type* del gen, con lo que se infiere la resistencia a la rifampicina. El software incluye una serie de algoritmos para ofrecer un resultado semicuantitativo del ensayo (*MTB Detected High/ MTB Detected Medium/ MTB Detected Low/ MTB Detected Very Low/ MTB Not Detected*). En caso de detectar ADN del bacilo, el informe del Xpert MTB/RIF ofrece un resultado de resistencia a la rifampicina (*Rif Resistance Detected/ Rif Resistance Not Detected*) (Figura 15). El ensayo contiene, además, unas esporas de *Bacillus globii*, las cuales son procesadas por el sistema, que extrae el ADN, lo amplifica e hibrida con unos *primers* y sonda específicos (control positivo). En caso de no lograrse la extracción y/o amplificación de este control, el resultado que da la

técnica no es válido (*Invalid*). El tiempo de respuesta del Xpert MTB/RIF es de 2 horas, con tan sólo 2 minutos de procesamiento manual.

**Figura 15.** Software del sistema GeneXpert (Xpert MTB/RIF) donde se observa el gráfico de PCR a tiempo real, y el informe de resultados.



Varios estudios avalan la buena sensibilidad de este sistema, incluso en muestras con baciloscopia negativa, donde se alcanzan valores de sensibilidad de alrededor del 75% [75],[76]. La OMS, en el año 2011 y tras la revisión de los estudios publicados hasta la fecha acerca de la efectividad del Xpert MTB/RIF, publicó una serie de recomendaciones acerca del uso de este ensayo en los laboratorios de diagnóstico de tuberculosis. En un primer lugar, recomendó la realización de este test como primera herramienta de diagnóstico en países con alta incidencia de tuberculosis multirresistente (apartado 9) o coinfección con el VIH. En el resto de países, recomienda considerar este test como segundo sistema de diagnóstico (tras la microscopía), en casos de baciloscopia negativa. Estas recomendaciones sólo se aplicaron al diagnóstico de la tuberculosis pulmonar [77].

La técnica Xpert MTB/RIF sólo se validó en un inicio para muestras respiratorias, por lo que los estudios disponibles en la literatura están realizados predominantemente en este tipo de muestras. Recientemente, han comenzado a aparecer estudios en muestras extrapulmonares en adultos e incluso en niños [78]. Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados en muestras extrapulmonares incluyen un bajo número de muestras [79-81], o bien están realizados en zonas de alta incidencia tuberculosa [82]. Por último, y al ser el GeneXpert un sistema de elevado coste económico, se hacen necesarios estudios que evalúen su relación

coste-beneficio, para determinar la rentabilidad real que supone la realización de esta prueba.

**Tabla 1.** Tabla resumen de los métodos moleculares para la detección directa de *M. tuberculosis* complex (tomado de Alcaide y Coll, 2011) [83].

Assay	Amplification method	Target	Detection	Sample vol (µl)	Turnaround Time (h)	Automation	IAC
Cobas Amplicor	PCR	16S rRNA	Colorimetric	100	6-7	Yes	Yes
AMTD	TMA	16S rRNA	Chemiluminiscent	450	2.5	No	No
LCx	LCR	PAB	Fluorimetric	500	6	Yes	No
BD Probe Tec	SDA	IS6110 - 16S rRNA	Fluorimetric	500	3.5-4	Yes	Yes
Inno-Lipa	Nested-PCR	<i>rpoB</i> gene	Colorimetric	500	12	Yes	No
GenoType MD	NASBA	23S RNA	Colorimetric	500	5.5	Yes	Yes
RT-PCR*	Real-time PCR	16S rRNA	Fluorimetric	10-100	2-3	Yes	Yes
GeneXpert	Real-time PCR	<i>rpoB</i> gene	Fluorimetric	1,000	2	Yes	Yes
GenoQuick	PCR	IS6110	Colorimetric	500	2.5	No	Yes

Tab 1. Leyenda: IAC: *Internal amplification control*; PCR: *Polymerase chain reaction*; TMA: *Transcription-mediated amplification*; LCR: *Ligase chain reaction*; SDA: *Strand displacement amplification*; NASBA: *Nucleic acid sequence-based amplification*; RT-PCR: *Real-time PCR*.

## 8. TRATAMIENTO

### 8.1. Tratamiento de la enfermedad tuberculosa

#### 8.1.1. Principios del tratamiento farmacológico

El adecuado tratamiento farmacológico de la tuberculosis tiene como objetivo erradicar los bacilos existentes en el enfermo, lo cual llevará a su curación y evitará su recaída, además de impedir la transmisión de la infección a otras personas de su entorno.

El bacilo tuberculoso y la respuesta inmunológica del huésped determinan en gran medida las bases de la terapia farmacológica de la tuberculosis: 1) debido a las características peculiares de este género bacteriano, ya comentadas previamente (en especial, las características de su pared celular) la mayoría de los antimicrobianos convencionales no son útiles en *M. tuberculosis* complex. Por ello, los agentes efectivos contra la tuberculosis conforman un pequeño grupo de antimicrobianos, denominados fármacos “antituberculosos”; 2) durante la replicación bacteriana, el bacilo tuberculoso puede experimentar mutaciones cromosómicas espontáneas que pueden afectar a la diana del fármaco antituberculoso, dando lugar a la resistencia a éste. Por ello, es necesario administrar varios fármacos simultáneamente, de manera que se reduzca al



máximo la probabilidad de que aparezca un mutante resistente a alguno de los fármacos. De otra forma, si se administrase una monoterapia o biterapia, se conseguiría reducir la población bacilar en un inicio (ya que la mayoría de bacilos son teóricamente sensibles), pero a continuación habría un repunte (“*fall and rise*”), debido a la multiplicación de los mutantes resistentes; y 3) debido a las características de la patogenia del bacilo tuberculoso, durante la enfermedad se originan varias poblaciones bacilares: una extracelular en proliferación, otra poco activa en las lesiones caseosas y otra latente en el interior de los macrófagos. Para erradicar estas diferentes poblaciones, incluso las formas intracelulares (en un estado metabólicamente inactivo) es necesario administrar los antituberculosos por un periodo prolongado de tiempo, siendo el mínimo 6 meses [84].

Los fármacos utilizados en la terapia antituberculosa, han sido clasificados por la OMS en varios grupos (Tabla 2), por orden de elección en función de su eficacia y bioseguridad.

**Tabla 2.** Clasificación de los fármacos antituberculosos (criterio de la OMS).

Grupo	Fármacos (abreviaturas)
1 Antituberculosos orales de primera línea	Isoniazida (H), Rifampicina (R), Etambutol (E), Pirazinamida (Z)
2 Antituberculosos inyectables	Estreptomina (S), Kanamicina (Km), Amikacina (Am), Capreomicina (Cm)
3 Fluoroquinolonas	Levofloxacino (Lfx), Moxifloxacino (Mfx), Gatifloxacino (Gfx), Ofloxacino (Ofx)
4 Bacteriostáticos de segunda línea	Ácido p-aminoacilsalicílico (PAS), cicloserina (Cs), Terizidona (Trd), Etionamida (Eto), Protionamida (Pto)
5 Otros (de eficacia poco demostrada aún)	Clofazimina (Cfz), Linezolid (Lzd), Tiazetazona (Thz), Claritromicina (Clr), Amoxicilina/clavulánico (Amx/Clv)

### 8.1.2. Principales fármacos antituberculosos (Grupo 1)

La **isoniazida (H)**, introducida en la terapia antituberculosa en 1952, es un fármaco crucial en el tratamiento de la tuberculosis, por ser el más bactericida de todos. Se trata de un pro-fármaco que, tras ser metabolizado por la enzima catalasa-peroxidasa sintetizada por la expresión del gen *katG*, se convierte en ácido isonicotínico (forma activa). Esta forma activa interfiere con la síntesis de la ACP

(*enoyl-acyl carrier protein*)-reductasa, parte de la FAS II (*fatty acid synthase type II*), una enzima codificada por el gen *inhA* necesaria en la formación de los ácidos micólicos de la pared celular [85]. Es muy eficaz en la erradicación de la población bacilar extracelular (bactericida) y, aunque en menor grado, en la que se halla en las lesiones caseosas con baja tensión de O<sub>2</sub> (bacteriostático).

La **rifampicina (R)** se une a la subunidad β de la ADN polimerasa, inhibiendo la síntesis de ARN. Después de la isoniazida, es el antituberculoso más bactericida sobre la población extracelular, y el más eficaz en la erradicación de los bacilos presentes en las lesiones caseosas [86].

La **pirazinamida (Z)** es un pro-fármaco que, en el interior del bacilo y mediante la enzima pirazinamidasasa (PZasa), se transforma a la forma activa (ácido pirazinoico; POA) la cual, a pH ácido, tiene poder antituberculoso sobre todo sobre la población durmiente en el interior de los macrófagos. La diana de este antituberculoso y su mecanismo de acción no están claros. Una primera hipótesis es que el POA se une a una enzima que sintetiza ácidos grasos (FAS I) inhibiendo su acción [87]. Recientemente, algunos estudios especulan que la diana sería la proteína ribosomal SA (RpsA) de forma que se inhibiría la trans-translation, esencial en la liberación de los escasos ribosomas de las células durmientes, lo que explicaría su actividad en los bacilos intracelulares [88].

El **etambutol (E)** inhibe la arabinosiltransferasa, enzima esencial en la síntesis del arabinolactano y lipoarabinomano, componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* complex [89]. Aunque se trata de un bacteriostático activo sobre todo en las formas extracelulares del bacilo, y hasta hace poco tiempo tan sólo se administraba en ciertos casos, en la actualidad forma parte de la terapia antituberculosa estándar (apartado 8.1.4). Su inclusión como cuarto fármaco de la pauta farmacológica habitual se explica por el incremento de casos de resistencia a los otros antituberculosos.

### 8.1.3. Otros fármacos antituberculosos (Grupos 2-5)

Debido a la aparición progresiva de resistencias a los fármacos antituberculosos de primera línea, se ha investigado acerca de la utilidad de otros fármacos en el tratamiento de la tuberculosis. En casos especiales como la multirresistencia (apartado 9) o toxicidad a uno o varios de los fármacos del Grupo 1, se recurre a otros fármacos con propiedades antituberculosas. Uno de ellos es la

**estreptomina (S)**, que fue el primer antibiótico usado contra la tuberculosis, a mediados del siglo XX. Este agente pertenece al grupo de los aminoglucósidos y actúa en la subunidad S12 del ribosoma bacteriano, causando deficiencia en la lectura del código genético e inhibición de la traducción del ARNm (inhibición de la síntesis proteica) [90],[91]. La S está incluida entre los tradicionalmente denominados antituberculosos de “primera línea” (junto con los 4 fármacos descritos anteriormente H, R, Z, E); sin embargo, no se incluye en la terapia estándar inicial contra la tuberculosis sensible, ya que no se administra vía oral (es inyectable), tiene importantes efectos adversos y, además, la tasa de resistencia a estreptomina es bastante elevada.

La **kanamicina**, **amikacina** y **capreomicina** son los demás antituberculosos del Grupo 2. Los dos primeros pertenecen al grupo de aminoglucósidos e interfieren en la subunidad 30S del ribosoma, causando un error en la transcripción del genoma y por tanto el origen de péptidos no funcionales, causando la muerte celular [92]. Son bactericidas en la población bacilar extracelular. La capreomicina es un polipéptido cíclico cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la translación y síntesis de fenilalanina en los ribosomas micobacterianos [93].

El Grupo 3 lo conforman las **fluoroquinolonas**, cuyo efecto antituberculoso fue demostrado en la década de los 90 [94]; estos fármacos inhiben la acción de la girasa bacteriana (una de las topoisomerasas indispensables en la replicación) imposibilitando la multiplicación del bacilo. Existen diferentes fluoroquinolonas eficaces frente a *M. tuberculosis* complex, siendo el levofloxacino y el moxifloxacino los más utilizados aunque este último parece tener una mayor actividad in vitro [95].

Por último, en casos de resistencia incluso a uno o varios de los fármacos de los Grupos 2 y 3, se hace uso de otros antimicrobianos (Grupos 4 y 5) como la protionamida, la etionamida, la cicloserina, el ácido p-aminoacilsalicílico, la tiazetazona, la clofazimina, el linezolid, la claritromicina o la amoxicilina/clavulánico.

#### **8.1.4. Pauta estándar de tratamiento farmacológico**

En los nuevos casos de tuberculosis, donde no hay confirmación ni sospecha de resistencia a los antituberculosos de primera línea, la OMS recomienda una pauta combinada de 6 meses: 2HRZE/ 4HR, entendiéndose esta fórmula como 2 primeros meses con una toma diaria de 4 fármacos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol), y a continuación (cuando la población bacilar teóricamente ya ha

disminuido sensiblemente) dos meses más con isoniazida y rifampicina. Esta pauta es válida tanto en los casos de tuberculosis pulmonar como extrapulmonar [96].

Aunque la pauta 2HRZE/4HR sea la de elección, también es posible un tratamiento a días alternos: o bien 2(HRZE)<sub>3</sub>/4(HR)<sub>3</sub> (el paciente toma, 3 días a la semana, los 4 fármacos durante los 2 primeros meses, y luego H y R durante los 4 últimos meses) o bien 2HREZ/4(HR)<sub>3</sub> (el paciente sigue una pauta diaria de 4 fármacos los 2 primeros meses, y los 4 últimos meses de H y R en donde la toma es de 3 días por semana). Sin embargo, debido al alto riesgo de fallo terapéutico en caso de abandono o mal seguimiento del tratamiento, estas dos últimas alternativas requieren que un profesional sanitario supervise cada toma de medicación por parte del paciente (TDO; tratamiento directamente observado), con las complicaciones logísticas que ello conlleva.

#### **8.1.5. Pautas especiales de tratamiento farmacológico**

Se contemplan diversos escenarios en los que la pauta estándar de tratamiento de la tuberculosis ha de ser modificada. Uno de estos serían los casos de resistencia o toxicidad a uno o varios de los fármacos orales de primera línea. En caso de que se trate de la H o la R, en la segunda fase se mantiene el etambutol (o la pirazinamida) en el tratamiento, en lugar del fármaco eliminado, hasta alcanzar los 9 meses de tratamiento. Si el fármaco a sustituir es otro (ni H ni R), la segunda fase se prolonga 6 meses en vez de los 4 meses de la pauta estándar.

Los casos más complicados son los de tuberculosis multirresistente (MDR) y extremadamente resistente (XDR) (apartado 9). En estos casos es necesario el uso alternativo o adicional de varios de los fármacos descritos en el apartado 8.1.3. La adición progresiva de antibióticos alternativos a los orales de primera línea se realiza con la intención de alcanzar la cifra de al menos 4 agentes activos según el las pruebas de sensibilidad fenotípica del aislamiento clínico. Los primeros fármacos de “reserva” que se incorporan en el tratamiento de la tuberculosis MDR son la kanamicina o la amikacina (antes que la estreptomina, debido a su alta tasa de resistencia y toxicidad). A continuación, los agentes de elección serían las fluoroquinolonas (levofloxacino o moxifloxacino) y, consecutivamente, el PAS, la Eto y la Cs. Los fármacos englobados dentro del Grupo 5 (Tabla 2), no están recomendados por la OMS, debido al desconocimiento de su eficacia real en casos de tuberculosis MDR, aunque en casos de tuberculosis XDR se puede recurrir a

ellos si no es posible diseñar otra estrategia de tratamiento más adecuado. En casos de tuberculosis MDR o XDR el tratamiento se alarga a 18-24 meses [96].

#### 8.1.6. Nuevos fármacos en desarrollo

Con el fin de mejorar el tratamiento actual contra la tuberculosis, especialmente de acortar el tiempo de terapia farmacológica, se han puesto en marcha diferentes ensayos clínicos que prueban pautas con combinaciones alternativas de fármacos (sobre todo aquellas que incluyen fluoroquinolonas) o fármacos de nueva síntesis. En este último sentido destacan las oxazolidinonas, las diarilquinolonas y los nitroimidazopiranos.

El **linezolid** es la oxazolidinona con mejores perspectivas por el momento. Su efectividad está demostrada en bacterias Gram-positivas, y algunos estudios ya prueban una efectividad antituberculosa similar a la isoniazida [97],[98]. Se ha utilizado ya en el tratamiento de casos de tuberculosis MDR o XDR, aunque todavía está siendo incluido en estudios clínicos para conocer su efectividad real y, sobre todo, el riesgo de toxicidad en tratamientos de larga duración [99].

El **R207910** es la diarilquinolona más prometedora hasta el momento. Inhibe la síntesis de ATP (ATP sintasa) [100], por lo que no se prevee que presente una reacción cruzada de resistencia con los antituberculosos clásicos (diferente diana). En modelo murino, se ha observado que combinado con isoniazida y pirazinamida, o rifampicina y pirazinamida, se consigue negativizar el cultivo en sólo dos meses; sin embargo, presenta interacción farmacocinética con la rifampicina, con lo que se perfila como opción en terapias antituberculosas sin rifampicina.

Dentro de los nitroimidazopiranos, el **PA-824** inhibe la síntesis de proteínas y lípidos de la pared de *M. tuberculosis* complex. En modelo murino, su actividad bactericida es similar a la de la isoniazida, y al reemplazarlo por esta última, se consigue acortar la negativización del cultivo hasta 2 meses [101]. Además, se reduce el riesgo de recaídas, frente a la terapia estándar [102]. Por último, el **OPC-67683** inhibe la síntesis de determinados ácidos micólicos de la pared micobacteriana. Al igual que el PA-824, es un pro-fármaco que debe ser metabolizado enzimáticamente para pasar a la forma activa, y parece ser más bactericida que la isoniazida [103]. Sin embargo, aún está en etapas tempranas de estudio por lo que no es posible establecer su utilidad en la terapia alternativa contra la tuberculosis.

## 8.2. Tratamiento de la infección tuberculosa latente

Una vez confirmada la ITL y descartada la tuberculosis activa, el tratamiento quimioproláctico está recomendado cuando se cumpla una o más de las siguientes condiciones: a) que el paciente haya sido recientemente infectado (contacto reciente, con conversión tuberculínica), b) que presente una radiografía de tórax con lesiones residuales, sin haber sido previamente tratado de tuberculosis, c) que sea co-infectado con el HIV, y d) que vaya a recibir tratamiento inmunodepresor.

El fármaco antituberculoso más empleado en el tratamiento de la ITL es la isoniazida, durante un período de 6 a 9 meses [104]. Sin embargo, cada vez más se están probando regímenes alternativos, más cortos, como el que incluye rifampicina por 4 meses, o el de 3 meses con rifampicina e isoniazida, que tienen una eficacia similar al convencional con isoniazida y con la ventaja de una mejor adherencia al tratamiento [105],[106].

## 9. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS PRINCIPALES FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

La presión antibiótica ha originado, al igual que en otras enfermedades infecciosas, la aparición de cepas resistentes de *M. tuberculosis* complex. Esta resistencia se debe fundamentalmente a mutaciones cromosómicas en diferentes genes que implican una alteración en la diana de acción de los antituberculosos.

En función del momento de la aparición de la resistencia, podemos distinguir entre resistencia en pacientes sin tratamiento previo (antiguamente denominada inicial o primaria) definida como la que se presenta desde un inicio debido a que la cepa transmitida era portadora ya de mutaciones relacionadas con resistencia antibiótica, o resistencia en pacientes previamente tratados (antiguamente denominada secundaria o adquirida) definida como la que aparece una vez se ha recibido tratamiento farmacológico durante al menos un mes, normalmente debido a una mala administración del mismo (combinación insuficiente de fármacos, tratamiento intermitente no controlado o tiempo insuficiente).

Los primeros casos de resistencia aparecieron en la década de los 60 y 70, a medida que se iban incorporando los diferentes fármacos a la terapia antituberculosa. Así, los primeros casos eran resistentes a la estreptomina (tal como se ha comentado, el primer fármaco empleado contra la tuberculosis), seguido de la isoniazida. En los años 80, aparecieron los primeros casos de

tuberculosis causada por cepas MDR, es decir, resistente al menos a los dos fármacos más importantes de la terapia: rifampicina e isoniazida, situación declarada de emergencia mundial con varios brotes en la década de los 90. Ante esta epidemia, se incorporaron al tratamiento de la tuberculosis MDR los fármacos antiguamente denominados de segunda línea, y a principios del siglo XXI se registraron los primeros casos de tuberculosis XDR, es decir, la cepa multirresistente lo es además a al menos uno de los inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina), y a una quinolona. La OMS estima que, de los nuevos casos de tuberculosis que aparecen cada año globalmente, un 3,6% son MDR. Entre los previamente tratados, el porcentaje alcanza el 15%. Además, de los casos MDR, el 5.4% son también XDR [107].

### 9.1. Resistencia a la isoniazida

La resistencia a la isoniazida, en *M. tuberculosis* complex aparece con una frecuencia elevada (1 en  $10^5$ - $10^7$  bacilos) [108]. En 1993 se demostró, mediante experimentos de mutagénesis, que mutaciones en el gen *katG* (que codifica la enzima catalasa que convierte el pro-fármaco en la forma activa) determinaban una pérdida de eficacia de la isoniazida [109]. Dependiendo del área geográfica, entre el 20 y el 80% de las cepas de *M. tuberculosis* complex que son fenotípicamente resistentes a la isoniazida presentan una mutación en el gen *katG* (55% en nuestra área; [110]). La sustitución aminoacídica más frecuente es S315T, que se halla en el 50-93% de los mutantes de *katG* (32% en nuestra área; [110]). Mutaciones en este gen están relacionadas con altos niveles de resistencia, en concreto el cambio S315T confiere una pérdida del 50% de la efectividad de la isoniazida, con valores de CIM (concentración inhibitoria mínima) superiores a 50  $\mu\text{g/ml}$  [111]. Además, se ha observado que esta mutación es más frecuente en los casos de tuberculosis MDR que en los de monorresistencia [112].

La segunda diana más importante en la determinación de la resistencia, es el gen *inhA*. Mutaciones en la región promotora del gen *inhA*, en especial en las posiciones -8 y -15, provocan una sobreexpresión de este gen y están presentes en el 15-43% de las cepas resistentes a H (32% en nuestra área; [110]), aunque confieren resistencia de bajo nivel [85], y son más frecuentes en casos de monorresistencia a la isoniazida que en cepas multirresistentes o polirresistentes. Sin embargo, este tipo de mutación influye en una pérdida del denominado *fitness* bacteriano, y provoca una resistencia cruzada a la etionamida.

Existen otras dianas, algunas de ellas desconocidas, que explicarían un pequeño porcentaje de resistencias de bajo nivel a la isoniazida. Uno de los genes con los que se ha especulado es el **ahpC**, que codifica una subunidad de la alquilhidroperóxido reductasa, y cuyas mutaciones en la región promotora implicarían una sobreexpresión del gen que determinaría bajos niveles de resistencia a la isoniazida [113]. Otra de las dianas potenciales es el gen **kasA**, que al igual que el *inhA* forma parte del sistema FAS II y supuestamente sería otra diana para la H, aunque aún no se ha demostrado cómo la forma activada de la H influye en este gen y si esta interacción influye en la actividad bactericida de la H [114].

## 9.2. Resistencia a la rifampicina

La frecuencia de mutación relacionada con la rifampicina es de 1 por  $10^7$ - $10^8$  bacilos. La diana donde se concentran las mutaciones que explican el 95-98% de los casos de resistencia a la R es el gen **rpoB** [115]. Estas mutaciones determinan un cambio conformacional en la subunidad ribosomal y por tanto disminuye la afinidad del fármaco por su diana. Más concretamente, las sustituciones en este gen se concentran en la denominada región core o RRDR (*rifampin resistance determining region*), constituida tan sólo por 81 pb (codón 507-533). Las mutaciones relacionadas con resistencia a R más comúnmente halladas en el gen *rpoB*, atañen al codón 526 (H526D y H526Y sobre todo) y especialmente el codón 531 (S531L) [116],[117]. Otras mutaciones, asociadas con bajos niveles de resistencia, se han descrito en los codones 516, 518, 522, 529 y 533 (Figura 16). La frecuencia relativa de cada una de las mutaciones en *rpoB* varía en función del área geográfica, pero la mayoría de ellas se relacionan con altos niveles de resistencia (superior a 32 µg/ml) y confieren resistencia cruzada con todas las rifamicinas.

**Figura 16.** Esquema de la distribución de las mutaciones más comúnmente halladas en la región RRDR del gen *rpoB* (tomado de Negi *et al*, 2009) [118].

507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
Gly						Gln			Asp				
GGC	ACC	AGC	CAG	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC	AAC	CCG
Val						Gln			Val				
GTC						CCA			GTC				
521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	
	Ser				His					Ser		Leu	
CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	CAC	AAG	CGC	CGA	CTG	TCG	GCG	CTG	
	Leu				Asp					Trp		Pro	
	TTG				GAC					TGG		CCG	
					Tyr					Leu			
					TAC					TTG			



De forma destacable, ya que la mayoría de cepas resistentes a R, lo son también a la H, la detección de mutaciones en *rpoB* puede ser considerada como un marcador de tuberculosis MDR [119],[120] (Figura 17).

**Figura 17.** Diagrama de la proporción de resistencia a la isoniazida y la rifampicina atribuible a cada una de las dianas más importantes, e interrelación entre ellas.

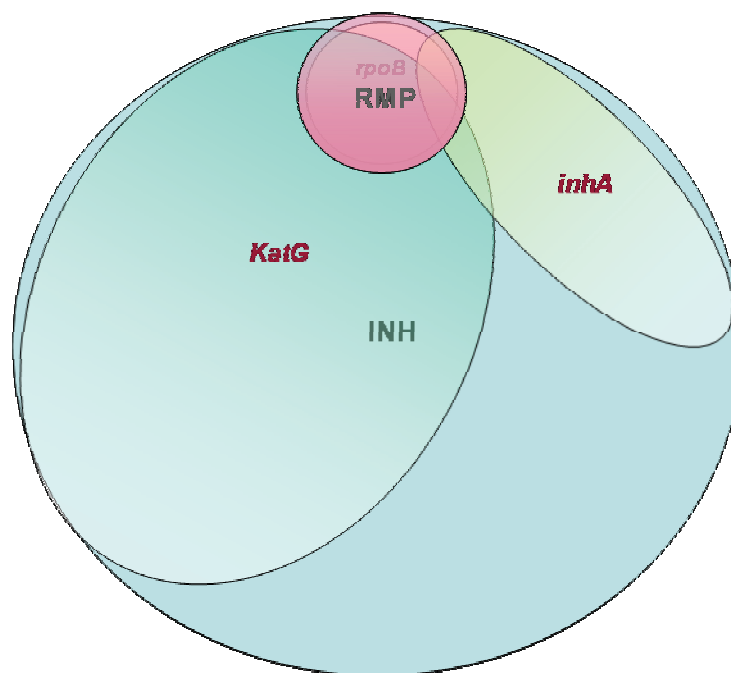


Fig 17. Leyenda: El diagrama trata de reflejar lo siguiente: la frecuencia de resistencia a la isoniazida es superior a la de la rifampicina, y viene determinada, en su mayoría, por mutaciones en el gen *katG*, seguido de mutaciones en el *inhA* (a veces una misma cepa puede presentar mutaciones en ambas dianas). Existen otras dianas minoritarias o no conocidas, relacionadas con la resistencia a la isoniazida. Sin embargo, los casos de resistencia a rifampicina están relacionados casi en su totalidad con mutaciones en una sola diana: el *rpoB*. Además, casi todos los casos resistentes a la rifampicina, lo son también a la isoniazida.

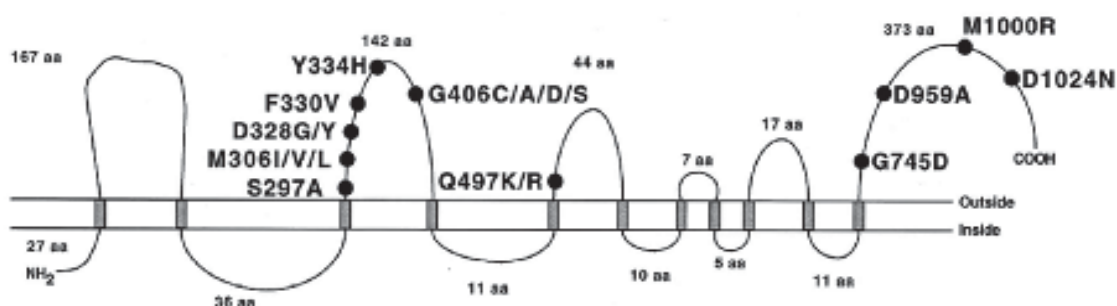
### 9.3. Resistencia al etambutol

La resistencia al etambutol se da con una frecuencia de 1 de cada  $10^5$ - $10^6$  bacilos y está fundamentalmente relacionada con mutaciones en el operón *embCAB*, especialmente en el gen *embB*, las cuales implican una alteración en la diana del E. Entre el 50-70% de las cepas resistentes a E, contienen una mutación en la región determinante de la resistencia a E (ERDR; *ethambutol resistance determining region*) del gen *embB* [121] (Figura 18) y, dentro del gen, el codón 306 es el que reúne la mayor parte (30-68% de las mutaciones en el gen *embB*, afectan a este codón) [122-124]. Experimentos de intercambio alélico han demostrado que mutaciones en este codón conllevan una pérdida de sensibilidad al E y, además, se

ha especulado con una relación entre mutaciones en el codón 306 del gen *embB* y la multirresistencia [125],[126].

Sin embargo, recientemente se ha descrito la presencia de mutaciones en este gen, en cepas sensibles en algunas regiones geográficas [127-130]. Estos estudios han puesto un poco en cuestión el papel de este codón en la resistencia fenotípica al E, si bien es cierto que muchos de los resultados que desligan estas mutaciones de la resistencia fenotípica pueden ser debidos a los problemas metodológicos que presentan las pruebas de sensibilidad *in vitro* para el etambutol [131]. Paralelamente, se han descrito mutaciones en otros codones del gen *embB*, relacionadas también con alteración de la sensibilidad al E, como las de los codones 328, 378, 406 y 497 (frecuencia variable en función del área geográfica) [128-133]. De hecho, existen ya experimentos de mutagénesis que muestran el papel de las mutaciones en los codones 406 y 497 en la pérdida de sensibilidad al E [134].

**Figura 18.** Esquema de la región determinante de la resistencia a etambutol (ERDR) (tomado de Ramaswamy *et al*, 2000) [132].



#### 9.4. Resistencia a la pirazinamida

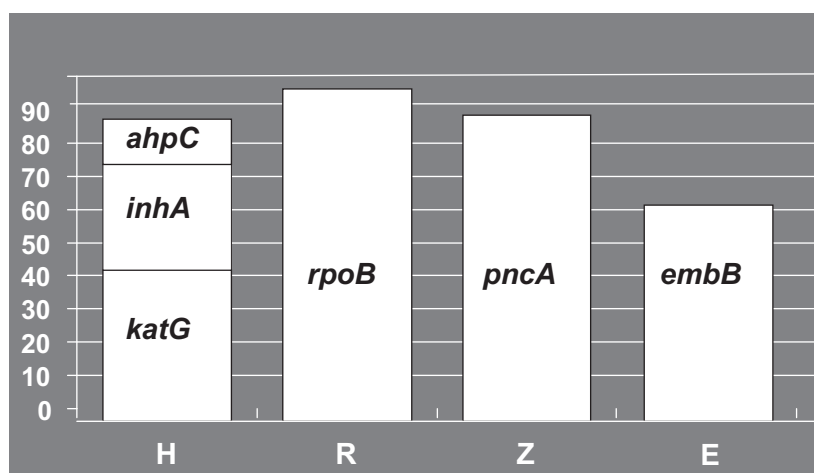
Al igual que ocurre con la isoniazida, el principal mecanismo de resistencia a la pirazinamida, tiene que ver con la reducción de la actividad de la enzima que convierte el pro-fármaco a su forma activa (la PZasa). La pérdida de esta función viene determinada por mutaciones causantes de cambios aminoacídicos en la región estructural del gen *pncA*, o en la región promotora [135].

Dentro de *M. tuberculosis* complex, es destacable el caso especial de la especie *M. bovis*, que es intrínsecamente resistente a la Z, debido a una mutación en el codón 57 del gen *pncA* (H57D). El gen *pncA* no es un gen esencial [136], con lo cual las

mutaciones en cualquier región del gen son muy frecuentes (en 1 de cada  $10^2$ - $10^4$  bacilos), bien toleradas y no suponen un problema para la supervivencia de la cepa tuberculosa. Pero este hecho conlleva una gran dificultad en la caracterización de la resistencia a la Z, ya que no existe una región dentro del gen *pncA* donde se concentre la mayor parte de las mutaciones relacionadas con la resistencia (*hot-spots*), sino que las posiciones susceptibles de mutaciones se extienden a lo largo de todo el gen. Este hecho dificulta el diagnóstico molecular de la resistencia basado en la detección de mutaciones genéticas.

Se han hallado cepas de *M. tuberculosis* complex resistentes a Z que no poseen mutaciones en el gen *pncA*, lo que hace pensar que existen otros mecanismos de resistencia y otras dianas, aún desconocidas, que posiblemente tengan una función reguladora sobre *pncA* [137],[138].

**Figura 19.** Resumen de las dianas más importantes relacionadas con la resistencia a los antituberculosos del Grupo 1 y su porcentaje de mutaciones en cepas resistentes.



### 9.5. Resistencia a los inyectables (Grupo 2)

La aparición de resistencia a la estreptomina es un fenómeno frecuente (en 1 de cada  $10^5$ - $10^6$  bacilos) que ocurrió rápidamente debido al uso de este fármaco inicialmente en monoterapia de la tuberculosis. La resistencia está relacionada con mutaciones en dos dianas: el gen *rpsL* (codifica la proteína ribosomal S12) y el gen *rrs* (16S ARNr). El primero está asociado a altos niveles de resistencia y el segundo a niveles intermedios-bajos. Los codones más importantes que concentran la mayoría de las mutaciones del gen *rpsL* son el codón 43 y el 88, mientras que en

el gen *rrs* las mutaciones se hallan principalmente en la región 530 (nucleótidos 513 y 516, principalmente) y la región 912 [91],[139].

Se estima que, globalmente, la mitad de cepas resistentes a la S muestran mutaciones en alguna de estas dianas; sin embargo, el porcentaje de resistencias explicadas por mutaciones en estos genes es muy variable en función de la región geográfica [140]. Así, se han descrito altos porcentajes de mutaciones en *rpsL* y *rrs* en Japón, China y Latvia, frecuencias intermedias en EEUU y algunas regiones de Europa, y muy bajas en la India. Además, existen cepas con bajos niveles de resistencia fenotípica que no poseen mutación alguna en estos dos genes, lo que hace postular el papel de otras dianas alternativas, como el gen *gidB* (que codifica una metiltransferasa específica para el 16S ARNr) [141] o incluso bombas de expulsión [142].

Los otros tres antituberculosos inyectables más importantes, kanamicina, amikacina y capreomicina, presentan reacciones cruzadas de resistencia, en especial entre Am y Km o entre Km y Cm (aunque no entre Am y Cm) [143],[144]. La diana más estudiada relacionada con la resistencia a estos fármacos de segunda línea es la región 1400 del gen *rrs*. Mutaciones en la posición nucleotídica 1401 (A→G) confiere altos niveles de resistencia a la Km y Am, así como alteraciones en la posición 1402 (C→T) estarían más relacionadas con altos niveles de resistencia a la Cm, y la mutación 1484 (G→T) determinaría altos niveles de resistencia a los tres fármacos inyectables [145],[146].

Existen otras dianas secundarias como el gen *tlyA*, que codifica una metiltransferasa específica para la metilación de la ribosa en el ARNr, y cuyas mutaciones estarían relacionadas con la resistencia a la Cm [147]. Sin embargo, estudios recientes han mostrado la ausencia de mutaciones en este gen, en cepas resistentes a Cm [145].

Por último, se han descrito también mutaciones en la región promotora del gen *eis* (codifica una aminoglicosil transferasa), que determinarían bajos niveles de resistencia a la Km. En estudios recientes, se demostró que el 80% de cepas con niveles de resistencia intermedios a la Km presentaban sustituciones en esta región [148].

### 9.6. Resistencia a las fluoroquinolonas (Grupo 3)

A mediados de los 90, se demostró que la resistencia a las fluoroquinolonas, presente con una frecuencia de 1 de cada  $10^5$ - $10^6$  bacilos, estaba relacionado con mutaciones en la denominada QRDR (*quinolone resistance determining region*) de *gyrA* y *gyrB*, implicados en la síntesis de la girasa bacteriana [149]. Aunque se han hallado algunas excepciones, se asume que la resistencia entre las diferentes fluoroquinolonas es cruzada. Un metanálisis reciente acerca de las mutaciones más frecuentes halladas en estos dos genes en cepas resistentes a las fluoroquinolonas, determinó que tan sólo el 3% de las cepas presentaban mutaciones en la región QRDR del gen *gyrB*, mientras que en la del *gyrA* la frecuencia era del 54%, por lo que se considera que este último es el más importante. Dentro del gen *gyrA*, las sustituciones más habituales son A90V y D94G [150]. Existen también algunos polimorfismos evolutivos, como el del codón 95, que no se relacionan con la resistencia fenotípica a las fluoroquinolonas [151]. Por otro lado, existe un porcentaje de cepas resistentes a las fluoroquinolonas que no presentan ninguna mutación en la región QRDR de *gyrA* ni *gyrB*, con lo que se especula con otras nuevas dianas y mecanismos (como bombas de expulsión) que tendrían un cierto papel en la resistencia a estos fármacos [152],[153].

**Tabla 3.** Resumen de los porcentajes de resistencia a los principales antituberculosos de primera y segunda línea y las dianas genéticas implicadas (datos de porcentajes de resistencia tomados del informe de la OMS, 2010) [107].

Fármaco	% Resistencias		Gen diana	% mutaciones
	Nuevos	Tratados		
Isoniazida (H)	10,3	27,7	<i>katG</i>	42-58%
			<i>inhA</i>	15-43%
			<i>ahpC</i>	ND
			<i>KasA</i>	ND
Rifampicina (R)	3,7	17,5	<i>rpoB</i>	96-98%
Etambutol (E)	2,5	10,3	<i>embB</i>	50-70%
Pirazinamida (Z)	ND	ND	<i>pncA</i>	70-80%
Estreptomina (S)	10,9	20,1	<i>rpsL</i>	30-60%
			<i>rrs 530, 912</i>	8-21%
			<i>gidB</i>	ND
Amikacina (Ak)	ND	ND	<i>rrs 1401 / rrs1484</i>	70-80% / ND
Kanamicina (Km)			<i>rrs 1401 / rrs1484 / eis</i>	56 %/ ND / 22%
Capreomicina (Cm)			<i>rrs 1402 / tlyA / rrs 1484</i>	ND/ 1-3% / ND
Fluoroquinolonas (FQ)	ND	ND	<i>gyrA</i>	55-80%
			<i>gyrB</i>	3-5%

Tab. 3. Leyenda: ND, No Disponible. Nuevos: casos de tuberculosis resistentes que no habían sido tratados previamente. Tratados: casos de tuberculosis resistentes que había recibido tratamiento previamente.

## 10. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Debido a la aparición de cepas resistentes de *M. tuberculosis* complex a los antimicrobianos, es aconsejable realizar una prueba de sensibilidad a los principales antituberculosos (al menos a los del Grupo 1), en especial en dos situaciones: a) al primer aislamiento de *M. tuberculosis* complex de los pacientes nuevos (episodio nuevo de tuberculosis), y b) aislamientos recientes de pacientes ya diagnosticados pero que no están presentando una buena evolución clínica (no hay una respuesta satisfactoria al tratamiento).

Hay diferentes metodologías para conocer el patrón de sensibilidad de los aislamientos clínicos: a) las basadas en el patrón fenotípico (*gold standard* o método de referencia) que son más económicas pero más lentas, y b) las técnicas moleculares que detectan mutaciones cromosómicas relacionadas con la resistencia fenotípica. Éstas son más costosas pero en contrapartida ofrecen una mayor rapidez de resultado que, como ya hemos comentado anteriormente, es un factor crítico para poder establecer lo más pronto posible una pauta farmacológica adecuada.

### 10.1. Métodos fenotípicos convencionales

Los primeros métodos fenotípicos de sensibilidad para *M. tuberculosis* complex, desarrollados en los años 60, se basaban en el crecimiento/inhibición de la cepa en medios de cultivo sólido (primero se empezó utilizando Löwenstein-Jensen y más tarde 7H10 o 7H11) con una concentración fija de antibiótico. Existen diversas variantes: el método de la **ratio resistencia**, donde se compara la CIM del aislamiento clínico frente al antibiótico con una cepa de referencia; el de las **concentraciones absolutas**, que compara el número de colonias en el medio, con y sin fármaco; y el de las **proporciones críticas** [154], similar al anterior pero estableciendo un gradiente de diluciones de antibiótico y observando el crecimiento proporcional entre ellas (comparado al medio sin antibiótico) [155]. Sin embargo, estas técnicas han sido bastante relegadas de los laboratorios, por su alta laboriosidad, coste económico y peligro de bioseguridad. Los medios de cultivo sólido se sustituyeron por líquidos, más rápidos, sencillos y automatizables. En

medio sólido existe también la prueba del **E-Test**, que consiste en una tira donde se aplica un gradiente de antibiótico haciendo posible determinar, en una sola placa, la CIM de la cepa. Es necesario, sin embargo, una cierta experiencia para la lectura y la interpretación viene dificultada por el crecimiento errático y poco homogéneo del bacilo tuberculoso en la placa de agar. Por estas razones, no está recomendado su uso para el antibiograma de *M. tuberculosis* complex.

Más tarde, a comienzos de la década de los 80, se implantó la técnica que ha sido la de referencia durante casi 30 años: el **BacTec 460TB** radiométrico (Becton Dickinson) [156],[157]. El medio era 7H9 modificado (el ácido palmítico contenía carbono radiactivo; C-14) donde se añadía antibiótico a una cierta concentración; el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado por el metabolismo bacteriano es medido por el sistema (valor numérico) permitiendo establecer una curva de crecimiento, o inhibición progresiva, del microorganismo. Sin embargo, este sistema aunque muy preciso y bastante rápido (5-7 días), ha sido retirado recientemente debido a su peligrosidad por la manipulación de sustancias radioactivas. Así, en los últimos años, el método de sensibilidad fenotípico más utilizado es el sistema de cultivo automático **MGIT 960** (7H9 modificado) que detecta, mediante fluorescencia, el consumo de  $\text{O}_2$  derivado del crecimiento o inhibición del microorganismo en presencia del antibiótico. Es menos peligroso y con una sensibilidad y rapidez bastante cercanas al sistema radiométrico. Sin embargo, la interpretación del resultado es algo más cerrada [158]. Otro método bastante empleado es el VersaTrek (TREK Diagnostics) que detecta el consumo de oxígeno mediante sensores de presión, derivado del crecimiento o inhibición del microorganismo en presencia del antibiótico [159].

Estos métodos son válidos para determinar la sensibilidad de los antituberculosos del Grupo 1 y a los tradicionalmente denominados de segunda línea. Sin embargo, la experiencia en este último grupo es limitada (debido a su uso más infrecuente). En cuanto a los puntos de corte (concentraciones críticas de antibiótico utilizadas) dependen del método a elegir. Actualmente, con el MGIT 960, las concentraciones de los principales antituberculosos que recomienda la OMS son las siguientes (fármacos de primera línea y principales de segunda línea): 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de H, 1  $\mu\text{g/ml}$  de R, 5  $\mu\text{g/ml}$  de E, 1  $\mu\text{g/ml}$  de S, 100  $\mu\text{g/ml}$  de Z, 1  $\mu\text{g/ml}$  de Am, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de Cm, 2  $\mu\text{g/ml}$  de Ofx, 2  $\mu\text{g/ml}$  de Lfx, 0,25  $\mu\text{g/ml}$  de Mfx, 1  $\mu\text{g/ml}$  de Lzd, 5  $\mu\text{g/ml}$  de Eto y 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de Pto [160].

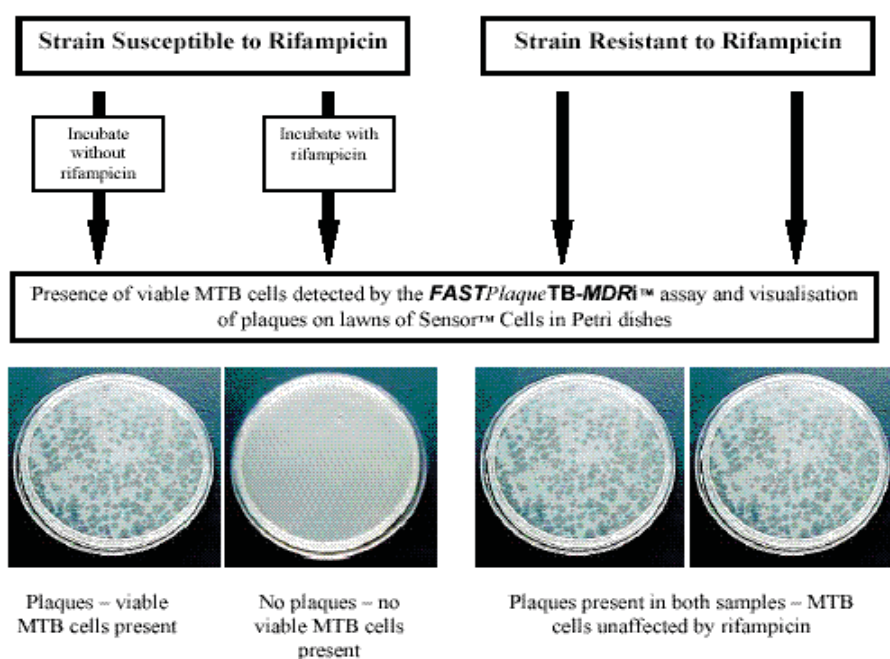
## 10.2. Métodos de detección rápida de la resistencia antibiótica

Debido a la lentitud de los métodos convencionales de sensibilidad antibiótica (que requieren esperar hasta el crecimiento de la cepa), ha sido necesario desarrollar otros métodos, que permitan predecir el fenotipo de resistencia en un menor tiempo. Asimismo, cada vez más los esfuerzos se centran en el diseño de sistemas para la detección molecular de la resistencia directamente en muestra clínica, lo que conlleva el diagnóstico de la resistencia tras unas pocas horas desde la recepción de la muestra.

### 10.2.1. Micobacteriófagos

La técnica con micobacteriófagos (apartado 7.5.1) se puede emplear también para la detección rápida de la resistencia, con la variante que el medio de cultivo incluye antibiótico, con lo que el fago sólo podrá infectar las micobacterias viables (resistentes al fármaco), detectándose por emisión de luz [161] o recuento de calvas en un crecimiento confluyente (“césped”) de micobacteria de crecimiento rápido (Figura 20) [161-164], dependiendo del fago utilizado. Aunque el método muestra una sensibilidad y especificidad aceptable, su uso no está muy extendido ya que se considera demasiado indirecto y la técnica es difícilmente estandarizable entre otras limitaciones.

**Figura 20.** Método FAST-PlaqueTB-MDRi (detección calvas) para la detección de resistencia a la rifampicina (tomado de Cosmos Biomedical, Reino Unido).





### 10.2.2. Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular (basadas en el genotipo bacteriano) constituyen, desde hace un par de décadas, el gran avance de la detección rápida de la resistencia bacteriana, ya que permite predecir el fenotipo de sensibilidad con días de antelación. Su utilidad es innegable, sin embargo, es importante mencionar que en ningún caso han de sustituir las pruebas de sensibilidad fenotípicas convencionales, ya que una mutación genética no implica en el 100% de los casos una resistencia fenotípica. Existen cambios nucleotídicos que no suponen cambios aminoacídicos, o cambios aminoacídicos que no implican cambio proteico y por tanto no se traducen en resistencia. Por otro lado, pueden existir mutaciones en otras dianas desconocidas o infrecuentes (no incluidas en el sistema en cuestión), de manera que la cepa podría ser resistente a pesar de presentar un genotipo *wild-type* en las dianas incluidas en la técnica molecular utilizada.

#### 10.2.2.1. *PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP)*

A principios de los 90 se diseñó una técnica basada en la detección de los cambios conformacionales de las cadenas simples de ADN, al contener mutaciones puntuales: *single-strand conformation polymorphism (SSCP)* [165]. Tras la amplificación del gen diana y desnaturalización de la doble cadena, la visualización de la conformación de la cadena de ADN generada puede realizarse por electroforesis en un gel de agarosa (utilizando deoxinucleótidos radiactivos), o bien con los picos de fluorescencia emitidos (si se utilizan cebadores marcados con fluoresceína). Aunque existen estudios que muestran una buena sensibilidad y especificidad, alrededor de un 80% y 95% respectivamente, para la detección de resistencia a la rifampicina [166], esta técnica suele utilizarse más bien en estudios de cribado generales. Además, son necesarios estudios de coste-efectividad para ver su utilidad real en la rutina diagnóstica.

#### 10.2.2.2. Hibridación en fase sólida (tiras celulosa)

En esta metodología se basan la mayoría de las técnicas de detección molecular de resistencia en *M. tuberculosis complex* disponibles comercialmente. Consiste en una PCR convencional donde se amplifica uno o varias dianas genéticas, y una posterior hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa donde se obtiene un resultado colorimétrico. Los dos kits comerciales aprobados por la OMS son el **INNO-LiPA Rif.TB** (Innogenetics, Bélgica) y el **GenoType MTBDR, MTBDRplus y GenoType MTBDRs/** (Hain Lifescience). El INNO-LiPA Rif.TB (Figura 21) amplifica tan sólo la región core del gen *rpoB* (resistencia a la rifampicina y consecuente inferencia de la

multirresistencia); incluye 5 sondas con genotipo “salvaje” y 4 con las mutaciones más importantes relacionadas con la resistencia a la rifampicina (S531L, D516V, H526D y H526Y). Está validado para su aplicación en rutina sólo en aislamientos clínicos, con sensibilidad y especificidad global del 95-100%, aunque algunos estudios muestran una buena sensibilidad también en muestra directa, con baciloscopia positiva [167-169].

**Figura 21.** Esquema de las mutaciones incluidas en el kit INNO-LiPA Rif.TB (tomado de Innogenetics, Bélgica).

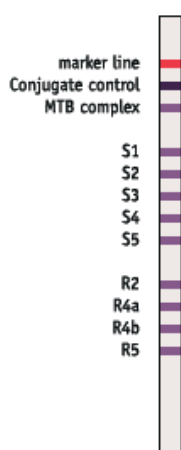


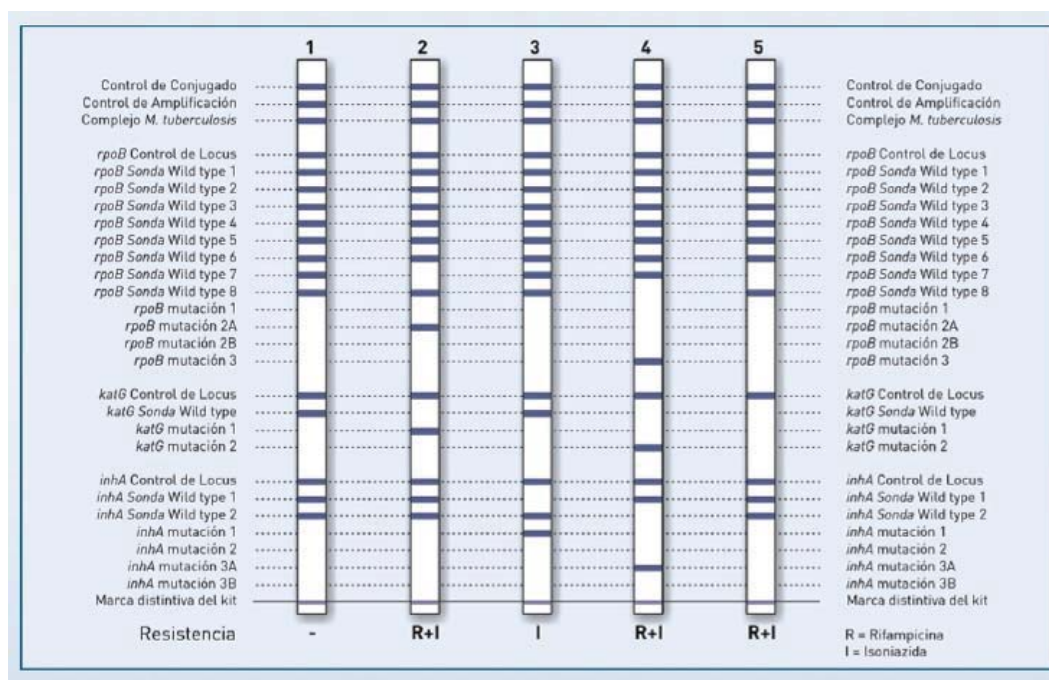
Fig 21. Leyenda: S1-S5: sondas con la secuencia *wild-type* del gen *rpoB*. R2, R4a, R4b, R5: mutaciones más importantes del gen *rpoB*: S531L, D516V, H526D y H526Y.

El GenoType MTBDR, además de las mismas dianas que el INNO-LiPA Rif.TB para el *rpoB*, incluye también las dianas de resistencia de alto nivel a la isoniazida: *katG* (S315T1-ACC y S315T2-ACA). Más recientemente, una nueva versión del kit, el MTBDR*plus*, incluye además la región promotora de *inhA* (-8T→C, -8T→A, -15C→CT, -16A→G) y permite su aplicación también en muestra directa con baciloscopia positiva. Numerosos estudios muestran su buena sensibilidad en cepa obtenida en cultivo, en concreto del 99% para la rifampicina y del 85% para la isoniazida [170-172].

Los resultados del GenoType MTBDR en muestra clínica directa para la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a rifampicina sigue siendo alta (92%) y en la isoniazida desciende al 70%, aunque en la versión MTBDR*plus* (Figura 22) se consigue una mayor sensibilidad [173],[174]. Hay que tener en cuenta que la menor sensibilidad de detección de resistencia en la isoniazida se debe en parte a la variedad de dianas genéticas, no todas conocidas, implicadas en la resistencia. En estos ensayos sólo se cubre la mutación en *katG* y región promotora de *inhA*

que, tal como se detalló en el apartado 9.1, no explican la totalidad de las resistencias a este fármaco.

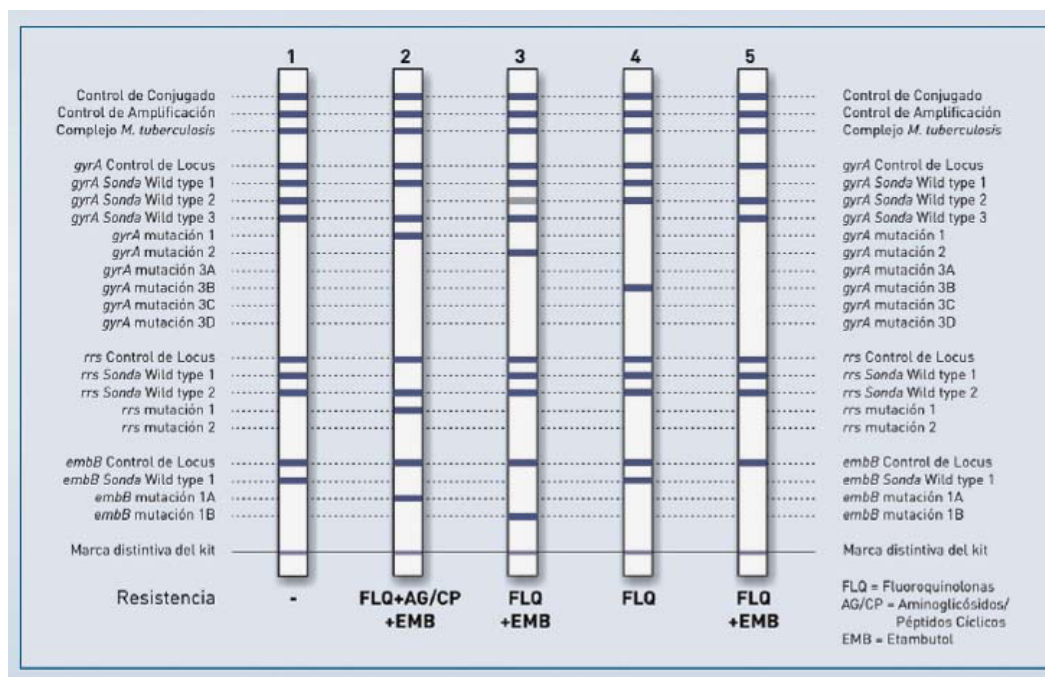
**Figura 22.** Esquema de las mutaciones incluidas en el kit GenoType MTBDR<sub>plus</sub> (tomado de Hain Lifescience, Alemania).



El sistema GenoType posee también un kit (GenoType MTBDR<sub>s</sub>); Figura 23) para la detección de mutaciones relacionadas con resistencia a los fármacos más comúnmente utilizados en los casos de tuberculosis resistente y MDR: etambutol, inyectables de segunda línea y fluoroquinolonas (estos dos últimos definitorios de tuberculosis XDR). Así, incluye el codón 306 del gen *embB* (*emb* M306I y *emb* M306V) para el etambutol, región 1400 del gen *rrs* (*rrs* 1401A→G y *rrs* 1484G→T) para los inyectables, y el gen *gyrA* (*gyrA* A90V, *gyrA* S91P, *gyrA* D94A, *gyrA* D94N/Y, *gyrA* D94G y *gyrA* D94H) para las fluoroquinolonas.

Un metanálisis reciente muestra que esta técnica es sensible y específica en cepas clínicas en la detección de resistencia a las fluoroquinolonas, la amikacina y capreomicina (sensibilidad entre el 82 y el 87%) [175], pero no es tan sensible en la detección de resistencia al etambutol y la kanamicina (68% y 44%, respectivamente). En cuanto a la aplicación de la técnica directamente en muestras clínicas, los resultados son similares, aunque resaltando una correlación entre la detección de mutaciones en el codón 306 del *embB* y el fenotipo resistente aún más baja (56%) [176].

**Figura 23.** Esquema de las mutaciones incluidas en el kit GenoType MTBDRs/ (tomado de Hain Lifescience, Alemania).



### 10.2.2.3. Técnicas de PCR a tiempo real

Desde hace años, existen numerosos métodos de PCR a tiempo real para la detección de mutaciones en los genes diana relacionados con resistencia a los fármacos antituberculosos. Entre los múltiples sistemas caseros (*in-house*), en nuestro medio se han desarrollado algunos con resultados muy interesantes [177-181]. Sin embargo, la aparición de nuevos sistemas comerciales más estandarizados, sencillos y con una reducción del coste, ha hecho que su uso se haya generalizado.

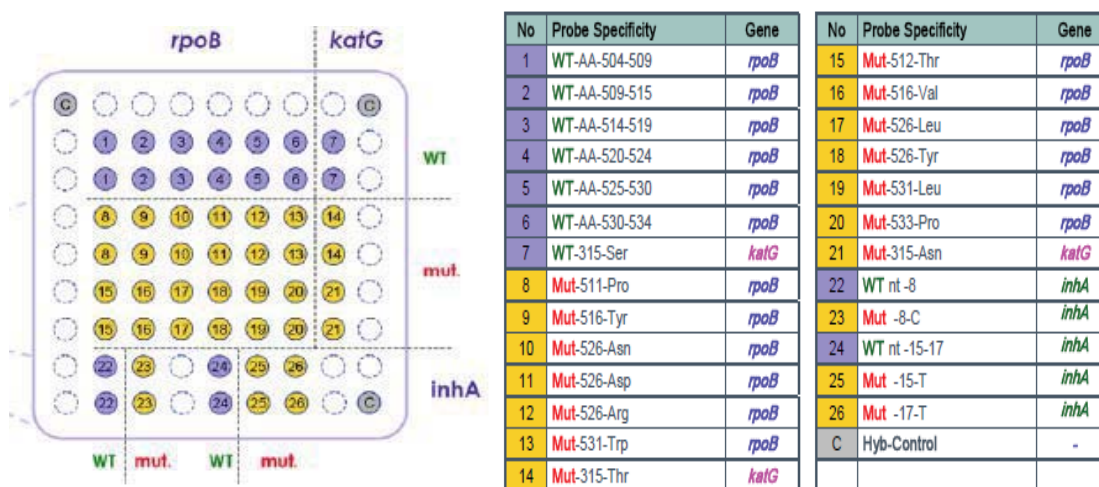
En cuanto a la detección en muestra directa, existe una técnica comercial con estas características, aprobada por la OMS y la FDA: el ensayo Xpert MTB/RIF, que detecta mutaciones relacionadas con la resistencia a la rifampicina, el cual es un indicador de multirresistencia (apartado 7.5.2.2). Se ha comprobado que esta técnica tiene una buena sensibilidad y especificidad en la detección de la resistencia fenotípica a la rifampicina superiores al 94% y 98%, respectivamente [182]. Esta eficacia es similar a la que ofrece el sistema GenoType MTBDR*plus* [183]. Una de las desventajas de este sistema de PCR a tiempo real, es que la determinación de resistencia se basa en la ausencia de hibridación de las sondas con la secuencia salvaje. Tal como se ha comentado anteriormente, esta relación

no se confirma en el 100% de los casos, como han demostrado varios estudios [184],[185].

#### 10.2.2.4. *Microarrays*

Son sistemas miniaturizados de hibridación en fase sólida. En ellos se fija una serie de oligonucleótidos (sondas) complementarios con fragmentos de genes diana implicados en la resistencia a los fármacos antituberculosos. El tipo de soporte, el número de sondas (de decenas a cientos de *spots*) y el número de muestras posibles para analizar en un solo *microarray*, son múltiples. También es variable el sistema de marcaje para visualizar la hibridación del producto amplificado con la sonda correspondiente en el *microarray*, pero suelen utilizarse marcadores fluorescentes (ej. Cy5) o colorimétricos (ej. biotina) que van incorporados en los *primers*, o en las sondas fijadas en el *array*. Hasta el momento, no existen demasiados sistemas comerciales disponibles y su uso en rutina aún no es habitual. Sin embargo, la posibilidad de incluir un gran número de dianas y sondas para cada una de ellas, su poca complejidad metodológica, su rapidez, y los buenos resultados obtenidos por varios grupos de investigación con sistemas de *microarrays* diseñados *in-house* [186-189] (Figura 24) los hacen una herramienta muy prometedora en la detección de la resistencia antibiótica en *M. tuberculosis* complex.

**Figura 24.** Ejemplo de *microarray* para la detección de resistencia a la isoniazida y rifampicina (MYCO-Resist 3.5; tomado de Chipron GmbH, Alemania).

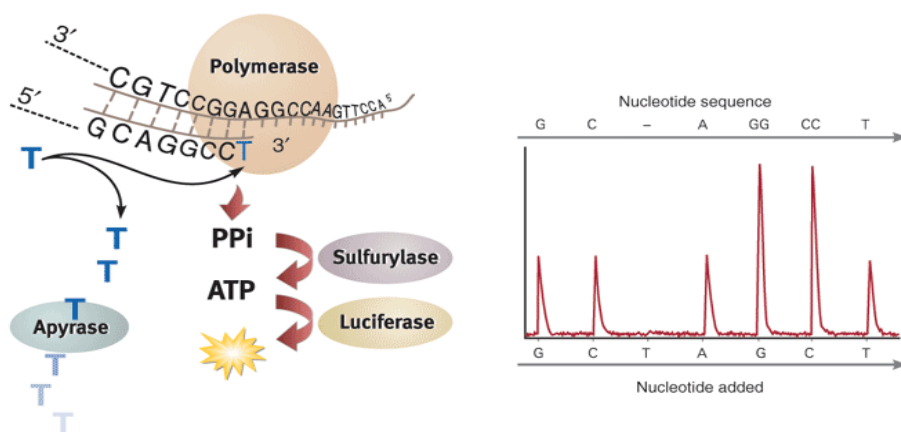


### 10.2.2.5. Secuenciación

Además de ser útil a nivel de identificación de especie (apartado 7.4.4.2.2), la técnica de secuenciación también sirve para detectar la resistencia farmacológica, ya que permite observar la presencia de mutaciones en el fragmento amplificado directamente a través de su secuencia nucleotídica. Por problemas de sensibilidad hasta el momento, sólo es posible aplicarla sobre aislamientos clínicos. Su uso en rutina, sin embargo, no está extendido, debido a la gran complejidad metodológica y su alto coste económico. En este sentido, se está trabajando para desarrollar metodologías de secuenciación más simples y económicas, con lo que se perfila como una alternativa real en el diagnóstico molecular de rutina.

La pirosecuenciación (apartado 7.4.4.2.2) (Figura 25) sería una de estas metodologías. Esta técnica ha sido evaluada para la detección de los dos fármacos que definen la multirresistencia, tanto en cepa como en muestra directa [190]. También se ha evaluado para la detección de resistencia a fármacos de segunda línea en aislamientos clínicos [191] con sensibilidades que rondan el 85% comparado con la sensibilidad fenotípica (Bactec 460TB).

**Figura 25.** Representación de la reacción de pirosecuenciación (tomado de Biotage, Suecia).



## 11. VACUNAS

### 11.1. Vacuna actual

A principios del siglo XX, Calmette y Guérin desarrollaron una vacuna contra la tuberculosis, consistente en una cepa de *M. bovis*, aislada de una vaca infectada por el bacilo tuberculoso. Tras más de 200 pases del cultivo, consiguieron atenuar esta cepa que fue utilizada como vacuna en un niño por primera vez en 1921, por vía oral. Más adelante, se comenzó a administrar de forma intradérmica, y es la

vacuna que se administra aún hoy día (bacilo de Calmette-Guérin; BCG), especialmente en países de alta incidencia de tuberculosis.

Desde 1921, Calmette y Guérin repartieron la primera cepa utilizada como vacuna BCG entre varios microbiólogos de todo el mundo, lo que explica la variedad de cepas vacunales que existen en la actualidad. Por ejemplo, la variedad *BCG Tokyo* y la *BCG Pasteur*, se consideran más inmunogénicas que la *BCG Glaxo* o *BCG Danish*. Sin embargo, estudios genéticos recientes muestran que, en general, la cepa de BCG de las formas vacunales actuales ha perdido más de 100 genes respecto al genoma de la cepa original, muchos de ellos relacionados con la virulencia de *M. tuberculosis* complex (por ejemplo el gen RD1 implicado en la secreción de la proteína ESAT-6) [192], de manera que la vacuna actual podría haber perdido su eficacia en gran medida. De hecho, la utilidad de la vacuna BCG se ha constatado en casos de tuberculosis meníngea y diseminada en la población pediátrica, pero su eficacia contra la tuberculosis pulmonar es discutible [193]. Esta es la razón por la que en España se ha eliminado del calendario vacunal y tan sólo se sigue administrando en el País Vasco.

### **11.2. Nuevas vacunas profilácticas**

La ineficacia de la vacuna tradicional BCG especialmente contra la forma pulmonar de la enfermedad y sobre todo en países del sur (debido probablemente a la exposición a otras MNT) [194], ha impulsado durante la última década a varios grupos de investigación hacia el desarrollo de nuevas vacunas, más eficaces que la BCG. Básicamente, existen dos tipos de estrategias, el desarrollo de vacunas basadas en subunidades con características antigénicas del bacilo tuberculoso, y vacunas basadas en bacilos vivos atenuados. Todas las vacunas candidatas han de demostrar primeramente su seguridad y eficacia en modelos animales. A continuación, se inician los ensayos en humanos: en la fase I, se estudia la seguridad y efectos biológicos en un pequeño grupo de unas pocas decenas de personas; la fase II, se centra en evaluar la inmunogenicidad y la efectividad del candidato vacunal en una población mayor que la fase previa (varias centenas de personas); y finalmente en la fase III, se llevan a cabo largos y extensos ensayos clínicos de seguridad y eficacia, comparando el candidato vacunal con individuos no vacunados y vacunados con BCG, incluyendo a varias decenas de miles de personas (normalmente en países de alta incidencia de tuberculosis). Se estima que, para conseguir una vacuna definitiva en 2015, más de 20 candidatos tendrían

que entrar en fase I de los que finalmente sólo 3 o 4 llegarían a la fase III de los ensayos clínicos [195].

### 11.2.1. Vacunas basadas en subunidades antigénicas

Es la opción que se presupone más segura, ya que no implica la inoculación del bacilo vivo, tan sólo antígenos que provocan una respuesta inmunitaria teóricamente del mismo modo que lo haría la bacteria viva.

Sin embargo, hasta la fecha los estudios con este tipo de candidatos vacunales no han mostrado, por sí solos, mejorar la eficacia respecto a la vacuna BCG, y su utilidad sería más bien la de provocar un efecto *booster*, si se añaden a la BCG [196]. Existe alrededor de una docena de candidatos vacunales basados en subunidades antigénicas. Una de ellas, es la que utiliza el epítipo **Mtb72** que, junto con el coadyuvante AS-01B, provoca una buena respuesta inmunitaria, con una alta producción de IFN- $\gamma$  y una alta respuesta CD8(+). Se halla en la Fase I de ensayo clínico.

También se ha conseguido buenos resultados con el antígeno **ESAT-6**, contra el que los linfocitos T reaccionan fuertemente, especialmente en casos de reinfección. Al igual que el candidato vacunal basado en el antígeno Mtb72, el ESAT-6 se halla en la fase I de ensayos clínicos.

Ya en la fase II se halla otro candidato de subunidades, basado en el antígeno **Ag85A**, que se integra en el ADN de un virus no replicativo (virus Ankara). Se ha demostrado que su administración conjunta con la BCG, determina una mayor eficacia inmunitaria que la que tiene la BCG por sí sola.

### 11.2.2. Vacunas basadas en bacilos vivos

Hasta hace poco, el desarrollo de este tipo de vacunas estaba limitado por la falta de conocimiento del genoma del bacilo tuberculoso. El proyecto de secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* complex de los años 90 (apartado 2.2.3), ha permitido comenzar a desarrollar vacunas basadas en bacilos vivos, pero atenuados mediante deleciones en genes de virulencia (recombinantes vivos).

Uno de los bacilos atenuados que se hallan en estudio como candidato vacunal, es el que posee una doble deleción **panC** y **panD** (genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y otras reacciones metabólicas del bacilo). Este mutante posee,



además, una delección de la región de virulencia **RD1**. Se ha comprobado que sus niveles de protección son equivalentes a los de la BCG, en modelo animal.

Otra estrategia de atenuación, se basa en la inactivación del gen **secA**, implicado en el sistema de secreción proteica. Aunque este candidato se halla aún en fase pre-clínica, se ha comprobado que induce a la apoptosis de células infectadas y potencia la respuesta CD8+.

Por otro lado, el laboratorio de Genética de Micobacterias (Universidad de Zaragoza), en colaboración con el Instituto Pasteur, ha desarrollado un candidato vacunal mediante inactivación del gen **phoP**, que regula el 2% de los factores de virulencia de *M. tuberculosis* complex. Aunque su eficacia en la inmunidad aún está en estudio, trabajos preliminares en primates han mostrado buenos resultados [197],[198].

Así pues, se perfilan 3 posibles estrategias vacunales para conseguir la erradicación de la tuberculosis: a) vacuna basada en subunidades, en pacientes ya vacunados con BCG, para aumentar la eficacia inmunológica, b) vacunación con recombinantes vivos, atenuados, que sustituyan la BCG, c) vacunación con recombinantes vivos alternativos a la BCG y, adicionalmente, vacunación con subunidades antigénicas.

### **11.3. Nuevas vacunas terapéuticas**

Idealmente, una vacuna debe prevenir la infección tras la exposición al agente patógeno. Sin embargo, dada la alta prevalencia mundial de infección tuberculosa latente, la opción de la denominada vacuna terapéutica, cuyo objetivo es reducir la carga bacilar después de una infección reciente y minimizar el riesgo de reinfección o reactivación, podría ser de utilidad. Los CDC han recomendado el desarrollo de este tipo de vacuna, para conseguir la erradicación de la tuberculosis [199].

En este sentido, y basándose en la hipótesis dinámica de infección tuberculosa, el equipo del Hospital Germans Trias i Pujol, de Badalona (Barcelona), ha desarrollado una vacuna denominada RUTI, basada en fragmentos celulares de *M. tuberculosis*, biotransformados y liposomados, que generan una respuesta poliantigénica muy importante de tipo Th1/Th2/Th3, demostrada ya en modelos murinos [200]. El objetivo principal de esta vacuna es ampliar el abanico de epítomos reconocibles, con el fin de identificar los macrófagos espumosos que

albergan los bacilos latentes responsables de reinfecciones y reactivaciones. Con esta vacuna terapéutica, que ya ha superado la fase I de ensayos clínicos [201], se estima que el tiempo de quimioprofilaxis para la infección latente quedaría reducido a sólo un mes con isoniazida, añadiendo la vacunación con RUTI inmediatamente después.





## II. JUSTIFICACIÓN



El control de la tuberculosis se basa en dos pilares fundamentales. Por un lado, el diagnóstico precoz de la enfermedad activa, con el fin de tratar a los enfermos e impedir así el progreso de su enfermedad, además de evitar el contagio a otras personas. En segundo lugar, es importante detectar lo antes posible los casos de resistencia farmacológica, para poder asegurar el éxito en el tratamiento y evitar el peligro añadido que supone la transmisión de cepas resistentes en la población.

El diagnóstico de la tuberculosis se basa en gran medida en métodos microbiológicos convencionales: a) un cribado mediante microscopía de bacilos ácido-alcohol resistentes que permite de forma rápida, sencilla y económica una primera orientación hacia el diagnóstico de tuberculosis en caso de que la baciloscopia sea positiva, y b) el cultivo de las muestras clínicas en medios específicos para micobacterias. El cultivo micobacteriano es el método considerado *gold standard* en el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis, y además, permite obtener el aislamiento clínico con el que posteriormente se puede estudiar la sensibilidad a los fármacos antituberculosos o realizar análisis epidemiológicos. Sin embargo, estos métodos fenotípicos convencionales son insuficientes para un control eficaz de la tuberculosis, debido sobre todo a la baja sensibilidad de la microscopía y a la lentitud del cultivo micobacteriano.

Por ello se ha estado trabajando, desde hace más de dos décadas, en el desarrollo de metodologías moleculares, basadas en la detección de genes específicos de *M. tuberculosis* complex. El fin es detectar de forma rápida su presencia y posible resistencia a los fármacos antituberculosos, incluso directamente en muestra clínica (sin necesidad de cultivar), lo que adelantaría el diagnóstico de varias semanas a pocos días e incluso pocas horas.

En este sentido se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación genética por PCR y posterior estudio postamplificación, fundamentalmente mediante hibridación en fase líquida o sólida, con sondas complementarias a los genes de interés. Estas técnicas sirven tanto para la detección del microorganismo como de su resistencia a los fármacos.

En esta tesis se trata de evaluar, en un primer bloque, dos de los sistemas comerciales más recientes para el diagnóstico rápido de la tuberculosis. Uno de ellos es el sistema integrado de PCR a tiempo real, Xpert MTB/RIF. Los primeros estudios, publicados a principios del 2010 y desarrollados a gran escala en países

endémicos, revelan que esta técnica es una herramienta de gran utilidad, debido a su gran sencillez, rapidez y buena sensibilidad y especificidad, tanto en la detección de *M. tuberculosis* complex como de la resistencia a la rifampicina. Así se propuso determinar la eficacia de este sistema, en nuestra área, tanto en términos de sensibilidad-especificidad como de potencial coste-beneficio que supondría su implementación en la práctica diagnóstica diaria. Para ello, se llevaron a cabo dos estudios centrados sólo en muestras clínicas con baciloscopia negativa, tanto pulmonares como extrapulmonares, en el contexto de una zona geográfica de baja-media incidencia de tuberculosis y baja resistencia farmacológica. Además, en un tercer trabajo, se analizó la rentabilidad del sistema llevando a cabo un estudio retrospectivo donde se analizaron las ventajas de la realización de la prueba en la rutina asistencial, calculando el tiempo de adelanto en el inicio del tratamiento y el ahorro que supondría la reducción de pruebas diagnósticas. Por otro lado, el novedoso sistema GenoQuick MTB, de PCR convencional y posterior hibridación rápida en fase sólida, se planteó como una técnica alternativa a la previamente descrita, con una discreta mayor complejidad técnica pero también con un menor coste económico. En esta tesis se describen los resultados de la primera evaluación a nivel mundial de esta metodología, que podría ser de gran utilidad en laboratorios con un buen personal formado en biología molecular pero con menores recursos económicos.

Otro aspecto muy relevante, sobre el que también se ha investigado en los últimos años, es el de la detección de mutaciones genéticas implicadas en la resistencia a los principales fármacos antituberculosos. Existen ya algunos métodos disponibles comercialmente pero, como es bien sabido, muchos de ellos no abarcan suficientes dianas relacionadas con la resistencia o bien no contemplan la variabilidad existente en cuanto a los tipos de mutaciones prevalentes de cada área geográfica. Otro inconveniente de los métodos comerciales es su rigidez, ya que son sistemas cerrados que no permiten modificaciones que puedan adaptarse a las necesidades concretas de los usuarios. De esta forma se planteó, en un segundo bloque de la tesis, el diseño y desarrollo de un sistema propio de *microarrays* (sistemas miniaturizados de amplificación e hibridación con oligonucleótidos fijados en una matriz orgánica) para la detección rápida de la resistencia a algunos de los fármacos antituberculosos más importantes. Para ello, se utilizó el conocimiento adquirido en una plataforma desarrollada por nuestro grupo en el año 2006 para la detección rápida de la multirresistencia. Tras caracterizar las mutaciones presentes en los aislamientos resistentes de nuestra área y basándose también en las



mutaciones más frecuentemente descritas en la literatura, se diseñaron dos *microarrays* de baja densidad y bajo coste para la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia al etambutol, los antituberculosos inyectables y las fluoroquinolonas. Este sistema de *microarrays* se plantea como una buena alternativa a los sistemas comercialmente disponibles, al tener un coste económico menor y ofrecer la flexibilidad de añadir más o diferentes dianas de resistencia, en función del perfil de mutaciones de cada área geográfica.







### III. OBJETIVOS



**Bloque 1.**

1. Estudio de un nuevo sistema integrado de amplificación de ácidos nucleicos e hibridación simultánea (PCR a tiempo real) para la detección de *M. tuberculosis* complex y su resistencia a la rifampicina, directa de muestra clínica (Xpert MTB/RIF).

1.1. Evaluar la efectividad de la técnica Xpert MTB/RIF para la detección directa de *M. tuberculosis* complex y su resistencia a la rifampicina, en muestras pulmonares con baciloscopia negativa (Artículo 1).

1.2. Evaluar la efectividad de la técnica Xpert MTB/RIF para la detección directa de *M. tuberculosis* complex, en muestras extrapulmonares con baciloscopia negativa (Artículo 2).

1.3. Estudio de la rentabilidad potencial del uso en rutina de la técnica Xpert MTB/RIF para la detección directa de *M. tuberculosis* complex y su resistencia a la rifampicina, en casos con baciloscopia negativa y sospecha media o elevada de tuberculosis, en un área geográfica con una incidencia media-baja de tuberculosis (Artículo 3).

2. Estudio de un nuevo sistema basado en la amplificación de ácidos nucleicos e hibridación por flujo lateral en tiras de nitrocelulosa (*lateral-flow dipstick*) para la detección de *M. tuberculosis* complex, en muestras mayoritariamente pulmonares (GenoQuick MTB) (Artículo 4).

**Bloque 2.**

3. Diseño, desarrollo y evaluación de un sistema de *microarrays* de baja densidad para la detección rápida de las mutaciones más comúnmente relacionadas con la resistencia a la estreptomina y las fluoroquinolonas, en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* complex (Artículo 5).

4. Caracterización fenotípica de la resistencia al etambutol: determinación de las mutaciones en el gen *embB* más frecuentes en nuestro medio y su relación con los niveles de resistencia fenotípica y factores epidemiológicos. Diseño, desarrollo y evaluación de un sistema de *microarrays* de baja densidad para la detección rápida de las mutaciones relacionadas con la resistencia al etambutol en nuestra área, en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* complex (Artículo 6).









## IV. PUBLICACIONES



**Bloque 1**

**Detección directa en muestra clínica de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante métodos moleculares de amplificación genética e hibridación**



## **Artículo 1**

### **Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method**

Raquel Moure<sup>1</sup>, Laura Muñoz<sup>2</sup>, Miriam Torres<sup>1</sup>, Miguel Santin<sup>2,4</sup>, Rogelio Martín<sup>1,3</sup>,  
Fernando Alcaide<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, IDIBELL-Bellvitge Hospital, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Infectious Diseases, IDIBELL-Bellvitge Hospital, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; and <sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Journal of Clinical Microbiology, 2011 Mar; 49(3):1137-1139

Las técnicas moleculares son la mejor opción para el diagnóstico rápido de la tuberculosis y la resistencia farmacológica. El sistema GeneXpert (técnica Xpert MTB/RIF) es un método molecular automático e integrado (extracción de ADN y PCR en el mismo cartucho) basado en una PCR a tiempo real que ofrece, en apenas 2 horas, un resultado simultáneo de detección de *M. tuberculosis* complex y resistencia a la rifampicina.

En este estudio, centrado en muestras exclusivamente con baciloscopia negativa, se propuso evaluar la eficacia del Xpert MTB/RIF en la detección rápida de *M. tuberculosis* complex y resistencia a la rifampicina, en una colección de 85 muestras con cultivo positivo de *M. tuberculosis* complex (78 respiratorias y, de ellas, 7 con resistencia fenotípica a la rifampicina), 20 muestras con cultivo de micobacterias no tuberculosas y 20 con cultivo negativo de micobacterias. El sistema Xpert MTB/RIF fue capaz de detectar la presencia de *M. tuberculosis* complex en el 78,2% de las muestras respiratorias con baciloscopia negativa, y el 100% de las mutaciones relacionadas con resistencia a la rifampicina. Además, la especificidad fue del 100% (resultado negativo en las 40 muestras con cultivo negativo de *M. tuberculosis* complex). Por otro lado, la técnica mostró una buena robustez, al determinarse que el almacenamiento a -80°C de las muestras no influía en la sensibilidad de detección de *M. tuberculosis* complex. Aunque la inóculo-dependencia del ensayo quedó demostrada (las muestras con un resultado positivo del Xpert MTB/RIF mostraban crecimiento en cultivo líquido en menos días, frente a las que tuvieron un resultado negativo;  $P=0,003$ ), se concluyó que, debido a los buenos resultados de sensibilidad y especificidad, así como su simplicidad técnica, el Xpert MTB/RIF es un sistema idóneo en el diagnóstico rápido de la tuberculosis pulmonar y su resistencia a la rifampicina (indicador de multirresistencia), en casos de alta sospecha clínica y resultado negativo de la baciloscopia.





## Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Rifampin Resistance in Smear-Negative Clinical Samples by Use of an Integrated Real-Time PCR Method<sup>∇</sup>

Raquel Moure,<sup>1</sup> Laura Muñoz,<sup>2</sup> Miriam Torres,<sup>1</sup> Miguel Santin,<sup>2,4</sup>  
Rogelio Martín,<sup>1,3</sup> and Fernando Alcaide<sup>1,3\*</sup>

Department of Microbiology, IDIBELL-Bellvitge Hospital, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain<sup>1</sup>;  
Department of Infectious Diseases, IDIBELL-Bellvitge Hospital, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona,  
Spain<sup>2</sup>; Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de  
Llobregat, Barcelona, Spain<sup>3</sup>; and Department of Clinical Sciences, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n,  
08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain<sup>4</sup>

Received 9 September 2010/Returned for modification 18 October 2010/Accepted 20 December 2010

**Sixty-four of 85 (75.3%) smear-negative respiratory ( $n = 78$ ) and nonrespiratory ( $n = 7$ ) samples with positive cultures of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) were detected by the GeneXpert system using the Xpert MTB/RIF assay (GX). In addition, GX found *rpoB* mutations in all six of the rifampin-resistant strains detected. The test was negative in 20 culture-negative and 20 nontuberculous culture-positive samples (100% specificity). GX offers high potential for the diagnosis of tuberculosis due to its capacity for direct detection of MTC, its rapidity, and its simplicity.**

Tuberculosis (TB) remains one of the biggest health problems in developing and industrialized countries and is associated with high rates of morbidity and mortality (19). The emergence and spread of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to multiple drugs represent a serious threat to TB control worldwide (18). Early diagnosis of active TB and detection of multidrug-resistant (MDR) strains are essential to interrupt transmission. Traditionally, acid-fast bacillus (AFB) smear microscopy has been the initial method for diagnosis, due to its speed, simplicity, and low cost. However, its low sensitivity (45 to 80% of positive cultures), as well as the fact that a significant percentage (17%) of bacillus transmission is due to smear-negative pulmonary cases, limits the usefulness of this technique (1). On the other hand, due to the intrinsic slow growth of these microorganisms, mycobacterial culture (the gold standard method for TB diagnosis) takes several weeks to provide microbiological confirmation. Therefore, other techniques are needed to reduce turnaround time to diagnosis (13, 16).

In recent years, direct-detection methodologies, most of them based on nucleic acid amplification, have appeared as potentially useful tools for the rapid diagnosis of TB (7–9, 11–14). Guidelines for their use have been defined and recently updated (6).

A real-time automated integrated system, the GeneXpert system using the Xpert MTB/RIF assay (Cepheid, Sunnyvale, CA) (GX), has recently been developed and evaluated (2, 3, 10). GX integrates DNA extraction, genomic amplification (heminested PCR), semiquantitative detection of *M. tuberculosis* complex (MTC), and rifampin (RIF) resistance determi-

nation in a single cartridge, thus reducing labor time and cross-contamination risk.

The aim of the present study was to evaluate the effectiveness of GX for direct detection of MTC and RIF resistance in smear-negative clinical respiratory and nonrespiratory samples.

One hundred twenty-five smear-negative clinical samples from 122 patients, collected over a 10-year period, were retrospectively studied; 85 samples had MTC-positive cultures, 20 samples (all respiratory) had isolates of nontuberculous mycobacteria (5 rapidly growing mycobacteria, 4 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex isolates, 3 *Mycobacterium kansasii* isolates, and 8 others), and 20 samples had negative mycobacterial cultures (Table 1). Nonsterile clinical samples were pretreated according to the conventional *N*-acetyl-L-cysteine-NaOH digestion-decontamination procedure, and sterile specimens were processed directly. Afterwards, 1 ml of these samples was directly frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and the remaining volume was used for the performance of the following tests: (i) microscopic examination for acid-fast organisms (auramine-rhodamine and Ziehl-Neelsen stains) and (ii) mycobacterial culture using Lowenstein-Jensen and Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, Towson, MD) as solid and liquid media, respectively. The GX assay was performed according to manufacturer's instructions, with 1 ml of the frozen samples. Briefly, the GX assay consists of the inactivation of the sample with NaOH and isopropanol (sample reagent [SR]), at a 1:2 ratio, for 15 min; afterwards, the mixture is introduced into the Xpert MTB/RIF cartridge and then loaded into the Xpert instrument for DNA extraction and amplification of a 192-bp segment of the *rpoB* gene. The detection consists of the hybridization of the amplicon with five overlapping probes complementary to the *rpoB* "core" region (81 bp) determining the RIF resistance (9, 15, 17). The cartridge also includes spores of *Bacillus globigii* as an internal control of the sample processing and the real-time PCR assay.

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge, C/ Feixa Llarga s/n. 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Phone and fax: 34 932607930. E-mail: falcaide@bellvitgehospital.cat.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 29 December 2010.

TABLE 1. Sources and distribution of 125 smear-negative clinical samples tested by GX

Specimen type (total no. of samples)	No. of samples with indicated result by culture <sup>a</sup>		
	Positive for MTC	Positive for NTM <sup>b</sup>	Negative
Respiratory specimens			
Sputum (92)	72	19	1
Bronchial aspirate (12)	5	1	6
Pulmonary biopsy (1)	1		
Nonrespiratory specimens			
Pleural fluid (4)	2		2
Gastric aspirate (5)	2		3
Urine (2)	2		
Stool (1)	1		
Cerebrospinal fluid (3)			3
Ascitic fluid (2)			2
Lymph node aspirate (1)			1
Skin biopsy (1)			1
Mammary abscess (1)			1

<sup>a</sup> Mycobacterial growth in liquid and/or solid media.

<sup>b</sup> NTM, nontuberculous mycobacteria.

Every MTC isolate was also tested for susceptibility against antituberculous first-line drugs by using the BACTEC 460 radiometric system (Becton Dickinson, Towson, MD). The critical concentration of RIF used was 2 µg/ml. Isolates showing resistance to RIF were further analyzed by sequencing of an internal region of the *rpoB* gene, which included the rifampin resistance-determining region (RRDR), in order to identify mutations associated with phenotypic resistance (17).

Despite the fact that all samples had been stored frozen (−80°C) for several years (1 to 10 years), GX detected the DNA of MTC, in a total time of 2 h, in 64 of 85 (75.3%) clinical samples with negative smears and positive cultures of MTC. Percentages of GX positivity, according to time of storage of MTC culture-positive respiratory samples, were studied in order to determine whether the prolonged freezing of the specimens had an impact on the result of this technique. No statistical difference in terms of sensitivity was found, i.e., 80.6% (29/36) in samples stored frozen for 5 to 10 years, versus 76.2% (32/42) in those stored frozen for less than 5 years. These results reflect the robustness of GX even under demanding conditions such as the long-term storage of the samples.

As expected, a higher sensitivity (61 of 78 [78.2%]) was found for respiratory specimens (Table 2). However, the actual effectiveness of GX in nonrespiratory samples is difficult to

establish due to the low number of samples studied ( $n = 7$ ), of which three were GX positive (one urine, one stool, and one gastric aspirate sample) and four negative (two pleural fluid, one urine, and one gastric aspirate sample).

Seven of the 85 samples (8.2%) with MTC-positive culture had a RIF-resistant isolate also resistant to isoniazid (MDR strains). GX detected DNA of MTC in six of them and found *rpoB* mutations in all six GX-positive samples (lack of hybridization of one of the *rpoB* probes). Mutations in these strains were confirmed by sequencing; all showed a Ser531Leu shift. Although GX can detect the nucleotide substitutions, a susceptibility test is also needed to confirm phenotypic resistance. Nevertheless, mutations in *rpoB* and phenotypic resistance to RIF are highly correlated in 95 to 98% of cases (17); therefore, GX's high sensitivity for detecting these genotypic variations means that the technique has a high predictive value for the rapid diagnosis of multidrug resistance. Consequently, GX may assist clinicians to provide proper initial treatment of patients with potential MDR TB and thus minimize its spread. As regards the samples with negative MTC culture, no positive results were obtained by GX, showing 100% specificity (Table 2). Only one sample (a gastric aspirate with negative culture for mycobacteria) showed an invalid GX result. In this case, the *Bacillus globigii* spore internal control was negative, suggesting that the sample was not properly processed for DNA extraction in the cartridge or that it contained PCR inhibitors.

The impact of the bacterial load of the sample (inoculum size) on the GX result was also evaluated. Since the GX assay gives a semiquantitative result when MTC is detected, an initial correlation between this GX result and the time to growth in the liquid medium was established. An inverse association between the median days to growth and the semiquantitative GX result was found: only one sample had a high semiquantitative result (average cycle threshold [ $C_T$ ] value of 15.4), with a median time to growth in liquid medium of 13 days; 8 samples had a medium result (average  $C_T$  value of 19.6), with a median of 10 days; 26 samples had a low result (average  $C_T$  value of 25.9), with a median of 15 days; and 29 samples showed a very low result (average  $C_T$  value of 31.1), with a median of 20 days. Afterwards, the correlation between the time to growth in liquid medium and the qualitative result (positive/negative) of GX was determined. The median time required to grow in liquid medium for GX-positive samples with MTC isolates was statistically lower than that for GX-negative samples (17 versus 22 days;  $P = 0.003$ ) (Fig. 1). All of these data confirmed the expected association between the

TABLE 2. GX results for the detection of *M. tuberculosis* complex in 125 smear-negative clinical samples

GX result <sup>d</sup>	No. of MTC culture-positive specimens		No. of MTC culture-negative specimens		Total	Predictive value <sup>d</sup> (%)	
	Respiratory	Nonrespiratory	Positive for NTM <sup>b</sup> , respiratory	Negative for mycobacteria <sup>c</sup>			
				Respiratory			Nonrespiratory
Positive	61	3	0	0	0	64	100
Negative	17	4	20	9	10	60	65

<sup>a</sup> The GX sensitivity was 75.3% (95% confidence interval [95% CI], 64.5 to 83.7%), and the specificity was 100% (95% CI, 88.8 to 100%).

<sup>b</sup> NTM, nontuberculous mycobacteria.

<sup>c</sup> One respiratory culture-negative sample had an invalid result using GX.

<sup>d</sup> The positive predictive value is given for the positive GX results, and the negative predictive value is given for the negative GX results.

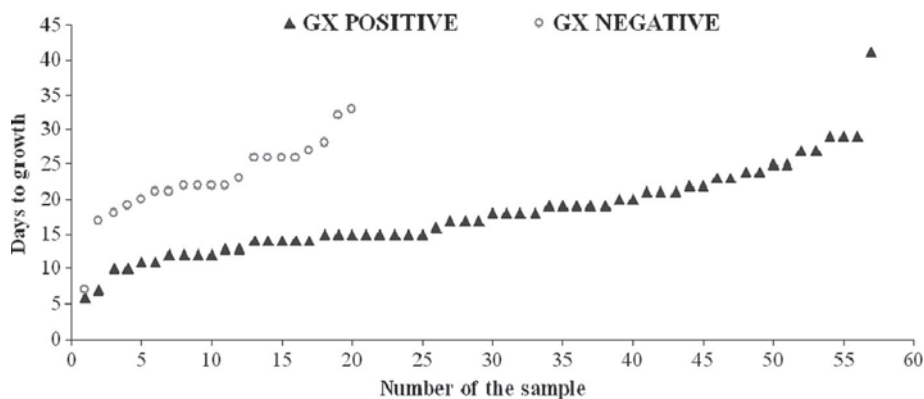


FIG. 1. Time to growth of *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid medium according to GX qualitative result (positive result,  $n = 57$ ; negative result,  $n = 20$ ). Eight samples (seven GX positive and one GX negative) were excluded due to negative growth in liquid medium ( $n = 4$ ), bacterial contamination of the sample ( $n = 3$ ), or lack of liquid culture ( $n = 1$ ).

inoculum size present in the sample and the result of the technique. However, the global data obtained in the present study indicate that GX has a high sensitivity, since all samples analyzed had a low mycobacterial load.

The relatively high cost of GX is an important issue that TB control programs should consider prior to implementation of this assay. Its clinical and epidemiological advantages should be weighed against the resources available in each setting.

In summary, the GX technique has demonstrated a high capacity for detecting MTC and for predicting multidrug resistance in smear-negative clinical samples. Moreover, its rapidity, simplicity, and low laboriousness make the technique a good candidate for routine use in many clinical laboratories whenever the clinical criteria for its application are met (4–6).

This study was supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

We are grateful to IZASA, S.A., for providing us with the GX reagents.

R. Moure and L. Muñoz received a grant from the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

#### REFERENCES

- Behr, M. A., et al. 1999. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* **353**:444–449.
- Blakemore, R., et al. 2010. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2495–2501.
- Boehme, C. C., et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* **363**:1005–1015.
- Catanzaro, A. 1997. What is the appropriate use of the rapid diagnostic tests for tuberculosis? *Monaldi Arch. Chest Dis.* **52**:27–32.
- Catanzaro, A., et al. 2000. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *JAMA* **283**:639–645.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **58**:7–10.
- D'Amato, R. F., and A. Miller. 1998. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *Methods Mol. Biol.* **92**:203–214.
- Dinnes, J., et al. 2007. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol. Assess.* **11**:1–196.
- El-Hajj, H. H., S. A. Marras, S. Tyagi, F. R. Kramer, and D. Alland. 2001. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4131–4137.
- Helb, D., et al. 2010. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J. Clin. Microbiol.* **48**:229–237.
- Hillemann, D., S. Rusch-Gerdes, and E. Richter. 2006. Application of the Genotype MTBDR assay directly on sputum specimens. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **10**:1057–1059.
- Lemaitre, N., et al. 2004. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4307–4309.
- Moore, D. F., J. A. Guzman, and L. T. Mikhail. 2005. Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis by routine use of a nucleic acid amplification test. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **52**:247–254.
- Musial, C. E., L. S. Tice, L. Stockman, and G. D. Roberts. 1988. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2120–2123.
- Piatek, A. S., et al. 1998. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Biotechnol.* **16**:359–363.
- Taegtmeier, M., et al. 2008. The clinical impact of nucleic acid amplification tests on the diagnosis and management of tuberculosis in a British hospital. *Thorax* **63**:317–321.
- Telenti, A., et al. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**:647–650.
- WHO. 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO. 2010. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.



**Artículo 2****Effectiveness of an integrated real-time PCR method for detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples in an area of low tuberculosis prevalence**Raquel Moure<sup>a</sup>, Rogelio Martín<sup>a,b</sup>, Fernando Alcaide<sup>a,b</sup><sup>a</sup>Department of Microbiology, IDIBELL-Bellvitge Hospital, and <sup>b</sup>Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Feixa Llarga, Hospitalet de Llobregat (Barcelona), Spain.

Journal of Clinical Microbiology, 2012 Feb; 50(2):513-515

Los casos de tuberculosis extrapulmonar son especialmente difíciles de diagnosticar, debido a la sintomatología atípica y la dificultad en la detección microbiológica derivada de la escasa carga bacilar presente en las muestras extrapulmonares (paucibacilares). En Catalunya, en el año 2011, un 31,3% de todos los casos de tuberculosis fueron de afectación exclusivamente extrapulmonar, y un 11,9% eran casos con afectación en ambos tipos de localizaciones: pulmonar y extrapulmonar.

Si bien el sistema de detección rápida Xpert MTB/RIF no fue validado inicialmente para su uso en muestras extrapulmonares, los buenos resultados obtenidos en la evaluación previa con muestras pulmonares y la escasez de trabajos publicados hasta la fecha en este tipo de muestras en países de baja-media incidencia tuberculosa, impulsó a estudiar su eficacia potencial también en muestras extrapulmonares. Para ello se seleccionó de forma retrospectiva una colección de 108 muestras extrapulmonares de origen diverso (líquidos no estériles, nódulos linfáticos, abscesos, biopsias y líquidos estériles) con cultivo positivo de *M. tuberculosis* complex y baciloscopia negativa. También se incluyeron muestras con cultivo negativo de micobacterias (n=41), para evaluar la especificidad de la técnica.

Se observó que la sensibilidad de este ensayo dependía de cuál era el origen extrapulmonar de la muestra estudiada. Así, en nódulos linfáticos y abscesos, la sensibilidad alcanzaba valores muy elevados (superiores al 70%). En un segundo grupo, se hallaron los líquidos no estériles (orina y aspirados gástricos). En último lugar, los líquidos estériles, donde menos de la mitad fueron detectados con el Xpert MTB/RIF (en especial los líquidos pleurales; 26,9%). Una de las razones que podría explicar este hallazgo es el hecho de que las muestras de líquidos estériles contienen un inóculo bacteriano muy escaso, siendo difícil llegar al límite de detección del Xpert MTB/RIF. Con todo, la sensibilidad global del sistema fue bastante elevada (58,3%), por lo que el Xpert MTB/RIF se perfila como una herramienta útil en la práctica clínica, en el difícil diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar.



# Effectiveness of an Integrated Real-Time PCR Method for Detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Smear-Negative Extrapulmonary Samples in an Area of Low Tuberculosis Prevalence

Raquel Moure,<sup>a</sup> Rogelio Martín,<sup>a,b</sup> and Fernando Alcaide<sup>a,b</sup>

Department of Microbiology, IDIBELL-Bellvitge Hospital,<sup>a</sup> and Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona,<sup>b</sup> Feixa Llarga, Hospitalet de Llobregat (Barcelona), Spain

**Early extrapulmonary tuberculosis (EPTB) diagnosis is particularly difficult. Among 108 smear-negative extrapulmonary samples showing a positive culture for *Mycobacterium tuberculosis* complex (43 body fluids and 65 nonliquid specimens), 63 (58.3%) were positive with the Xpert MTB/RIF assay (GX). GX sensitivity was quite low for samples from sterile locations (especially for pleural fluids: 26.9%) but high for some nonliquid samples, like abscess aspirates (76.5%). In summary, GX may be a useful tool to be considered for EPTB diagnosis.**

Tuberculosis (TB) is still one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Each year there are almost nine million new cases and two million deaths (20). Pulmonary TB is the main form of the disease. However, due to certain social and epidemiological factors, such as coinfection with HIV, disease patterns have changed in recent years (5a, 7, 19) and the frequency of disseminated and extrapulmonary tuberculosis (EPTB) has risen, even in industrialized areas. The incidence of exclusive EPTB in our setting (Catalonia, Spain) in 2009 was 26.1%, and 12.2% of all TB cases affected both pulmonary and extrapulmonary sites (6). The absence of some typical TB symptoms hinders the clinical diagnosis of EPTB and may mislead physicians to suspect other diseases. Extrapulmonary specimens have a very low bacterial load, so the sensitivity of direct microscopy examination for detecting MTBC is low. This is particularly true of pleural TB, for which *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) detection is achieved by smear microscopy in fewer than 5% of cases (11, 16).

GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA) is an automated, integrated, real-time PCR system which has recently been developed for rapid detection of MTBC and rifampin (RIF) resistance. The Xpert MTB/RIF assay (GX) has been evaluated in detail, and several studies have demonstrated its utility for direct detection in pulmonary specimens (2, 3, 8, 12). The effectiveness of GX for diagnosing extrapulmonary TB has not been conclusively demonstrated, especially in countries with low or medium TB prevalence, since the system was initially validated only for respiratory specimens and most published studies include low numbers of extrapulmonary samples (1, 5, 9, 18).

The aim of the present study was to evaluate the feasibility of GX for the detection of MTBC in extrapulmonary smear-negative specimens, in a Western country with a low prevalence of TB and EPTB. The study also classified the different sources of these specimens in order to test the hypothesis that the sensitivity of GX may vary considerably according to the origin of the sample.

A total of 149 smear-negative samples (one sample per patient) collected from July 1999 to May 2011 in Costa Ponent (Catalonia, Spain) were included in the study. On arrival at the mycobacterial laboratory, nonsterile clinical samples were pretreated using the *N*-acetyl-L-cysteine-NaOH digestion-decontamination method with a final volume of 2 ml (10). Sterile fluid specimens were

directly processed, and biopsy specimens were disaggregated with a mortar and then resuspended with saline solution (2 ml). Afterwards, 1 ml of the specimens was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The remaining volume was processed as follows: (i) microscopic examination for acid-fast organisms (auramine-rhodamine and Ziehl-Neelsen stains) and (ii) mycobacterial culture using 0.2 ml of Lowenstein-Jensen medium and 0.5 ml of Bactec MGIT 960 medium (Becton Dickinson, Towson, MD) as solid and liquid media, respectively. Positive cultures were confirmed as MTBC by the use of DNA probes (Accuprobe; GenoProbe Inc., San Diego, CA). Among the 149 specimens studied, 108 specimens had a positive culture of MTBC: (i) 43 liquid specimens (37 sterile fluids, 3 gastric aspirates, and 3 urine specimens) and (ii) 65 nonliquid specimens (34 lymph nodes, 17 abscess aspirates, 12 tissue samples, and 2 stool specimens). In addition, 41 clinical samples with a negative mycobacterial culture from patients without TB were also studied: (i) 21 sterile fluids, five gastric aspirates, and one urine sample and (ii) four lymph nodes, two abscess aspirates, and eight tissue samples (Table 1). A GX assay was performed in April-May 2011. The portion (1 ml) of the specimens kept frozen (see above) was thawed and used for the GX assay, performed according to the manufacturer's protocol for pulmonary samples.

GX detected DNA of MTBC in 63 of the 108 clinical extrapulmonary specimens with MTBC-positive cultures (58.3%). As expected in smear-negative samples, most of the semiquantitative results given by the GX report were "Low" ( $n = 27$ ) or "Very Low" ( $n = 34$ ) and only two samples had a "Medium" bacterial load. As for the rifampin susceptibility result, GX did not detect any *rpoB* mutation, corroborating the results obtained with the conventional drug susceptibility test of the strains corresponding to these specimens (all susceptible).

Unlike respiratory specimens, the group of extrapulmonary

Received 23 November 2011 Accepted 27 November 2011

Published ahead of print 7 December 2011

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

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.06467-11

**TABLE 1** Results of Xpert MTB/RIF according to the source and MTBC culture of the samples

Clinical specimen	No. of specimens with <sup>a</sup> :					Total no. of specimens	Sensitivity	Specificity
	Positive MTBC culture		Negative MTBC culture					
	GX <sup>+</sup>	GX <sup>-</sup>	GX <sup>+</sup>	GX <sup>-</sup>	GX IND			
<b>Sterile fluids</b>								
Pleural fluid	7	19	0	5	0	31	40.5%	100%
Cerebrospinal fluid	2	0	0	12	0	14		
Joint fluid	5	2	0	0	0	7		
Ascitic fluid	0	1	0	2	0	3		
Pericardial fluid	1	0	0	2	0	3		
<b>Nonsterile fluids</b>								
Gastric aspirate	2	1	0	3	2 <sup>b</sup>	8	66.7%	100%
Urine	2	1	0	1	0	4		
Lymph nodes	24	10	0	4	0	38	70.6%	100%
<b>Abscess aspirates</b>								
Knee abscess	1	0	0	0	0	1	76.5%	100%
Cervical abscess	3	2	0	1	0	6		
Skin abscess	3	1	0	0	0	4		
Osteitis pus	4	1	0	0	0	5		
Empyema	2	0	0	1	0	3		
<b>Tissues</b>								
Pelvic biopsy	0	0	0	1	0	1	41.7%	100%
Testicular biopsy	1	0	0	0	0	1		
Colon biopsy	0	0	0	2	0	2		
Vertebral disc biopsy	0	0	0	1	0	1		
Spondylodiscitis puncture	0	0	0	1	0	1		
Pericardial biopsy	0	0	0	1	0	1		
Bone biopsy	1	2	0	0	0	3		
Bone marrow biopsy	0	0	0	1	0	1		
Synovial biopsy	0	2	0	0	0	2		
Mediastinal tissue	0	1	0	0	0	1		
Skin biopsy	1	1	0	1	0	3		
Larynx biopsy	0	1	0	0	0	1		
Costal cartilage biopsy	2	0	0	0	0	2		
Stool	2	0	0	0	0	2	100%	100%
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>45</b>	<b>0</b>	<b>39</b>	<b>2</b>	<b>149</b>	<b>58.3%</b>	<b>100%</b>

<sup>a</sup> MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; GX, Xpert MTB/RIF; GX IND, Xpert MTB/RIF indeterminate result.

<sup>b</sup> The two invalid GX results were not included in the calculation of the specificity.

samples is quite heterogeneous, which explains the great variability obtained in the sensitivity values. Thus, among the 63 samples with a positive GX result, partial sensitivities differed according to the categories of the specimens: 40.5% in sterile fluids, 66.7% in nonsterile fluids, 70.6% in lymph nodes, 41.7% in tissue samples, 76.5% in abscess aspirates, and 100% (two of two) in stool material (Table 1). The reason why abscess aspirates and lymph node specimens show GX sensitivities comparable to those of pulmonary samples is probably their similarity regarding the inoculum size and physical properties. The low GX positivity in the biopsy samples may be due in part to the low bacterial load and to the texture of the specimens, which are often very resistant to breakup. Within the group of sterile fluids (which showed poorer sensitivity results), marked differences were found according to the origin of the samples. Only 7 of 26 (26.9%) of pleural fluids were GX positive, which meant a significantly lower sensitivity

than in the other sterile fluids (72.7%;  $P = 0.02$ ): five of seven joint fluids containing MTBC were detected with GX, as well as both CSF samples; the sole pericardial fluid sample was GX positive, and the sole ascitic fluid sample was GX negative. The low detection ability in some sterile specimens, such as pleural fluids, could be explained by the low bacterial load contained in these samples. Techniques based on nucleic acid amplification have recently been considered for pleural TB diagnosis, in order to improve sensitivity and specificity (13, 14, 17). The lower efficiency obtained in these pleural effusion specimens with GX (though better than the sensitivity achieved by other methods) highlights the assay's limited detection ability in very-low-yield samples. On the other hand, no differences in GX positivity were observed with regard to the anatomical site from which the samples were obtained either within the group of nonsterile liquid samples (gastric aspirate and urine samples) or within the group of nonliquid spec-



imens (lymph nodes, abscess aspirates, and tissue and stool specimens).

All MTBC culture-positive samples included in the study contained enough bacterial load to show growth in at least one of the culture media in less than 6 weeks. Nevertheless, in light of previous reports (12), an association between the bacterial load (represented by the days required for growth) and the qualitative and semiquantitative results of the GX was found. The median time to growth in liquid medium for Medium/Low results was 17 days, compared with 20.5 for samples showing Very Low results, indicating a statistically significant difference ( $P = 0.001$ ). When the time to growth was analyzed with regard to the qualitative GX detection (positive/negative), the results were similar. In the broth medium, the median time required for growth for the MTBC specimens detected with GX was significantly lower (19 days compared to 23.5 days) than in the GX-negative samples ( $P < 0.001$ ). These results suggest that the negative predictive value of the GX may decrease when dealing with specimens with a very low bacterial load.

The GX showed good specificity: among the 41 specimens with negative mycobacterial culture, GX offered an interpretable result (negative) in 39 samples. Two samples (gastric aspirates) gave an invalid result. The most plausible reason for these invalid assays is that these reactions were inhibited by the low pH in the gastric specimens, since they had been directly processed with GX (without decontamination or buffering).

To summarize, the Xpert MTB/RIF technique has demonstrated a substantial capacity for the diagnosis of EPTB mostly from nonsterile fluids (gastric aspirates and urine samples), lymph nodes, or abscess aspirate specimens. Even though its sensitivity decreases notably when the source of the sample is a sterile location such as a pleural effusion or a biopsy specimen, the technique still offers higher sensitivity for direct detection of MTBC than most conventional techniques. Therefore, GX may be a potentially useful additional tool in cases of EPTB not detected by microscopy, when clinical suspicion is high (4), and when performance of the test may be cost-effective.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III—FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). R. Moure received a grant from the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

We are grateful to Cepheid and Izasa S.A. for providing us with the Xpert MTB/RIF reagents. We also thank J. M. Caldito for technical assistance.

#### REFERENCES

- Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaitre N. 2011. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 49:1772–1776.
- Boehme CC, et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 363:1005–1015.
- Boehme CC, et al. 2011. 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* 377:1495–1505.
- Catanzaro A, et al. 2000. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *JAMA* 283:639–645.
- Causse M, Ruiz P, Gutierrez-Aroca JB, Casal M. 2011. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 49:3065–3067.
- Fitzgerald DW, Sterling TR, Hass DW. 2010. *Mycobacterium tuberculosis*, p 3129–3163. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 7th ed, vol 2. Churchill Livingstone, New York, NY.
- Generalitat de Catalunya. 2009. Informe anual. Situació epidemiològica i tendència de l'endèmia tuberculosa a Catalunya. Departament de Salut, Barcelona, Catalonia, Spain. <http://www.gencat.cat/salut/depsalut/html/ca/dir2474/inf2009tuber.pdf>.
- Golden MP, Vikram HR. 2005. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am. Fam. Physician* 72:1761–1768.
- Helb D, et al. 2010. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J. Clin. Microbiol.* 48:229–237.
- Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. 2011. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J. Clin. Microbiol.* 49:1202–1205.
- Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 87:775–779.
- Light RW. 1999. Useful tests on the pleural fluid in the management of patients with pleural effusions. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 5:245–249.
- Moure R, et al. 2011. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 49:1137–1139.
- Nagesh BS, Sehgal S, Jindal SK, Arora SK. 2001. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid. *Chest* 119:1737–1741.
- Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford JM, Jr. 2004. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 4:6.
- Reference deleted.
- Seibert AF, Haynes J, Jr, Middleton R, Bass JB, Jr. 1991. Tuberculous pleural effusion. Twenty-year experience. *Chest* 99:883–886.
- Trajman A, et al. 2008. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur. Respir. J.* 31:1098–1106.
- Vadwai V, et al. 2011. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis? *J. Clin. Microbiol.* 49:2540–2545.
- von Reyn CF, et al. 2011. Disseminated tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: ineffective immunity, polyclonal disease and high mortality. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15:1087–1092.
- WHO. 2011. Global tuberculosis control: 2011 report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.



**Artículo 3****GeneXpert® for smear-negative pulmonary tuberculosis: does it play a role in low-burden countries?**

Laura Muñoz<sup>a</sup>, Raquel Moure<sup>b</sup>, Núria Porta<sup>c</sup>, Lucía González<sup>a</sup>, Rosario Guerra<sup>a</sup>,  
Fernando Alcaide<sup>b,d</sup>, Miguel Santín<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Department of Infectious Diseases at Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Department of Microbiology at Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain; <sup>c</sup>Central Unit of Clinical Research and Clinical Trials (UCICEC) at Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain; <sup>d</sup>Department of Pathology and Experimental Therapeutics from University of Barcelona, Spain; <sup>e</sup>Department of Clinical Sciences from University of Barcelona, Spain.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013 Mar; 75(3):325-326

El sistema Xpert MTB/RIF ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico precoz de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, así como de coste-beneficio en países de alta incidencia tuberculosa. Sin embargo, no hay estudios que avalen la rentabilidad de esta técnica (de alto coste económico), en países con baja-media incidencia de tuberculosis. El presente estudio se realizó retrospectivamente, estableciéndose dos grupos de pacientes con tuberculosis: 1) “casos”: 50 pacientes donde la baciloscopia fue negativa y fueron necesarias pruebas adicionales hasta confirmar el diagnóstico de tuberculosis, y 2) “controles”: 100 pacientes, con baciloscopia positiva (diagnosticados de forma rápida). En los “casos”, el Xpert MTB/RIF fue realizado *a posteriori*, en el momento del estudio (analizando las muestras congeladas de estos pacientes) con el fin de determinar la sensibilidad de la prueba.

Se demostró que el grupo de “casos” tuvo una mediana de tiempo hasta el inicio del tratamiento e inicio del estudio de contactos, mayor que el grupo “control”: 9 y 22 días, frente a 2 y 4 días, respectivamente. Asimismo, los pacientes del grupo de “casos” fueron hospitalizados con mayor frecuencia (56%) que el de los “controles” (39%) y necesitaron un mayor número de broncoscopias y de TAC torácicos que el grupo “control” (25% y 36% versus 9% y 12%, respectivamente). En términos económicos, se determinó una media de 2.426,58 € de gasto en el grupo de “casos”, frente a 254,18 € en el grupo “control”. La sensibilidad de la prueba en el grupo de “casos” fue del 68%. Teniendo en cuenta que en nuestra área el 58,5% de los casos de tuberculosis presentan baciloscopia positiva en el periodo de estudio, se concluyó que aproximadamente el 86% (incremento del 30%) de los casos de tuberculosis en nuestra área podrían tener un diagnóstico precoz si se realizase el Xpert MTB/RIF como prueba rápida adicional de rutina, en casos de baciloscopia negativa y alta sospecha clínica de tuberculosis.





## GeneXpert® for smear-negative pulmonary tuberculosis: does it play a role in low-burden countries?

Laura Muñoz <sup>a,\*</sup>, Raquel Moure <sup>b</sup>, Nuria Porta <sup>c</sup>, Lucia Gonzalez <sup>a</sup>, Rosario Guerra <sup>a</sup>, Fernando Alcaide <sup>b,d</sup>, Miguel Santin <sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Department of Infectious Diseases at Bellvitge University Hospital-IDIBELL, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Microbiology at Bellvitge University Hospital-IDIBELL, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Central Unit of Clinical Research and Clinical Trials (UCICEC) at Bellvitge University Hospital-IDIBELL, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Department of Pathology and Experimental Therapeutics from University of Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Department of Clinical Sciences from University of Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 September 2012

Accepted 25 November 2012

Available online 28 December 2012

#### Keywords:

Early diagnosis

*Mycobacterium tuberculosis*

Nucleic acid amplification

Xpert MTB/RIF assay

### ABSTRACT

We performed a retrospective analysis of costs and time to treatment (TT) of 150 culture-confirmed TB cases: 100 sputum smear (SS) (+) and 50 SS(−). This group underwent GeneXpert® (GX) assay. Expenditures and TT of SS(−)/GX(+) cases were inferred from the SS(+) group. GX detected 68% of SS(−) cases.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Effective control of tuberculosis (TB) requires rapid identification and early treatment of patients with active disease so as to interrupt further spread into the community (Boehme et al., 2010). The GeneXpert® MTB/RIF assay (Xpert®; Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) detects *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and rifampin resistance from clinical samples in 2 h. Its sensitivity and specificity in acid-fast bacilli (AFB) smear-negative respiratory samples reach 72.5% and 99%, respectively, compared to the gold standard MTC culture (Boehme et al., 2010; Boehme et al., 2011; Marlowe et al., 2011; Moure et al., 2011). In December 2010, the WHO recommended Xpert® as the initial diagnostic test for suspected cases of HIV-associated tuberculosis or MDR-TB (WHO, 2010), and recent studies suggest its cost-effectiveness in high-burden countries (Theron et al., 2012; Vassal et al., 2011). However, there are no studies or specific recommendations for low-burden settings, where MDR-TB and HIV coinfection are of lesser concern.

In this study, we aimed to explore the potential gains in time, health resources, and costs achieved by the addition of Xpert® to clinical practice for the diagnosis of suspected smear-negative TB in a low-burden country.

After obtaining local ethics approval, we conducted a retrospective study reviewing the log of MTC-positive cultures of the Microbiology Department to identify all cases of pulmonary TB diagnosed by sputum

culture between 2001 and 2010. In our area (Barcelona, Spain), the incidence rate of TB is 19 new cases per 100,000 people (Generalitat de Catalunya and Departament de Salut, 2010), and primary rifampin resistance is below 1%. First, we identified all drug-sensitive isolates collected prior to any specific treatment from consecutive AFB-negative patients without additional AFB-positive sputum samples for at least 1 week and tested them with Xpert® (50 patients). Then, we selected 2 AFB-positive cases for each AFB-negative case (100 patients), matched by the date of their first positive culture, for use as a comparator group. Mean time from clinical suspicion to beginning of treatment and mean cost per patient diagnosed in each group were the primary outcomes of the study. Other variables included demographic and clinical features.

In Table 1, the 2 groups are compared. Time elapsed until treatment and beginning of the contact-tracing study were both significantly longer in smear-negative patients than in positive ones: median 9 and 2 days until initiation of treatment, and 22 and 4 days until the beginning of the contact study, respectively. Regarding health resources spent until TB diagnosis was established, compared with AFB-positive patients, AFB-negative individuals were hospitalized more frequently (56% versus 39%) and required more days of hospitalization (mean 13.5 versus 6.2 days). The amount of complementary tests administered before diagnosis was made was also higher in AFB-negative than in AFB-positive patients: only 9% of AFB-positive patients underwent a bronchoscopy, compared with 25% of the AFB-negative group. Similarly, the difference between the

\* Corresponding author. Tel.: +34-932607625; fax: +34-932607637.

E-mail address: [laura.lopez@bellvitgehospital.cat](mailto:laura.lopez@bellvitgehospital.cat) (L. Muñoz).

**Table 1**  
Characteristics of the study population.

	AFB negative, n = 50 (%)	AFB positive, n = 100 (%)	P value
Male sex	35 (70)	75 (75)	0.51
Age (years), mean (SD)	49.3 (20.2)	41.3 (16.4)	0.02
Birth in a high-incidence TB country	12 (24)	31 (31)	0.24
Immunosuppressive condition <sup>a</sup>	14 (28)	21 (21)	0.22
Symptoms suggestive of TB <sup>b</sup>	25 (50)	82 (82)	<0.001
Radiographic features <sup>c</sup>			
Normal Rx	6 (12)	1 (1)	0.001
Parenchymal infiltrates	15 (30)	24 (24)	
Cavitation	20 (40)	67 (67)	
Other	9 (18)	5 (5)	
Patients requiring hospitalization	28 (56)	39 (39)	0.06
Days of hospitalization			
Mean (SD)	13.5 (23.3)	6.2 (10.9)	0.02
Median (IQR)	7.5 (0–16)	0 (0–9.3)	
Reasons for admission			
Diagnostic work-out	20 (71)	9 (23)	<0.001
Worsened clinical condition	1 (4)	12 (31)	0.005
Hemoptysis/respiratory failure	5 (18)	10 (26)	
Others	2 (7)	8 (20)	
Number of invasive tests required for diagnosis, per patient			
Bronchoscopy	None 36 (72) ≥1 14 (28)	91 (91) 9 (9)	0.002
Chest CT	None 32 (64) ≥1 18 (36)	88 (88) 12 (12)	<0.001
CT-guided puncture of the lung	None 45 (90) ≥1 5 (10)	98 (98) 2 (2)	0.04
Days to initiation of treatment			
Mean (SD)	17.3 (19.8)	3.9 (6.1)	<0.001
Median (IQR)	8.5 (2.25–25.3)	2 (1–4)	
Days to initiation of contact tracing			
Mean (SD)	24.1 (24.2)	7.9 (11.5)	<0.001
Median (IQR)	22 (2.2–32)	4 (1–11)	

AFB = Acid-fast bacilli; IQR = interquartile range; CT = computed tomography.

<sup>a</sup> Including HIV, drugs, cancer and impaired renal function (patients could present more than 1 condition).

<sup>b</sup> Included fever, cough, and weight loss for at least 2 weeks.

<sup>c</sup> Patients could present more than 1 condition.

2 groups regarding chest computed tomography was significant ( $P < 0.05$ ): 12% in AFB-positive versus 36% in AFB-negative patients.

We computed direct expenditures for each group: median cost per patient in the AFB-negative group was €2426.58 and €254.18 in AFB-positive patients. Because patients requiring hospitalization incurred higher costs than those who did not, we also performed separate analyses for each group (Table 2).

Xpert® was positive in 34 (68%) of 50 AFB-negative patients. This is the proportion of AFB-negative patients who could be diagnosed by Xpert® and whose costs and time to diagnosis could be inferred from the AFB-positive group, after adding the cost of the Xpert® cartridge (€70). No rifampin resistance was detected.

According to the WHO recommendations, Xpert® deployment should be based on local setting-specific factors. In Spain, a low-burden TB country where the majority of mycobacterial isolates are identified as MTC and primary resistance to rifampin is low, the clinical gain of performing Xpert® in smear-positive patients would probably be negligible and the test would not be cost-effective for TB control. However, shortening time to treatment of AFB-negative patients whose diagnosis is delayed until culture results are available may help avoid TB transmission and may also save health resources. Our results showed that the average resource use and cost per patient were higher in cases with delayed diagnosis (smear-negative cases) than in those diagnosed earlier. According to the literature on cost of TB treatment, hospitalizations are among the major cost drivers for TB treatment (Taylor et al., 2000). In our study, completing diagnostic work-up was the main reason for admission in 71% of AFB smear-negative patients, whose hospitalization could have been avoided if a rapid diagnosis test had been available.

**Table 2**  
Cost per patient (€) according to AFB smear status.

	AFB negative, n = 48 (%) <sup>a</sup>	AFB positive, n = 100 (%)
All patients		
Mean (SD)	3260.52 (3406.4)	2097.0 (3224.78)
Median (IQR)	2426.58 (231.49–5269.65)	254.18 (218.61–3297.82)
Patients requiring hospitalization		
Mean (SD)	5788.72 (2698.23)	4989.51 (3603.31)
Median (IQR)	5090.92 (4542.52–7481.04)	3935.96 (1965.81–7404.91)
Patients not requiring hospitalization		
Mean (SD)	272.65 (191.39)	247.7 (142.62)
Median (IQR)	218.61 (193.96–281.38)	218.61 (171.47–244.89)

<sup>a</sup> Calculated from 48 patients (2 patients from the study population were excluded due to unexpectedly long hospitalizations).

Since 86 of 147 confirmed pulmonary TB cases (58.5%) during the last 3 years in our center had positive AFB smear (unpublished data), and given the 68% sensitivity of Xpert® in AFB-negative TB cases found in our study, we conclude that 127 (86%) of all culture-proven pulmonary TB cases at our center would have resulted in early diagnosis (an increase of nearly 30%) if Xpert® had been routinely used.

Unfortunately, the present study cannot establish whether or not this approach to the diagnosis of pulmonary TB is cost-effective. Since we only tested patients with culture-confirmed TB, we are unable to infer the costs derived from testing patients with clinical suspicion of TB in whom the diagnosis is finally ruled out. Nonetheless, in conjunction with a previous report (Catanzaro et al., 2000), our results strongly suggest that the rational use of Xpert®, based on careful clinical judgment, may offer a useful and cost-effective way to diagnose smear-negative pulmonary TB. In addition, Xpert® may have a role when resistance to rifampin is a concern—for example, in relapses of previously treated patients or patients from high-burden multidrug-resistant-TB countries, regardless of the AFB smear result.

In summary, our study showed that patients with smear-negative pulmonary TB started treatment later and incurred higher costs than patients with smear-positive pulmonary TB. As Xpert® shortens time to treatment onset and appears to reduce health resource use and costs in up to 70% of patients, its regular use in patients with a well-founded suspicion of TB and negative AFB smear may be a useful, cost-effective strategy for the diagnosis of pulmonary TB.

## References

- Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363(11):1005–15.
- Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, 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(9776):1495–505.
- Catanzaro A, Perry S, Clarridge JE, Dunbar S, Goodnight-White S, LoBue PA, et al. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *JAMA* 2000;283(5):639–45.
- Generalitat de Catalunya, Departament de Salut. Informe anual 2010. Situació epidemiològica i tendència de l'endèmia tuberculosa a Catalunya.
- Marlowe EM, Novak Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1621–3.
- Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcáide F. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples using an integrated real time PCR method. *J Clin Microbiol* 2011;49(3):1137–9.
- Taylor Z, Marks SM, Ríos Burrows NM, Weis SE, Stricof RL, Miller B. Causes and costs of hospitalization of tuberculosis patients in the United States. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4(10):931–9.
- Theron G, Pooran A, Peter J, van Zyl-Smit R, Mishra HK, Meldau R, et al. Do adjunct TB tests, when combined with Xpert MTB/RIF, improve accuracy and the cost of diagnosis in a resource-poor setting? *Eur Respir J* 2012 Jul;40(1):161–8.
- Vassal A, van Kampen S, Sohn H, Michael JS, John KR, den Boon S, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis with the Xpert MTB/RIF assay in high burden countries: a cost-effectiveness analysis. *PLoS Med* 2011;8(11):e1001120. [Epub 2011 Nov].
- WHO. Roadmap for rolling up Xpert MTB/RIF for rapid diagnosis of TB and MDR-TB; 2010. Geneva, Switzerland.

**Artículo 4****Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by a molecular method based on GenoQuick technology**Raquel Moure<sup>a</sup>, Miriam Torres<sup>a</sup>, Rogelio Martín<sup>a,b</sup>, Fernando Alcaide<sup>a,b</sup><sup>a</sup>Department of Microbiology, IDIBELL-Bellvitge Hospital, Feixa Llarga s/n, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, and <sup>b</sup>Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Journal of Clinical Microbiology, 2012 Jun; 50(6):2089-2091

Este trabajo fue el primer estudio de evaluación externo, a nivel mundial, de la técnica GenoQuick MTB, basada en amplificación del IS6110 por PCR convencional y posterior hibridación rápida en tiras de nitrocelulosa (*dipstick*), para la detección directa de *M. tuberculosis* complex. Para ello se seleccionó una colección de 96 muestras, con baciloscopia positiva (n=32) y negativa (n=64) y mayoritariamente de origen pulmonar. También se incluyeron en el análisis 15 muestras con micobacterias no tuberculosas, para estudiar la especificidad de la técnica. La sensibilidad del sistema resultó ser muy elevada en las muestras con baciloscopia positiva (100% de detección). En muestras con baciloscopia negativa, la sensibilidad global fue del 78,1%. Se observó una tendencia de relación inversa entre los días de crecimiento de las muestras y la sensibilidad de la técnica. Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, se constató que la conservación de las muestras mediante congelación no influía en el resultado del ensayo, por lo que quedó confirmada la robustez del sistema GenoQuick MTB.

Una muestra que contenía *Mycobacterium fortuitum* tuvo un resultado positivo con el sistema GenoQuick MTB, ya que poseía una homología con la IS6110 de *M. tuberculosis* complex. Este fenómeno ya había sido descrito en estudios anteriores, sin bien se trata de un fenómeno bastante infrecuente que, *a priori*, no se estima que influya en la especificidad general del GenoQuick MTB. Además de la buena sensibilidad, este sistema tiene un menor coste económico que otras técnicas comerciales existentes para la detección directa de *M. tuberculosis* complex, y no requiere equipamiento adicional, lo que puede suponer una alternativa de detección directa de *M. tuberculosis* complex en laboratorios con menos recursos económicos. Por el contrario, la desventaja que se observó en este estudio fue una mayor manipulación metodológica que conllevó un mayor riesgo de contaminación cruzada durante la realización del ensayo, por lo que se precisa de personal cualificado y entrenado en técnicas de biología molecular y un seguimiento riguroso de los protocolos requeridos para la realización de esta técnica.





# Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples by a Molecular Method Based on GenoQuick Technology

Raquel Moure,<sup>a</sup> Miriam Torres,<sup>a</sup> Rogelio Martín,<sup>a,b</sup> and Fernando Alcaide<sup>a,b</sup>

Department of Microbiology, IDIBELL-Bellvitge Hospital, Feixa Llarga s/n, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain,<sup>a</sup> and Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain<sup>b</sup>

**Several molecular systems for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) have recently been developed. The GenoQuick MTB assay (GQ-MTB) used in this study detected 82 of the 96 (85.4%) samples with MTBC, including 50 of 64 (78.1%) samples with negative acid-fast bacillus smears. Fifteen samples containing nontuberculous mycobacteria were also studied: 13 were GQ-MTB negative, one was positive, and one was indeterminate. GQ-MTB showed good effectiveness for the direct detection of MTBC from clinical samples.**

Tuberculosis (TB) is still a major health problem worldwide, with almost 9 million new cases and around 1.4 million deaths each year (21). One of the principles of tuberculosis control is rapid and accurate diagnosis of the disease in order to allow prompt initiation of antimicrobial therapy and to prevent transmission.

Although the conventional procedures are irreplaceable diagnostic tools, the poor sensitivity of acid-fast bacillus detection by microscopy and the slow growth of the tubercle bacillus in culture media limit the usefulness of these methods for rapid diagnosis of TB. Two important concerns complicate the issue further: (i) infection with HIV has changed the clinical presentation of tuberculosis and reduced the sensitivity of classical microbiology methods (7, 9, 12) and (ii) almost one-fifth of bacillus transmission is due to smear-negative pulmonary cases (1). Therefore, other accurate and rapid techniques are needed for early diagnosis of active TB (13, 18).

In recent years, many direct detection methodologies have emerged as potentially useful tools for rapid diagnosis of TB, most of them based on nucleic acid amplification (3, 4, 8, 11, 14–16). Recommendations and guidelines for their use have recently been updated (5).

A new molecular assay called GenoQuick (Hain Lifescience, Nehren, Germany) has demonstrated its usefulness for the identification of other microorganisms (6, 17), and it has recently been adapted for the rapid diagnosis of TB (GQ-MTB) (20).

The aim of the present study was to analyze the performance of GQ-MTB for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) in clinical specimens, mainly respiratory smear-negative samples with MTBC-positive cultures.

One hundred eleven clinical samples (one per patient), collected over an 8-year period, were retrospectively studied: 96 samples had MTBC-positive cultures (64 smear-negative and 32 smear-positive specimens), and 15 samples had isolates of nontuberculous mycobacteria (NTM) (three had *Mycobacterium avium*, three had *Mycobacterium fortuitum*, two had *Mycobacterium goodii*, two had *Mycobacterium intracellulare*, two had *Mycobacterium kansasii*, one had *Mycobacterium genavense*, one had *Mycobacterium mucogenicum*, and one had *Mycobacterium peregrinum*).

Nonsterile clinical samples were pretreated according to the conventional *N*-acetyl-L-cysteine-NaOH digestion-decontamination procedure. The pellet was resuspended in 2 ml phosphate

buffer. Subsequently, 1 ml of these samples was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and the remaining volume was used to perform the following tests: (i) microscopic examination for acid-fast organisms (auramine-rhodamine and Ziehl-Neelsen stains) and (ii) mycobacterial culture using Lowenstein-Jensen and Bactec MGIT 960 (Becton, Dickinson, Towson, MD) as solid and liquid media, respectively. Mycobacterial identification was performed by DNA probes (Accuprobe; Gen-Probe Inc., San Diego, CA), GenoType Mycobacterium CM/AS and MTBC (Hain Lifescience), PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the *hsp65* gene (19), or 16S sequencing. One-half milliliter of the frozen samples was used for the GQ-MTB assay. This test was performed and interpreted according to the manufacturer's recommendations by using the reagents supplied in the GQ-MTB kit. Briefly, DNA was extracted with the GenoLyse (Hain Lifescience) method in three steps (30 min). Afterwards, nucleic acids were selectively amplified (IS6110) in an amplification reaction (PCR) tube. Then, also during the thermocycling, the single-stranded amplicon hybridized with a specific MTBC probe included in the primer-nucleotide mix. This complex then bound selectively to the test band on the dipstick and was visualized by gold labeling. Internal control for amplification (consisting of a specific pair of primers and a specific probe to amplify and detect an artificial DNA fragment, which ensures the correct performance of the PCR) and conjugation (to ensure the correct migration of gold particles) is included in the dipstick. The limit of detection of the GQ-MTB technique, according to the manufacturer's internal clinical validation, is 500 to 1,000 bacteria/ml.

In 2.5 to 3 h, the GQ-MTB assay detected 82 of the 96 (85.4%; 95% confidence interval [95% CI], 76.4 to 91.5%) MTBC culture-positive samples studied: 100% (32/32) of smear-positive specimens and 78.1% (50/64; 95% CI, 65.7 to 87.1%) of smear-negative specimens (Table 1). This represents an excellent overall effectiveness with a notably high level of sensitivity, comparable to that

Received 1 March 2012 Accepted 4 March 2012

Published ahead of print 14 March 2012

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

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00567-12

**TABLE 1** GQ-MTB results according to source and smear microscopy of the specimens<sup>a</sup>

Sample type	No. of samples							
	MTBC culture positive				NTM <sup>b</sup> culture positive			
	GQ-MTB positive		GQ-MTB negative		GQ-MTB positive		GQ-MTB negative	
	S-P	S-N	S-P	S-N	S-P	S-N	S-P	S-N
Sputum	25	46	0	11	1	0	8	2
Bronchial aspirate	3	2	0	1	0	0	0	0
Gastric aspirate	3	1	0	1	0	0	0	0
Urine	1	1	0	1	0	0	0	1
Other nonrespiratory <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	2	0
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>3</b>

<sup>a</sup> Abbreviations: MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; GQ-MTB, GenoQuick MTB; S-P, smear-positive specimens; S-N, smear-negative specimens.

<sup>b</sup> One smear-positive urine sample with a positive culture of *M. goodii* showed an invalid GenoQuick MTB result, not included for calculation of specificity.

<sup>c</sup> One skin abscess and one colon biopsy.

achieved with other molecular methods for direct detection (3, 4, 8, 11, 14–16). Regarding the source of the MTBC specimens analyzed, only eight were nonrespiratory; four had a negative acid-fast bacillus stain. The GQ-MTB detected six of them (four smear-positive and two smear-negative samples).

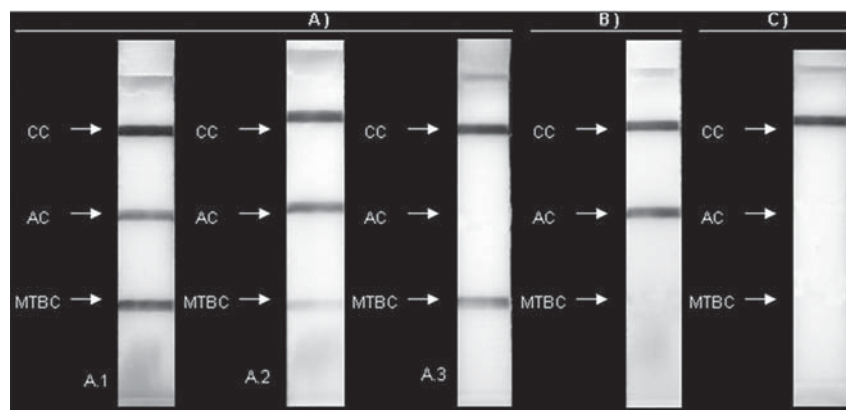
In the analysis of the 15 specimens with NTM (11 respiratory specimens, two urine specimens, one abscess specimen, and one colon biopsy specimen), the assay showed a negative result in 13 samples, including smear-positive specimens ( $n = 10$ ) with a high bacterial load. As the target for detection of MTBC in the GQ-MTB is IS6110, which is highly specific for MTBC, the risk of false positivity when samples contain NTM is extremely low. Nevertheless, one respiratory smear-positive sample with *M. fortuitum* showed a triple-band pattern in the strip, corresponding to a positive MTBC detection. A further analysis confirmed that the strain was *M. fortuitum*, showing a significant DNA homology with IS6110, a previously reported but rare event (2, 10) which, theoretically, does not compromise the general specificity of the technique. Finally, another sample (*M. goodii*, in one smear-posi-

tive urine sample) showed an indeterminate result, since there was no colorimetric band either in the position of MTBC or in the position of the amplification control in the strip. These results in NTM samples represented an overall specificity of 92.9% (95% CI, 64.2 to 99.6%) (Table 1 and Fig. 1).

Since the study was retrospective and the samples had been stored frozen (for several years in most cases), the possible impact of long-term storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  on the system's detection ability was also evaluated. MTBC culture-positive but smear-negative samples were analyzed in two groups: (i) samples extracted and frozen in 2002, 2003, and 2004 (between 6 and 8 years of  $-80^{\circ}\text{C}$  storage;  $n = 42$ ), which showed a sensitivity of 76.2% (95% CI, 60.2 to 87.4%), and (ii) samples extracted and frozen in 2008 and 2009 (1 or 2 years of  $-80^{\circ}\text{C}$  storage;  $n = 22$ ), which had an overall sensitivity of 81.8% (95% CI, 59 to 94%). The difference in sensitivity between these two groups was not statistically significant, evidencing the lack of impact of freezing on the GQ-MTB's capacity for detecting MTBC and therefore emphasizing the robustness of the technique.

The mycobacterial load present in the samples was estimated in order to establish a relation with the GQ-MTB result. To do so, the times to growth in both liquid and solid media were analyzed as a surrogate of the inoculum sizes. The specimens with a positive smear showed positive cultures significantly earlier than did the negative ones in the liquid culture, with a median time to growth of 10 versus 19.5 days ( $P < 0.001$ ). In the solid medium, there was also a difference between the two groups (17.5 versus 21 days), though it was not statistically significant.

Among the smear-negative samples presenting a positive MTBC culture in either liquid or solid medium, the correlation of GQ-MTB-positive/negative result with the median time to growth was also studied. Samples with a positive GQ-MTB result growing in liquid medium ( $n = 45$ ) required a median of 18 days to growth, compared with 22 days for GQ-MTB-negative samples with a positive growth in liquid culture ( $n = 13$ ). Similar differences were found when analyzing the mycobacterial inoculum size according to the samples growing in solid medium: 20.5 and 26 days for GQ-MTB-positive ( $n = 38$ ) and GQ-MTB-negative samples ( $n = 7$ ), respectively. Despite the trend observed, the differences were not statistically significant.



**FIG 1** Images of the results obtained with the GQ-MTB technique. MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; AC, amplification control; CC, conjugate control. (A) Positive result. Three different possibilities were obtained: all bands were well marked (A.1), the MTBC band was present though faded (A.2), and the amplification control band was absent but the MTBC band was present (A.3). (B) Negative result (MTBC band completely missing). (C) Invalid result (both amplification control and MTBC bands were missing).

From the technical point of view, GQ-MTB is easy to perform and does not require additional equipment, apart from a centrifuge, a water bath, and a thermal cycler. In addition, since the hybridization occurs within the amplification tube and the colorimetric detection is performed in a lateral-flow dipstick, the system requires considerably less time and effort than do traditional hybridization techniques. In addition, the basis and design of this technique do not limit the number of tests that can be performed at any one time.

In our experience, the weakest point of the GQ-MTB in its present design is the risk of cross-contamination, due to the manual process of extraction and application of the dipstick in the reaction mixture. Nevertheless, this risk is minimal if current protocols for good practices in molecular biology are rigorously followed. In addition, a new system for automated extraction (GenoXtract; Hain Lifescience) has recently been launched and is currently available for this assay, which may reduce the cross-contamination risk.

To summarize, the GQ-MTB appears to be a good method for direct detection of MTBC in clinical samples, even in smear-negative ones, since it is rapid, low cost, and labor saving. However, since it is a molecular system, it must be performed by trained staff, and strict protocols for molecular biology must be observed.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). R. Moure received a grant from the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

We are grateful to Hain Lifescience for providing us with the GenoQuick MTB reagents. We thank J. Parés, E. A. Struzka, and E. Cuenca for their technical assistance.

#### REFERENCES

- Behr MA, et al. 1999. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 353:444–449.
- Bhanu NV, van Soolingen D, van Embden JD, Seth P. 2004. Two *Mycobacterium fortuitum* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in Delhi harbour IS6110 homologue. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:107–110.
- Boehme CC, et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 363:1005–1015.
- Boehme CC, et al. 2011. 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* 377:1495–1505.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58:7–10.
- Cohen-Bacrie S, Bertin F, Gassiot AS, Prere MF. 2010. Rapid molecular genetic assay for direct identification of *Bordetella* from patients specimens. *Pathol. Biol.* 58:52–54.
- Colebunders R, Bastian I. 2000. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4:97–107.
- D'Amato RF, Miller A. 1998. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *Methods Mol. Biol.* 92:203–214.
- Fitzgerald DW, Sterling TR, Hass DW. 2010. *Mycobacterium tuberculosis*, p 3129–3163. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 7th ed, vol 2. Churchill Livingstone, New York, NY.
- Kent L, McHugh TD, Billington O, Dale JW, Gillespie SH. 1995. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. *J. Clin. Microbiol.* 33:2290–2293.
- Kiraz N, Saglik I, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. 2010. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *J. Med. Microbiol.* 59:930–934.
- Long R. 2001. Smear-negative pulmonary tuberculosis in industrialized countries. *Chest* 120:330–334.
- Moore DF, Guzman JA, Mikhail LT. 2005. Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis by routine use of a nucleic acid amplification test. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 52:247–254.
- Moure R, et al. 2011. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 49:1137–1139.
- Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. 1988. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 26:2120–2123.
- Neonakis IK, et al. 2009. Evaluation of GenoType mycobacteria direct assay in comparison with Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and GenoType MTBDRplus for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 47:2601–2603.
- Sherlock O, Dolan A, Humphreys H. 2010. MRSA screening: can one swab be used for both culture and rapid testing? An evaluation of chromogenic culture and subsequent Hain GenoQuick PCR amplification/detection. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:955–959.
- Taegtmeier M, et al. 2008. The clinical impact of nucleic acid amplification tests on the diagnosis and management of tuberculosis in a British hospital. *Thorax* 63:317–321.
- Telenti A, et al. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175–178.
- Weizenegger M. 2010. Lateral flow PCR-dipstick for fast and sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from pulmonary and extrapulmonary specimens, PP-59, p 151. *Abstr. 31st Annu. Congr. Eur. Soc. Mycobacteriol.*, Bled, Slovenia.
- World Health Organization. 2011. *Global tuberculosis control: 2011 report*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.



## **Bloque 2**

**Detección rápida de la resistencia a los fármacos antituberculosos  
mediante *microarrays* de ADN de baja densidad**



**Artículo 5****Detection of streptomycin and quinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a low-density DNA array**

Raquel Moure<sup>a</sup>, Griselda Tudó<sup>b</sup>, Rebeca Medina<sup>c</sup>, Eva Vicente<sup>d</sup>, José María Caldito<sup>a</sup>, Maria Gemma Codina<sup>e</sup>, Pere Coll<sup>c</sup>, Montserrat Español<sup>c</sup>, Julian Gonzalez-Martin<sup>b</sup>, Emma Rey-Jurado<sup>b</sup>, Margarita Salvadó<sup>d</sup>, Maria Teresa Tórtola<sup>e</sup>, Fernando Alcaide<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Servei de Microbiologia, CDB, Hospital Clínic de Barcelona-Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), UB, Barcelona, Spain; <sup>c</sup>Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; <sup>d</sup>Laboratori de Referència de Catalunya, Barcelona, Spain; <sup>e</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, UAB, Barcelona, Spain.

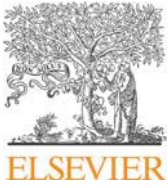
Tuberculosis (Edinb), 2013 Sep;93(5):508-514

En los casos de tuberculosis multirresistente, se debe recurrir a los fármacos tradicionalmente denominados de segunda línea como inyectables y fluoroquinolonas. En este estudio se diseñó un *microarray* de ADN para la detección rápida de las mutaciones más comúnmente relacionadas con la resistencia a la estreptomycina y las fluoroquinolonas. El *array* incluyó 25 sondas con las dianas más relevantes de la literatura: región 530 del gen *rrs* y gen *rpsL* (estreptomycina) y gen *gyrA* (fluoroquinolonas). También se incluyó la región 1400 del gen *rrs* para la detección potencial de resistencia a los antituberculosos inyectables de segunda línea. Mediante este *array*, se analizaron 108 cepas resistentes a la estreptomycina y/o la ofloxacina, y 20 cepas sensibles a ambos fármacos. Las 4 dianas incluidas en el *array* fueron también analizadas mediante secuenciación. La correlación total entre el *array* y la secuenciación se observó en el 82,4% de las cepas. El *array* ofreció una buena sensibilidad de detección de mutaciones, respecto a la secuenciación: 92,5% en el caso de la estreptomycina y 87,5% en el caso de las fluoroquinolonas. La mayor limitación que se detectó fue en referencia al gen *gyrA*, donde la proximidad entre un codón polimórfico (codón 95) respecto a una posición relacionada con la resistencia (codón 94) originó hibridación cruzada en algunos casos.

Sin embargo, el sistema presentó múltiples e importantes virtudes; a parte de la buena sensibilidad en la detección de mutaciones, el resultado se puede obtener en un día de trabajo, ofrece la flexibilidad de inclusión de más o diferentes dianas a las incluidas en el presente estudio, y el coste económico es bajo. Por tanto, el prototipo presentado en este estudio podría ser considerado como un primer paso hacia la consecución de un *array* definitivo para la detección de mutaciones relacionadas con la tuberculosis extremadamente resistente.

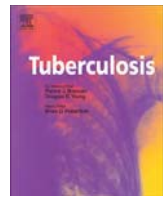






Contents lists available at ScienceDirect

## Tuberculosis

journal homepage: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/tube>

## DIAGNOSTICS

Detection of streptomycin and quinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a low-density DNA array

Raquel Moure<sup>a</sup>, Griselda Tudó<sup>b</sup>, Rebeca Medina<sup>c</sup>, Eva Vicente<sup>d</sup>, José María Caldito<sup>a</sup>,  
 Maria Gemma Codina<sup>e</sup>, Pere Coll<sup>c</sup>, Montserrat Español<sup>c</sup>, Julian Gonzalez-Martin<sup>b</sup>,  
 Emma Rey-Jurado<sup>b</sup>, Margarita Salvadó<sup>d</sup>, Maria Teresa Tórtola<sup>e</sup>, Fernando Alcaide<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Servei de Microbiologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Servei de Microbiologia, CDB, Hospital Clínic de Barcelona-Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), UB, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Laboratori de Referència de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, UAB, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 March 2013

Received in revised form

11 June 2013

Accepted 8 July 2013

## Keywords:

*Mycobacterium tuberculosis*

LD-SQ array

Drug resistance

Streptomycin

Fluoroquinolones

## SUMMARY

In cases of multidrug-resistant tuberculosis, it is crucial to rule out resistance to second-line antituberculous (anti-TB) agents. In the present study, a low-cost low-density DNA array including four genetic regions (*rrs* 530 loop, *rrs* 1400, *rpsL* and *gyrA*) was designed for the rapid detection of the most important mutations related to anti-TB injectable drugs (mainly streptomycin) and fluoroquinolone resistance (LD-SQ array). A total of 108 streptomycin- and/or ofloxacin-resistant and 20 streptomycin- and ofloxacin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates were analysed with the array. The results obtained were compared with sequencing data and phenotypic susceptibility pattern. The LD-SQ array offered a good sensitivity compared to sequencing, especially among resistant strains: 92.5% (37/40) for streptomycin and 87.5% (7/8) for fluoroquinolones. Therefore, this array could be considered a good approach for the rapid detection of mutations related to streptomycin and fluoroquinolone resistance. On the other hand, there were discordant results in 16 resistant strains and six susceptible isolates, mostly concerning the *gyrA* region, in which the existence of polymorphisms next to informative positions might cause cross-hybridization. These discrepancies were caused by some technical limitations; consequently, the present array should be considered as a first-step prior to a forthcoming optimized version of the array.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) remains one of the biggest health threats to human beings. In its latest report the WHO estimated an incidence of almost 9 million cases worldwide and around 1.5 million deaths in 2011 [1].

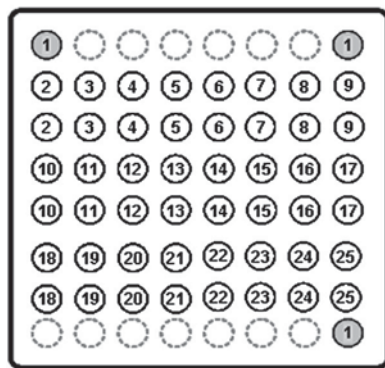
Two cornerstones of programmes designed to control TB are rapid diagnosis of the disease and prompt initiation of treatment against *Mycobacterium tuberculosis*. Nowadays this treatment normally comprises four antituberculous (anti-TB) drugs: rifampin, isoniazid, ethambutol and pyrazinamide (the main anti-TB agents)

[2]. However, the appearance of strains resistant to these agents has become a matter of critical relevance. The WHO estimated that in 2008, 440 000 new cases of TB were caused by multidrug-resistant (MDR) isolates (resistant to at least rifampin and isoniazid). Moreover, almost 25 000 of these cases were extensively drug-resistant (XDR) strains, which means that these *M. tuberculosis* isolates were also resistant to any of the fluoroquinolones and any of the second-line anti-TB injectable drugs [3].

In cases of MDR strains the main anti-TB drugs are ineffective. It is therefore essential that susceptibility to other drugs, such as aminoglycosides and fluoroquinolones, is rapidly determined. Streptomycin belongs to the group of aminoglycosides and has been demonstrated to be useful against MDR strains of *M. tuberculosis*. This antimicrobial agent acts on the ribosome and causes misreading of the genetic code, inhibition of the initiation of mRNA translation and aberrant proof-reading [4,5]. More recently,

\* Corresponding author. Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona, C/Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel.: +34 932607930; fax: +34 932607547.

E-mail address: [falcaide@bellvitgehospital.cat](mailto:falcaide@bellvitgehospital.cat) (F. Alcaide).



No. of Probe	Probe specificity	Genotype	Target
1	Hyb-Control		
2	Nt 509-525	wt	<i>rrs</i> 530
3	Nt 1394-1412	wt	<i>rrs</i> 1400
4	Nt 1473-1492	wt	<i>rrs</i> 1400
5	AA 40-46	wt	<i>rpsL</i>
6	AA 86-90	wt	<i>rpsL</i>
7	AA 88-92	wt	<i>gyrA</i>
8	AA 88-93 (88TGC)	wt	<i>gyrA</i>
9	AA 91-96	wt	<i>gyrA</i>
10	AA 92-97 (95ACC)	wt	<i>gyrA</i>
11	513-C	Mut	<i>rrs</i> 530
12	513-T	Mut	<i>rrs</i> 530
13	516-T	Mut	<i>rrs</i> 530
14	1401-G + 1402-T	Mut	<i>rrs</i> 1400
15	1484-T	Mut	<i>rrs</i> 1400
16	43AGG	Mut	<i>rpsL</i>
17	88CAG	Mut	<i>rpsL</i>
18	88AGG	Mut	<i>rpsL</i>
19	88ACG	Mut	<i>rpsL</i>
20	90GTG	Mut	<i>gyrA</i>
21	91CCG	Mut	<i>gyrA</i>
22	94AAC	Mut	<i>gyrA</i>
23	94CAC	Mut	<i>gyrA</i>
24	94GGC	Mut	<i>gyrA</i>
25	94GGC (+ 95 ACC)	Mut	<i>gyrA</i>

Figure 1. Diagram of the LD-SQ array. Footnote: Hyb, hybridization; Nt, nucleotide; wt, wild-type; AA, amino acid; Mut, mutation.

several fluoroquinolones have also been demonstrated to be effective against TB [6,7], due to their ability to inhibit DNA gyrase.

However, mutations in certain genes confer resistance to these antibiotics. Resistance to streptomycin is mainly associated with mutations in the *rpsL* and *rrs* genes, which encode the ribosomal proteins S12 and 16S rRNA, respectively. Mutations in these genes are commonly found on codons 43 and 88 in *rpsL* (related to high levels of resistance) and in the 530 loop and 912 region in *rrs* (intermediate levels of resistance) [5,8,9]. Our group recently published a molecular analysis of the streptomycin resistance mechanism in *M. tuberculosis* isolates in Barcelona, showing that 38% of the streptomycin-resistant strains presented a mutation in either the *rpsL* gene or the *rrs* 530 loop [10]. However, there are some strains without mutations in either of these genes that still present low levels of streptomycin resistance, possibly due to the existence of mutations in secondary targets such as *gidB* [11], or to another mechanism [12]. As regards fluoroquinolone resistance, several studies report that this is related to mutations in a conserved region of *gyrA* [13,14], with codons 90 and 94 being the most frequently mutated positions. Some other substitutions in *gyrA* (codons 88 and 95) have been described as polymorphisms not related to phenotypic resistance [13,15].

In recent years, microarrays based on PCR and further hybridization with immobilized oligonucleotide probes, have emerged as a valuable tool for the detection of mutations associated with drug-resistant TB [16–20]. The aim of the present study was to analyse the accuracy of a new in-house-designed, low-cost, low-density array for the rapid detection of mutations related to streptomycin and fluoroquinolone resistance (LD-SQ array), this being done by comparing its results with DNA sequencing in clinical isolates of *M. tuberculosis*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms and drug susceptibility testing

A total of 128 *M. tuberculosis* clinical isolates, collected from 1995 to 2010, were studied. Of these, 106 strains were resistant to streptomycin, among which 14 were also ofloxacin-resistant, two were streptomycin-susceptible and resistant to ofloxacin, and 20 were susceptible to both drugs. Drug susceptibility testing was performed using the BACTEC 460 system (Becton–Dickinson, MD, USA) for isolates collected between 1995 and 2009, and the MGIT 960 system (Becton–Dickinson) for those collected during the period 2009–2010. Critical concentrations used were 2 mg/L (BACTEC 460) or 1 mg/L (MGIT 960) for streptomycin, and 2 mg/L for ofloxacin.

### 2.2. LD-SQ array design

The LD-SQ array used in this study consisted of a transparent polymer support (50 × 50 mm) containing eight identical separated fields (eight samples). In these fields there were 24 different capture probes spotted as duplicates. They were tagged at their 5' end and ranged from 15 to 21 nucleotides. The design of the array was developed in-house (by the Mycobacteria Study Group in Barcelona), including targets and mutations most frequently described in the literature, and the prototype was manufactured by Chipron GmbH (Berlin, Germany). The probes for the detection of streptomycin resistance covered two regions: the 530 loop of the *rrs* gene (including positions 513 and 516), and the *rpsL* gene (including codons 43 and 88). In addition to the targets for streptomycin resistance detection, the nucleotides 1401–1402 and 1484

**Table 1**  
LD-SQ array primer sequences.

Target (size of amplicon)	Sequence (5'–3')
<i>rrs</i> 530 (238 bp)	GATGACGGCCTTCGGGTGT BIO-TCTAGTCTGCCGTATCGCC
<i>rrs</i> 1400 (277 bp)	CGACCCCGTGAAGTCGGAG BIO-GAACCCTCACGGCCTACG
<i>rpsL</i> (258 bp)	GCAGCGTCGTGTTGATGCAC BIO-CGTGCCTGTTGCGGTTCTTG
<i>gyrA</i> (160 bp)	GACCGACGCCACGCAAG BIO-CTGGCGAGCCGAAGTTGC

of the *rrs* gene were also included to enable the detection of the most important mutations related with resistance to the three second-line anti-TB injectable drugs (amikacin, kanamycin and capreomycin) [21,22]. The probes for the detection of fluoroquinolone resistance covered codons 90, 91 and 94 of the *gyrA* gene, also with duplicates including polymorphisms in codons 88 and 95. Additionally, a control probe (fungal origin) was spotted in three angles of the array in order to ensure the correct hybridization process (Figure 1).

### 2.3. Amplification and hybridization in the array

Genomic DNA from *M. tuberculosis* clinical isolates was extracted using the InstaGene Matrix reagent (BioRad, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's instruction. DNA amplification consisted of two duplex PCRs: A) *rpsL* fragment and *rrs* 530 region; and B) *rrs* 1400 region and *gyrA* fragment. Each reaction mixture comprised 12.5 µl of HotStarTaq Mastermix Kit (QiaGen, Venlo, Netherlands), 1 µl of the biotinylated primer mix provided by the LD-SQ array kit (Table 1), 5.5 µl of sterile deionized water and 5 µl of

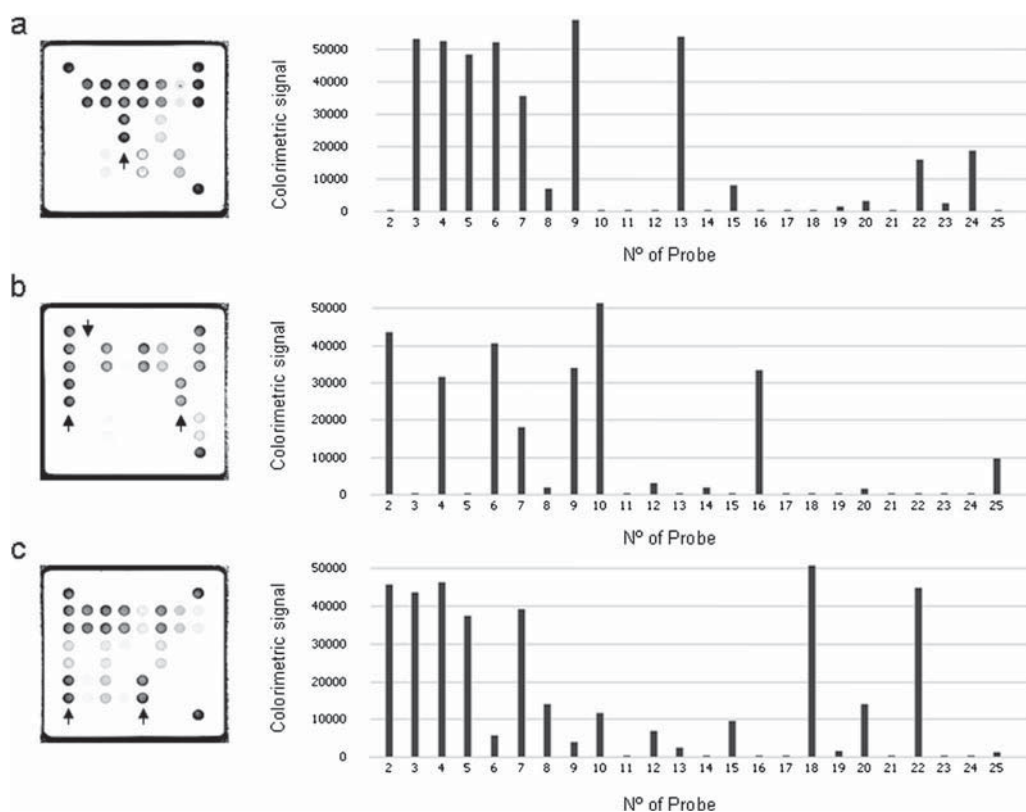
the extracted DNA. Thermal cycling conditions, for both multiplex PCR reactions, were as follows: 15 min at 95 °C; 45 cycles of 25 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C; and 3 min of final elongation. After amplification, both amplicons were mixed together with a hybridization buffer and applied to the array (incubation for 45 min at 35 °C). Subsequently, the LD-SQ array was washed in a low-salt buffer and labelled with a streptavidin-horseradish peroxidase solution for 5 min at room temperature. Finally, after a second washing step, the array was incubated in a stain solution at room temperature for 3–5 min, until the precipitation of a dark substrate in the spots was clearly visible by the human eye. A scanner device (PrimeFilm 2700, Pacific Image Electronics Co., Ltd., Taiwan) and a software package (SlideReader 7, Chipron GmbH) were used to analyse the hybridization pattern. The whole process (DNA amplification and hybridization) took less than 4 h.

### 2.4. DNA sequencing of genes associated with drug resistance

In parallel to the above, strains were sequenced in the four regions analysed, the purpose being to obtain the gold standard with which to compare the results obtained by the LD-SQ array. Primers used for the sequencing of the *rrs* 530 loop, *rpsL* and *gyrA* were as previously described [9,13,23], while primers for the *rrs* 1400 region were *rrs1400for* (5'-CGACCCCGTGAAGTCGGAG-3') and *rrs1400rev* (5-GAACCCTCACGGCCTACG-3').

## 3. Results

The LD-SQ array offered a full, interpretable hybridization image in 103 of 108 (95.4%) streptomycin- and/or ofloxacin-resistant strains, and in 18 of 20 (90%) susceptible isolates (Figure 2), in one working day. Seven strains showed amplification but a non-



**Figure 2.** Examples of mutations in the four targets covered by the LD-SQ array. Footnote: (a) *rrs* 516 C → T, (b) *rrs* 1400 region mutated other than 1401G + 1402T (absence of hybridization in the wild-type probe but also in the probe with specific double mutation 1401G + 1402T, suggesting other substitution in this region), *rpsL* K43R and *gyrA*95 polymorphism, (c) *rpsL* K88R and *gyrA* D94N.

interpretable LD-SQ array image in at least one of the four genetic targets included, due either to a too-intense background signal or a too-low signal for all probes.

Regarding the ability of the array to detect any mutation conferring resistance (among resistant strains in which sequencing showed some substitution), it detected 37 of the 40 (92.5%) mutations found with the sequencing for streptomycin and seven of eight (87.5%) for fluoroquinolones.

Substitutions in the *rrs* 530 region were found in 13 strains, three isolates presented a specific substitution in the *rrs* 1400 fragment, and an additional strain showed absence of hybridization with both the 1401A – 1402C (wild-type) and the mutated 1401G + 1402T probes which indicated the possible existence of a mutation other than double substitution 1401G + 1402T (the sequencing confirmed a mutation only in 1401A → G). Mutations in

*rpsL* were found in 26 streptomycin-resistant clinical isolates. As regards the *gyrA* gene, 17 strains showed mutation, according to the LD-SQ array (Table 2).

Total concordance with the sequencing in streptomycin- and/or ofloxacin-resistant strains was 82.4% (percentage of strains which showed an interpretable and exact LD-SQ array/sequencing correlation in all four targets). Partial correlations (divided by targets) were 95.4% for the *rrs* 530 region, 93.5% for the *rrs* 1400 region, 96.3% for the *rpsL* fragment and 88.9% for *gyrA*.

The LD-SQ array presented discordant results with respect to sequencing in 16 streptomycin- and/or ofloxacin-resistant strains and in six streptomycin- and ofloxacin-susceptible isolates (17.2% of the isolates analysed). These discrepancies were classified as follows: major discordance, meaning that the LD-SQ array detected a mutation and the sequencing revealed a wild-type (or *gyrA*95

**Table 2**  
Mutations detected by the LD-SQ array according to the susceptibility pattern of the strains.

LD-SQ array		Drug resistance pattern					No. of strain
Target	Substitution	H	R	Z	E	Pattern of resistance to SM and/or OF	
<i>rrs</i> 530	513A → T	S	S	S	S	SM-R	193/R
		R	R	R	R	SM-R	209/R
		R	S	S	S	S	04/035
	513A → C	R	S	S	S	SM-R	292/R
		S	S	S	S	SM-R	2447
		R	R	R	S	SM-R	41956
		R	S	S	S	SM-R	134/R
		S	S	S	S	SM-R	98/021
		R	S	R	S	SM-R	293/R
	516C → T	R	R	R	S	SM-R and OF-R	238/R
		R	S	S	S	SM-R	6358
		S	S	S	S	SM-R	6452, 6301822
		R	R	R	R	SM-R	216/R
<i>rrs</i> 1400	1401–1402AC → GT	R	R	R	R	SM-R and OF-R	5734
		R	R	R	R	SM-R	6030000
	1401–1402 other than GT	R	R	R	R	SM-R and OF-R	254/R
<i>rpsL</i>	1484G → T	R	R	R	R	SM-R and OF-R	287/R
		S	S	S	S	SM-R	113/R, 56960/78
	K43R	R	R	S	R	SM-R and OF-R	2485
		R	R	S	S	SM-R and OF-R	1633
		S	S	S	S	SM-R	1800
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	5734
		R	R	S	S	SM-R	4048313
		R	R	R	R	SM-R	82038989
		R	S	S	S	SM-R	88/R
		R	R	R	R	SM-R	5609, 6030000
		S	S	S	S	SM-R	00/79, 09/063
		R	S	S	S	SM-R	10/007
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	254/R
		R	R	S	S	SM-R	270/R
		S	S	S	S	SM-R	277/R
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	310/R
	K88R	S	S	S	S	SM-R	4155766
		R	R	R	S	SM-R and OF-R	3016161
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	5460
		R	R	S	S	SM-R and OF-R	4876037
		R	R	R	S	SM-R	45830
		R	R	R	S	SM-R	5457648
		R	R	R	S	SM-R	291/R
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	5734
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	3755867
		R	R	S	R	SM-R and OF-R	3296745
<i>gyrA</i>	D94N	R	R	R	S	SM-R and OF-R	3016161
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	233/R
	D94H	R	R	R	R	SM-R and OF-R	310/R
		R	R	R	R	SM-R and OF-R	2476
	D94G	R	R	R	S	OF-R	6317
		S	S	S	S	SM-R	04/036, 99/040
		S	S	S	S	SM-R	10/007
		R	S	S	S	S	04/035, 05/067, 06/124
		R	R	R	S	S	08/122
		S	S	S	S	S	07/066, 07/092

H, isoniazid; R, rifampin; Z, pyrazinamide; E, ethambutol; SM, streptomycin; OF, ofloxacin; SM-R, streptomycin-resistant; OF-R, ofloxacin-resistant.

**Table 3**  
Discordant LD-SQ array/sequencing results.

	Relevance	Target	Results		No. of strain	
			Array	Sequencing		
Resistant strains <sup>†</sup>	Major*	<i>rrs</i> 530	wt	513 A → C	82038989, 92066949	
			<i>rrs</i> 1400	wt	1401–1402 AC → GT	293/R
			<i>rpsL</i>	wt	K88R	92099666
		<i>gyrA</i>	K43R	wt	82038989	
			D94G + 95ACC	95ACC (pol)	10/007, 04/036, 99/040	
			wt	D94H	238/R	
	Minor <sup>‡</sup>	<i>rrs</i> 530	D94H	95ACC (pol)	233/R	
			<i>rrs</i> 1400	513 A → C	292/R	
			<i>gyrA</i>	1401 A → G	5734	
		<i>gyrA</i>	wt	95ACC (pol)	088/R, 134/R, 240/R	
			D94H	D94H + 95ACC (pol)	310/R	
			D94G + 95ACC (pol)	A90V + 95ACC (pol)	6317	
Susceptible strains <sup>‡</sup>	Major	<i>gyrA</i>	D94G + 95ACC (pol)	95ACC (pol)	06/124, 07/066, 07/092, 08/122	
			D94G + 95ACC (pol)	wt	04/035	
			D94G	wt	05/067	

wt, wild-type; pol, polymorphism.

\* Major: major discordance, meaning that the LD-SQ array detected a mutation and the sequencing revealed a wild-type (or *gyrA95* polymorphism), or vice versa.

<sup>†</sup> Resistant and susceptible strains to streptomycin and/or ofloxacin.

<sup>‡</sup> Minor: minor discordance, meaning that the specific mutation found by the LD-SQ array differed from the mutation found in the same target by the sequencing, or that the discordance concerned only the *gyrA95* polymorphism.

polymorphism), and minor discordance, meaning that the specific mutation found by the LD-SQ array differed from the mutation found in the same target by the sequencing, or that the discordance concerned only the *gyrA95* polymorphism. There were nine resistant strains (8.3%) which presented a major discordance: four for streptomycin targets (one in *rrs* 530, one in *rpsL*, one in *rrs* 1400 and one with double discordance in *rrs* 530 and *rpsL*), and five for *gyrA* target. Additionally, seven resistant strains (6.5%) showed a minor discordance (of which five involved *gyrA95* polymorphism). All six susceptible strains showing a major discordance in the LD-SQ array, presented a mutation in *gyrA* codon 94 (Table 3).

Table 4 shows sensitivity values (A) versus sequencing (defined as the percentage of mutations found by sequencing which were also detected by the LD-SQ array) and (B) versus phenotypic susceptibility pattern (defined as the percentage of resistant strains showing a mutation according to the LD-SQ array). This table also presents results of specificity (A) versus sequencing (defined as the percentage of wild-type results by sequencing which were also detected as wild-type by the LD-SQ array) and (B) versus phenotypic susceptibility pattern (defined as the percentage of susceptible strains showing a wild-type pattern with the LD-SQ array);

**Table 4**  
Sensitivity, specificity and predictive values of the LD-SQ array.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV <sup>†</sup> (%)	NPV <sup>‡</sup> (%)
	All/Adjusted*	All/Adjusted		
(A) LD-SQ array compared to sequencing results				
<i>rrs</i> 530	86.7/86.7	97/100	100	98
<i>rrs</i> 1400	80.0/80.0	94.6/100	100	99.1
<i>rpsL</i>	96.2/96.2	94.2/98.8	96.2	98.8
<i>gyrA</i>	87.5/87.5	89.5/91.1	41.2	99
(B) LD-SQ array compared to phenotypic results				
Streptomycin	34.9/36.6	86.4/95	97.4	23.2
Ofloxacin	50.0/50.0	82.7/82.7	47.1	84.3

\* Adjusted, excluding the non-interpretable results from the calculation.

<sup>†</sup> PPV, Positive Predictive Value, defined as (A) the percentage of mutations detected by the LD-SQ array that were corroborated by sequencing and (B) the percentage of strains detected as mutated by the LD-SQ array which were drug-resistant.

<sup>‡</sup> NPV, Negative Predictive Value, defined as (A) the percentage of wild-type results obtained by the LD-SQ array that were corroborated by sequencing and (B) the percentage of strains detected as wild-type by the LD-SQ array which were drug-susceptible. Polymorphism in *gyrA95* was considered as a wild-type result.

positive and negative predictive values are also given. It should be mentioned that, when comparing LD-SQ array results with the phenotypic pattern, no differences regarding sensitivity and specificity were found depending on the susceptibility testing method used (BACTEC 460 or MGIT 960 system). Results are shown both taking into account all data (i.e. including non-interpretable results from the LD-SQ array in the ratio) and excluding from the calculation any non-interpretable LD-SQ array results (adjusted results).

#### 4. Discussion

As already stated, the association of streptomycin and fluoroquinolone resistance with mutations in *rrs*, *rpsL* and *gyrA* has been well documented in several recent reports. The LD-SQ array presented in this study showed a good correlation (in all four genetic regions) compared to sequencing results, in streptomycin- and/or ofloxacin-resistant strains. Likewise, specificity and negative predictive values (NPV) were satisfactory.

Although there are other methodologies for the detection of second-line anti-TB drugs, both commercial (e.g. GenoType MTBDRsl, Hain Lifescience, Germany) and in-house [24,25], the design of the LD-SQ array presented here includes the targets related to second-line injectable drugs, quinolones and also streptomycin, with different targets than those included in other tests. Moreover, the cost of the LD-SQ array is low (17 euros per sample, approximately) and the system allows the addition or exchange of the probes, according to the frequency of mutations in each setting.

The weaker correlation of the LD-SQ array with respect to the phenotypic susceptibility pattern supports the existence of targets and a mechanism other than those most frequently described, and which might be relatively present in our area. In the case of streptomycin, the involvement of each of the genetic targets and the resistance mechanism varies depending on the geographical area. Indeed, several studies report high rates of mutations in *rrs* and *rpsL* in streptomycin-resistant strains in China and Japan, medium rates in the USA, and very low rates in Northern India [26–29]. In our setting, a previous characterization study based on sequencing showed that the prevalence of mutations in *rrs* 530 and *rpsL* in streptomycin-resistant clinical isolates was rather low [10]. The results obtained with the LD-SQ array used in the present study are consistent with those results in terms of the prevalence of total

mutations in *rrs* and *rpsL* and the frequency of each possible variation. Therefore, the intrinsically low prevalence of *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant strains in our area would explain the lower correlation observed between the LD-SQ array and streptomycin phenotypic susceptibility. Low NPV of the LD-SQ array compared to the phenotypic susceptibility pattern is partially explained also by this lower prevalence of mutations in streptomycin-resistant strains.

Regarding fluoroquinolones, the LD-SQ array detected *gyrA* mutations in half of the ofloxacin-resistant strains studied, in agreement with the percentage of *gyrA* mutations found by sequencing. These results are fairly consistent with the available data from recent studies [30]. The percentage of remaining clinical isolates which did not show the most frequently reported *gyrA* mutations may be explained by new targets involved in resistance to fluoroquinolones, as recently proposed [31].

Even though the present study was aimed to evaluate the capacity of the LD-SQ array to detect mutations related to streptomycin and fluoroquinolone resistance, the inclusion of region *rrs* 1400 in the design of the LD-SQ array (in order to carry out further studies on second-line drugs), allowed detection of the main mutations in 80% of the cases where sequencing showed a substitution in this region. Nevertheless, the relevance of these data at present is limited due to the low number of cases found presenting mutations in *rrs* 1400 and, furthermore, to the lack of phenotypic data of susceptibility to these drugs.

Regarding the discordances between the LD-SQ array and the sequencing data (17.2% of strains), streptomycin seems to be less compromised (only 2.3% of strains presented a major discordance with the sequencing in *rrs* or *rpsL* targets, versus 8.6% in *gyrA*) (Table 3). In cases of minor relevance, the discordance would not play a relevant role in predicting the phenotypic susceptibility pattern of *M. tuberculosis* clinical isolates.

The main limitation of performance of this LD-SQ array for the rapid detection of the main mutations related to streptomycin and fluoroquinolone resistance concerns the cross-hybridization with the probes containing codon 95 of *gyrA*. In order to ensure the detection of a possible mutation in the resistance-related position 94, and due to the fact that polymorphic position 95 is next to this codon, the design of the array included two *gyrA*94 wild-type probes (with and without the polymorphism in *gyrA*95) and two probes for the most frequently reported substitution, Asp-94 → Gly (with and without the polymorphism in *gyrA*95). Although the criterion for establishing the result for these positions was to determine which of these four probes had the highest colorimetric value, the cross-hybridization found accounts for the misinterpretation of results in some cases (mostly false Asp-94 → Gly mutations) and, therefore, the low positive predictive values obtained for fluoroquinolones. Since this is an intrinsic aspect (proximity between an informative codon and a polymorphic uninformative locus) any system based on probe-hybridization might show this limitation. In order to try to improve this deficiency in a forthcoming version of this array system, new and more precise cut-offs values might be established, so that the algorithms of the software could better discriminate, especially among *gyrA* probes.

In summary, the results of correlation between the LD-SQ array and sequencing data (especially among streptomycin and ofloxacin-resistant strains) demonstrate that this array could be a good approach as a rapid molecular test for determining the most frequently described *rrs*, *rpsL* and *gyrA* mutations in *M. tuberculosis* isolates. Besides, this methodology is quite easy to perform and less expensive than other techniques commercially available. Moreover it is flexible enough to enable different or additional targets of interest to be introduced according to the needs of each setting. However, the technical limitations found, resulting in the

misinterpretation of the result in some cases (especially false mutations in *gyrA* in ofloxacin-susceptible strains), encourage pursuing to fill these deficiencies and develop an optimized upgrade version. Therefore, the system presented in this study should be considered as a first-step in developing an array for detection of second-line anti-TB drug resistance.

## Acknowledgements

The present study was carried out in the context of the GEIM (*Grupo de Estudio de Infecciones por Micobacterias*) study group of SEIMC (*Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*).

This work was partially presented at the 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago (Illinois), September 2011 (poster D-712).

**Funding:** This study was funded by Spain's *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS 06/0328) and supported by the *Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III – FEDER*, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

R. Moure received a grant from the *Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge* (IDIBELL).

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control: 2012 report. Geneva, Switzerland: WHO; 2012.
- [2] World Health Organization. Treatment of tuberculosis guidelines. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2010.
- [3] World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 2002–2007. Geneva, Switzerland: WHO; 2008. WHO/HTM/TB/2008.394.
- [4] Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1987;327:389–94.
- [5] Honore N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:238–42.
- [6] Leysen DC, Haemers A, Pattyn SR. Mycobacteria and the new quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1–5.
- [7] Berlin OG, Young LS, Bruckner DA. In-vitro activity of six fluorinated quinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1987;19:611–5.
- [8] Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Bottger EC. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2452–4.
- [9] Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1024–6.
- [10] Tudo G, Rey E, Borrell S, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2341–6.
- [11] Wong SY, Lee JS, Kwak HK, Via LE, Boshoff HI, Barry III CE. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2515–22.
- [12] Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2947–9.
- [13] Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:773–80.
- [14] Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1417–30.
- [15] Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates

- evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:9869–74.
- [16] Fu LM. Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. Tuberculosis (Edinb) 2006;86:134–43.
- [17] Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S, et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect 2005;11:531–9.
- [18] Tang X, Morris SL, Langone JJ, Bockstahler LE. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance. J Microbiol Methods 2005;63:318–30.
- [19] Aragon LM, Navarro F, Heiser V, Garrigo M, Español M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. J Antimicrob Chemother 2006;57:825–31.
- [20] Vernet G, Jay C, Rodrigue M, Troesch A. Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. J Appl Microbiol 2004;96:59–68.
- [21] Sirgel FA, Tait M, Warren RM, et al. Mutations in the *rrs* A1401G gene and phenotypic resistance to amikacin and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. Microb Drug Resist 2012;18:193–7.
- [22] Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:5064–8.
- [23] Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T, et al. Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. Int J Tuberc Lung Dis 2004;8:1032–5.
- [24] Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T. Evaluation of a line probe assay for the rapid detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol 2011;60:184–8.
- [25] Ajbani K, Shetty A, Mehta A, Rodrigues C. Rapid diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis by use of a reverse line blot hybridization assay. J Clin Microbiol 2011;49:2546–51.
- [26] Katsukawa C, Tamaru A, Miyata Y, Abe C, Makino M, Suzuki Y. Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Appl Microbiol 1997;83:634–40.
- [27] Shi R, Zhang J, Li C, Kazumi Y, Sugawara I. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. Microbes Infect 2007;9:1538–44.
- [28] Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:1186–8.
- [29] Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:443–50.
- [30] Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. J Antimicrob Chemother 2012;67:819–31.
- [31] Devasia R, Blackman A, Eden S, et al. High proportion of fluoroquinolone-resistant *M. tuberculosis* isolates with novel gyrase polymorphisms and a *gyrA* region associated with fluoroquinolone susceptibility. J Clin Microbiol 2011;50:1390–6.





**Artículo 6**

**Characterization of the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Barcelona and rapid detection of main mutations related to ethambutol resistance using a low-density DNA array**

Raquel Moure<sup>1</sup>, Montserrat Español<sup>2</sup>, Griselda Tudó<sup>3</sup>, Eva Vicente<sup>4</sup>, Pere Coll<sup>2</sup>, Julian Gonzalez-Martin<sup>3</sup>, Virginie Mick<sup>5</sup>, Margarita Salvadó<sup>4</sup>, Fernando Alcaide<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Servei de Microbiologia, CDB, Hospital Clínic de Barcelona-Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), UB, Barcelona, Spain;; <sup>4</sup>Laboratori de Referència de Catalunya, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Paris-Est University-ANSES, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, aceptado el 14 de octubre de 2013; doi 10.1093/jac/dkt448

El etambutol es un fármaco incluido en el tratamiento estándar de la enfermedad tuberculosa. Tradicionalmente, se ha relacionado la resistencia al etambutol con mutaciones en el operón *embCAB*, especialmente en el gen *embB* y con mayor frecuencia en el codón 306. Otros codones se han asociado también, con menor frecuencia a la resistencia a este fármaco, como el codón 406 y el 497. No obstante, algunos estudios han descrito la presencia de mutaciones en estos codones también en cepas sensibles. En este estudio se plantearon los siguientes objetivos: 1) determinar la frecuencia de las mutaciones en el gen *embB*, en los aislamientos resistentes a etambutol de nuestra área (n=53), 2) determinar la presencia/ausencia de mutaciones en los codones más importantes de *embB*, en una amplia colección de cepas sensibles (n=702), 3) relacionar las mutaciones en el gen *embB* con los niveles de resistencia fenotípica y determinados aspectos epidemiológicos, y 4) diseñar un *microarray* de ADN para la detección rápida de las mutaciones en *embB* más frecuentes en nuestro medio.

Las mutaciones en el codón 306 fueron las más frecuentes (53,7%) seguidas del 406 (26,8%). Se halló una relación significativa entre la presencia de mutaciones en el codón 406 y una CIM igual o superior a 15 µg/ml, así como con la multiresistencia. Ninguno de los aislamientos sensibles al etambutol presentó mutaciones en el codón 306 o 406. Por otro lado, el *microarray* de ADN diseñado, con el que se analizaron las 53 cepas resistentes a etambutol y 5 cepas pansensibles, mostró un 100% de sensibilidad y especificidad. Además, este sistema fue rápido (un día de trabajo), de bajo coste comparado con otras técnicas y con la flexibilidad para incluir más o diferentes dianas a las del presente estudio, en función de las mutaciones más prevalentes en cada área.



## Characterization of the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Barcelona and rapid detection of main mutations related to ethambutol resistance using a low-density DNA array

Raquel Moure<sup>1</sup>, Montserrat Español<sup>2</sup>, Griselda Tudó<sup>3</sup>, Eva Vicente<sup>4</sup>, Pere Coll<sup>2</sup>, Julian Gonzalez-Martin<sup>3</sup>, Virginie Mick<sup>5</sup>, Margarita Salvadó<sup>4</sup> and Fernando Alcaide<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Servei de Microbiologia, CDB, Hospital Clínic de Barcelona-Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain;

<sup>4</sup>Laboratori de Referència de Catalunya, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Paris-Est University-ANSES, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France

\*Corresponding author. Tel: +34-932607930; Fax: +34-932607547; E-mail: falcaide@bellvitgehospital.cat

Received 7 August 2013; returned 1 October 2013; revised 11 October 2013; accepted 14 October 2013

**Objectives:** Ethambutol resistance has mostly been related to mutations in the *embB* gene. The objective of the present study was to characterize the *embB* gene in a collection of ethambutol-resistant and ethambutol-susceptible isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) from Barcelona, and to develop a DNA microarray for the rapid detection of *embB* mutations in our area.

**Methods:** Fifty-three ethambutol-resistant and 702 ethambutol-susceptible isolates of MTBC were sequenced in internal 982–1495 bp fragments of the *embB* gene. In addition, a low-cost, low-density array was designed to include the *embB* codons identified as being most frequently mutated in our area (LD-EMB array).

**Results:** The global prevalence of *embB* mutations found among the ethambutol-resistant isolates was 77.4% (41/53). Substitutions in *embB306* were the most common [53.7% (22/41)], followed by substitutions in *embB406* [26.8% (11/41)]. The presence of mutations in *embB406* was related to higher levels of ethambutol resistance and to multidrug resistance. Among unrelated isolates (from 24-locus MIRU-VNTR genotyping), the percentage of *embB*-mutated isolates was 72.9% (27/37)—59.3% (16/27) in *embB306* and 25.9% (7/27) in *embB406*. None of the ethambutol-susceptible isolates studied showed a mutation in codon 306 or 406. The LD-EMB array showed 100% sensitivity and specificity in identifying the main *embB* substitutions in our area.

**Conclusions:** Mutations at codons 306 and 406 of *embB* have a relevant role in resistance to ethambutol in our area. The LD-EMB array developed in this study would appear to be a good molecular test for rapid detection of ethambutol resistance.

**Keywords:** tuberculosis, antituberculous resistance, molecular diagnosis, microarrays

### Introduction

Ethambutol is a chemotherapeutic agent included in the range of frontline antituberculous (anti-TB) drugs. Current treatment guidelines highlight the role of ethambutol in the standard drug regimen against tuberculosis (TB),<sup>1</sup> especially in cases of confirmed or suspected resistance to other frontline anti-TB drugs such as isoniazid, rifampicin or pyrazinamide. Ethambutol acts by inhibiting arabinosyl transferases encoded by the *embCAB* operon. These enzymes are essential for the synthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan in the cell wall of the *Mycobacterium tuberculosis* complex

(MTBC), and their inhibition leads to an accumulation of free mycolic acids and, ultimately, to cell death.<sup>2,3</sup>

In its last report on anti-TB drug resistance, the WHO reported, for 2008, a global resistance to ethambutol of 2.5% among new cases of TB and 10.3% among previously treated ones.<sup>4</sup> The main mechanism of resistance to ethambutol is the occurrence of chromosomal mutations in the *embCAB* operon, which implies an alteration of the ethambutol target.<sup>5</sup> Nucleotide changes in the ethambutol resistance-determining region (ERDR) of the *embB* gene are found in ~50%–70% of ethambutol-resistant isolates of MTBC and other mycobacterial species.<sup>6</sup> The most frequent mutated position

in the *embB* gene is codon 306 (*embB306*), with reports estimating that 30%–68% of the isolates presenting *embB* mutations have an *embB306* substitution.<sup>7–10</sup> Consequently, this target has recently been included in some commercial molecular systems for detecting ethambutol resistance.<sup>11</sup> Research suggests that *embB306* mutations are also associated with multidrug-resistant (MDR; resistant to at least rifampicin and isoniazid) MTBC,<sup>9,12,13</sup> as well as resistance to other anti-TB drugs.<sup>14</sup>

Mutations in *embB* codons other than 306, such as *embB406* and *embB497*, have also been reported to be related to ethambutol resistance,<sup>15,16</sup> and recent allelic exchange experiments have demonstrated the association between mutations in these codons and decreased *in vitro* susceptibility to ethambutol.<sup>17</sup> However, some studies have also found *embB306* and *embB406* substitutions to be present in ethambutol-susceptible isolates in certain geographical areas,<sup>7,13,14,18–22</sup> thereby questioning the contribution of these mutations to ethambutol resistance, especially when this reaches high levels.

Given the diversity of codons involved in phenotypic resistance to ethambutol, the *embB* targets covered by commercially available molecular techniques<sup>11</sup> would appear to be insufficient. In recent years, microarrays, based on PCR and further hybridization with immobilized oligonucleotide probes, have emerged as a valuable system for detecting mutations associated with drug-resistant TB.<sup>23–26</sup> Hence, a low-density array may be a good tool for the rapid detection of ethambutol resistance in MTBC isolates.

The aims of the present study were as follows: (i) to determine the frequency of occurrence of the most common *embB* mutations in ethambutol-resistant isolates of MTBC recovered in the geographical area of Barcelona, and to clarify whether the most frequent substitutions in *embB* are also present in ethambutol-susceptible isolates; (ii) to correlate relevant *embB* mutations with the level of resistance to ethambutol, with the multidrug resistance pattern, and with epidemiological features such as international migration flows; and (iii) to design, develop and evaluate a low-cost, low-density array for the rapid detection of the main mutations in *embB* (LD-EMB array) that are related to ethambutol resistance in our area.

## Materials and methods

### Bacterial isolates

A total of 755 clinical isolates of MTBC, recovered in the geographical area of Barcelona between April 1994 and August 2010, were included in the study.

Among them, 53 were ethambutol resistant (all the ethambutol-resistant isolates detected during this period), 202 were ethambutol susceptible but resistant to at least one of the other frontline anti-TB drugs (51 were MDR, 64 were monoresistant to either isoniazid or pyrazinamide, and the remainder were resistant to isoniazid plus another first-line anti-TB drug, except for ethambutol and rifampicin) and 500 were pan-susceptible (susceptible to all frontline anti-TB drugs) isolates of MTBC. The 702 ethambutol-susceptible isolates were a representative collection during this studied period, obtained by selecting a set of isolates ranging from 30 to 50 per year. Each of the 755 MTBC isolates corresponded to a single patient presenting either pulmonary or extrapulmonary TB.

### Phenotypic drug susceptibility

All MTBC isolates included in the study were tested for susceptibility against frontline anti-TB drugs using either: (i) the BACTEC 460 radiometric method (Becton Dickinson, Towson, MD, USA), for the period April 1994 to March 2009; or (ii) the MGIT 960 system (Becton Dickinson), for isolates collected during the period April 2009 to August 2010. Tests were conducted at the following concentrations: 0.1 mg/L for isoniazid, 2 mg/L (BACTEC 460) or 1 mg/L (MGIT 960) for rifampicin, 2.5 mg/L (BACTEC 460) or 5 mg/L (MGIT 960) for ethambutol, 2 mg/L (BACTEC 460) or 1 mg/L (MGIT 960) for streptomycin, and 100 mg/L for pyrazinamide. The MTBC isolates resistant to 2.5 mg/L (BACTEC 460) or 5 mg/L (MGIT 960) ethambutol were retested with one of the above methods at 2.5 (BACTEC 460), 5, 7.5, 10, 15 and 20 mg/L (BACTEC 460 and MGIT 960) ethambutol in order to determine the MIC.

### Sequencing of the *embB* gene in ethambutol-resistant and ethambutol-susceptible isolates

An internal fragment (codons 202–699; 1495 bp) of *embB* (Rv3795; 3297 bp; 1098 amino acids) for ethambutol-resistant isolates ( $n=53$ ) was amplified with primers *embBRfor/embBRrev* (Table 1). Afterwards, ethambutol-susceptible isolates ( $n=702$ ) were *embB* internally sequenced in a shorter region (codons 202–528; 982 bp) than that for the ethambutol-resistant isolate analysis, to focus only on the most important codons (306 and 406) using primers *embBRfor/embBSrev* (Table 1). Extraction of DNA from cultures consisted of a thermal disruption.<sup>6</sup> Amplification was carried out in a 50  $\mu$ L volume containing 0.5  $\mu$ L of each primer (25  $\mu$ M), 0.6  $\mu$ L of dNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 25  $\mu$ M each), 10% (v/v) DMSO, 5  $\mu$ L of the template DNA sample and 0.5 U of Taq Gold (Applied Biosystems, Warrington, UK). Thermal cycling reactions consisted of an initial denaturation (12 min at 94°C) followed by 35 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 60°C for *embBRfor/embBRrev* or at 66°C for *embBRfor/embBSrev*) and extension (1 min 30 s at 72°C), with a final extension of 10 min at 72°C. Sequencing reactions were performed

**Table 1.** Sequences of *embB* primers used in the study (sequencing and LD-EMB array)

Name	Sequence (5'–3')	Purpose	Size (bp)
<i>emb-A for</i>	CCTGCTCTGGCATGTCATCGGC	LD-EMB array-fragment A	322
<i>emb-A rev</i>	BIO-CGCGGTCAAGCAAGACCATGGC		
<i>emb-B for</i>	GGATGCCGTTCAACAACGG	LD-EMB array-fragment B	345
<i>emb-B rev</i>	BIO-CGCGAACCCTGGTGCTTC		
<i>embBRrev</i>	GGATCAGCCGCCCTTCGC	EMB-R sequencing	1495
<i>embBRfor</i>	GTCTCGGCGACCATCGAC		
<i>embBSrev</i>	TGAGGTAGTAGTAACGCAGG	EMB-S sequencing	982

EMB-R, ethambutol-resistant; EMB-S, ethambutol-susceptible.

externally (Macrogen, Korea) using *embBRfor* (10 μM), along with reverse primer *embBRrev* (10 μM) for ethambutol-resistant isolates or *embBSrev* (10 μM) for ethambutol-susceptible isolates. The nucleotide sequences obtained were compared with the *embB* wild-type sequence from reference strain H37Rv using the ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium, Australia) software packages.

### Detection of *embB* mutations using the LD-EMB array

The LD-EMB array consisted of a transparent polymer support (50×50 mm) containing eight identical separated fields (eight samples). In these fields, there were 15 different capture probes spotted as duplicates. They were tagged at their 5' end and ranged from 15 to 20 nucleotides. The design and distribution of the targets covered within the array was developed in-house (by the Mycobacteria Study Group in Barcelona), based on the results obtained in the sequencing analysis of ethambutol-resistant isolates included in the present study. In addition, a control probe (fungal origin) was spotted in three corners of the array in order to ensure the correct hybridization process. The prototype of the array was manufactured by Chipron GmbH (Berlin, Germany) (Figure 1).

All 53 ethambutol-resistant isolates, as well as five of the pan-susceptible isolates of MTBC, were analysed using this array. Genomic DNA from the clinical isolates was extracted using the InstaGene Matrix reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Briefly, DNA amplification consisted of a duplex PCR covering codons 287–509. The reaction mixture comprised 12.5 μL of HotStarTaq Plus Mastermix Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands), 2 μL of the biotinylated primer mixture provided by the LD-EMB array kit, 2 μL of DMSO, 4.5 μL of sterile deionized water and 4 μL of the extracted DNA. Thermal cycling conditions were as follows: 5 min at 95°C; 45 cycles of denaturation (30 s at 94°C), annealing (45 s at 61°C) and extension (45 s at 72°C); and 5 min of final elongation at 72°C. The primer sequences and the size of the resulting amplified fragments are shown in Table 1. Afterwards, the PCR product (containing two amplified *embB* fragments) was mixed with a hybridization buffer and applied to the array (incubation for 35 min at 36°C). The

LD-EMB array was then washed in a low-salt buffer and labelled with a streptavidin-horseradish peroxidase solution for 5 min at room temperature. Finally, after a second washing step, the array was incubated in a stain solution at room temperature for 3–5 min, until the precipitation of a dark substrate in the spots was clearly visible to the human eye. The resulting hybridization pattern was digitized (PrimeFilm 2700, Pacific Image Electronics Co., Ltd, Taiwan) and analysed using a software package (SlideReader 7, Chipron GmbH). The whole process (DNA amplification and hybridization) took <4 h.

### Genotyping

The ethambutol-resistant isolates were analysed by 24-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) genotyping, as previously described,<sup>27</sup> in order to assess for possible epidemiological linkage among isolates.

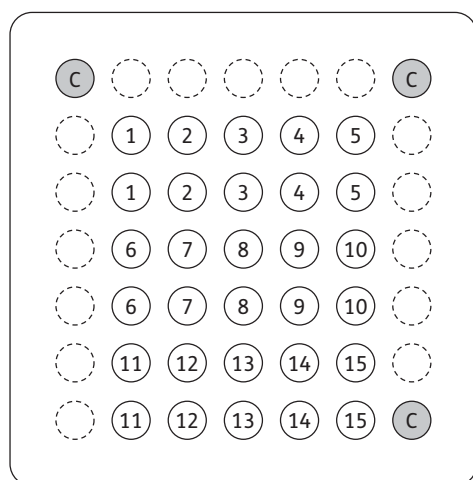
### Statistical analysis

The two groups of isolates containing the most important mutations were compared with regard to different features. To this end, two statistical variables were created: *embB306 present/not present*, and *embB406 present/not present*. Qualitative comparisons were performed in SPSS, using either the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test, as appropriate. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

### Results

#### Characterization of the *embB* region in ethambutol-resistant and ethambutol-susceptible isolates

Among the 53 ethambutol-resistant isolates, 41 (77.4%) presented at least one amino acid substitution in the sequenced



No. of probe	Probe specificity	Genotype	Target
C	Hyb-Control		
1	Nt 906-923 (AA 303-307)	wt	<i>embB306</i>
2	Nt 972-988 (AA 325-329)	wt	<i>embB328</i>
3	Nt 1126-1141 (AA 376-380)	wt	<i>embB378</i>
4	Nt 1207-1225 (AA 403-408)	wt	<i>embB406</i>
5	Nt 1480-1494 (AA 494-498)	wt	<i>embB497</i>
6	AA 303-307 (306 ATC)	Mut	<i>embB306</i>
7	AA 303-307 (306 GTG)	Mut	<i>embB306</i>
8	AA 304-309 (306 ATA)	Mut	<i>embB306</i>
9	AA 304-309 (306 ATT)	Mut	<i>embB306</i>
10	AA 304-308 (306 TTG)	Mut	<i>embB306</i>
11	AA 403-408 (406 TGC)	Mut	<i>embB406</i>
12	AA 403-409 (406 GCC)	Mut	<i>embB406</i>
13	AA 403-408 (406 AGC)	Mut	<i>embB406</i>
14	AA 403-408 (406 GAC)	Mut	<i>embB406</i>
15	AA 495-499 (497 CGG)	Mut	<i>embB497</i>

**Figure 1.** Layout of the LD-EMB array for detecting mutations in *embB*. Hyb, hybridization; Nt, nucleotide; wt, wild-type; AA, amino acid; Mut, mutation.

region. Twenty-two involved codon 306 (22/41, 53.7%), 11/41 (26.8%) were *embB406* mutations, 4/41 (9.8%) isolates showed a double mutation in both codons 306 and 406, and the remaining mutated isolates (4/41, 9.8%) presented minor substitutions: two mutations in codon 328, one in codon 378 and one in codon 497.

The 24-locus MIRU-VNTR genotyping identified nine clusters (Table 2) among isolates showing a mutation in *embB*. In two non-mutated isolates, the 24-locus MIRU-VNTR genotype could not be determined. Thus, when taking into account only unrelated isolates and one representative isolate of each cluster to determine the real occurrence of *embB* mutations in MTBC isolates circulating in our area, the number of ethambutol-resistant isolates was 37, of which 27 (72.9%) presented a nucleotide substitution within the sequenced *embB* fragment. Sixteen of these showed a mutation in codon 306 (16/27, 59.3%), seven a mutation in codon 406 (7/27, 25.9%) and one isolate (1/27, 3.7%) showed a double substitution (*embB306* plus *embB406*); the remainder involved single mutations in codon 328, codon 378 and codon 497 (3/27, 11.1%) (Table 2).

All 702 ethambutol-susceptible isolates showed a wild-type in the entire *embB* region that was sequenced.

### Relationship between predominant mutations and the pattern of drug resistance

#### *embB* mutations and phenotypic resistance to ethambutol (MIC)

All non-mutated, ethambutol-resistant isolates presented MICs of ethambutol of 7.5 mg/L or lower. In addition, values of MICs of ethambutol  $\geq 15$  mg/L (a high level of resistance) were correlated with the presence or absence of the two most important codons (variables *embB306* present/not present and *embB406* present/not present). The percentage of isolates showing high levels of resistance to ethambutol did not differ significantly according to whether an *embB306* mutation was present (53.8%; 14/26) or not (73.3%; 11/15), whereas the difference was statistically significant in relation to whether an *embB406* mutation was present (86.7%; 13/15) or not (46.2%; 12/26) ( $P=0.01$ ). The MIC value for a double mutation in codons 306 and 406 was similar to that of isolates with single mutations. Finally, no association was found regarding the level of resistance to ethambutol and the specific amino acid substitution in each of the codons.

#### *embB* mutations and multidrug resistance

Thirty-seven of the 53 (69.8%) ethambutol-resistant isolates studied were also MDR. Among all the *embB*-mutated isolates, 82.9% (34/41) were MDR, whereas among non-mutated isolates the MDR percentage was 25% (3/12). Only 9.8% (4/41) of the *embB*-mutated isolates were ethambutol-monoresistant (all with a substitution in codon 306); in contrast, the percentage of ethambutol monoresistance was 58.3% (7/12) among non-mutated isolates. When taking into account the specific mutated codon in *embB*, the rate of multidrug resistance among isolates in which an *embB306* mutation was present was 76.9% (20/26), versus 93.3% (14/15) among isolates without a mutation in this codon; this difference was not statistically significant. However, the percentage of multidrug resistance among isolates with at least one *embB406* substitution was significantly higher than

was found in the group of isolates without mutations in this codon (100% versus 73.1%,  $P=0.035$ ).

### Relationship between predominant mutations and epidemiological features

The data regarding the country of origin of patients with *embB*-mutated isolates revealed that 60% (9/15) of isolates without mutations in codon 306 belonged to patients who originated in a country other than Spain, this being the case for 46.2% (12/26) of isolates that showed an *embB306* mutation. On the other hand, 66.7% (10/15) of isolates in which an *embB406* mutation was present corresponded to foreign-born patients, who accounted for 42.3% (11/26) of the isolates without mutations in *embB406*. None of these differences was statistically significant.

When analysing the characteristics of the ethambutol-resistant isolates in our area according to the date of collection, we found no evidence of any temporal evolution, with regard to either the levels of ethambutol resistance (MIC) or the frequency of *embB* mutations.

All the calculations carried out to assess the relationship between predominant mutations and the MIC of ethambutol, multidrug resistance and epidemiological features were also performed taking into account only unrelated isolates and one representative isolate of each 24-locus MIRU-VNTR genotype cluster. This analysis revealed no significant differences for either of the two variables with respect to these features.

### Detection of *embB* mutations using the LD-EMB array

Among the 53 ethambutol-resistant isolates studied, the LD-EMB array identified an *embB306* substitution in 22 isolates, 11 isolates showed an *embB406* mutation, 4 presented a double *embB306* and *embB406* substitution and one presented an *embB497* mutation. Three isolates showed a lack of signal in all the probes spanning mutations, and they hybridized with all wild-type probes except for one (two isolates lacked hybridization with the wild-type *embB328*, and one lacked hybridization with the wild-type *embB378*). All five pan-susceptible isolates showed a wild-type pattern in the LD-EMB array (Figure 2). The results obtained with the array were fully concordant with the sequencing data.

## Discussion

The analysis of the ethambutol-resistant isolates of MTBC collected over a 16 year period in our area revealed that around three-quarters of them presented a mutation in the ERDR of *embB*, this being consistent with previously published results.<sup>5</sup> These *embB*-mutated isolates showed higher levels of resistance to ethambutol and a stronger relationship with polydrug resistance and multidrug resistance than did those isolates without mutations in *embB* but which still presented decreased susceptibility to ethambutol.

As reported elsewhere,<sup>7-10</sup> substitutions in codon *embB306* were the predominant mechanism associated with ethambutol resistance, since this target was involved in more than half of the resistant isolates studied. However, the frequency of mutations in codon 406 was also important in the present study. Moreover, the presence of mutations in *embB406* was also shown to be related to multidrug resistance, as well as to a higher level of resistance to ethambutol (higher values of MIC). In addition, a trend

**Table 2.** Results of molecular and epidemiological characterization of ethambutol-resistant isolates

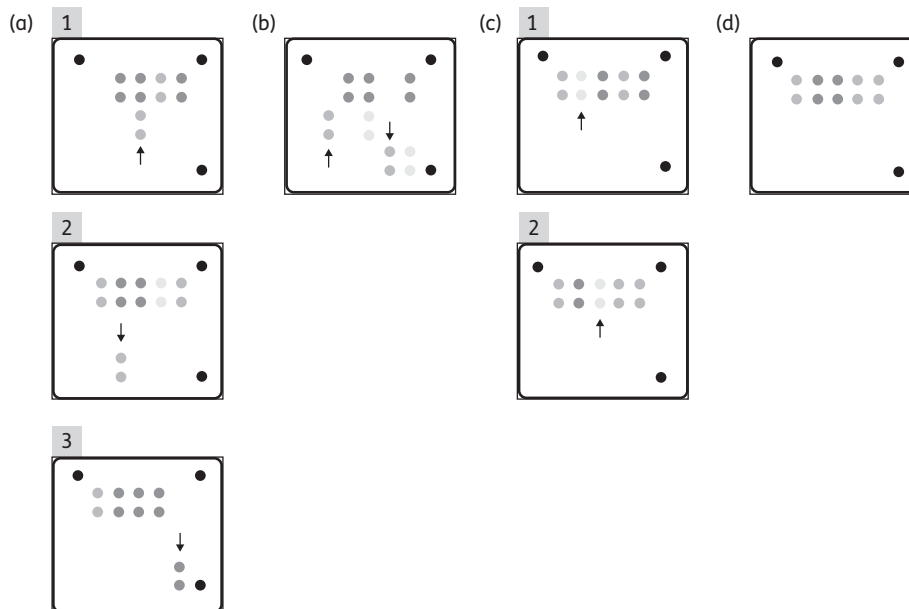
No. of isolate	Sequencing		24-locus MIRU-VNTR genotype	Resistance pattern	Ethambutol MIC (mg/L)	Date of extraction	Foreign born?	Result of the LD-EMB array <sup>a</sup>
	<i>embB</i> codon mutated <sup>a</sup>	specific mutation <sup>a</sup>						
<b>044R</b>	306	ATA	<b>241313042122439262212455</b>	H, E	10	September 1996	no	306 ATA
<b>056R</b>			<b>241313042122439262212455</b>	R, H, E, Z	10	April 1994	no	
209R			254433342123236162213463	R, H, E, S, Z	10	March 1997	no	
<b>216R</b>		ATC	<b>253533233433524252213463</b>	R, H, E, S, Z	>20	August 1997	no	306 ATC
<b>234R</b>			<b>253533233433524252213463</b>	H, E, Z	15	March 1998	no	
198R			233413442212437262213461	R, H, E, Z	>20	June 1996	no	
308R			276432442122237162213463	R, H, E	15	April 2002	no	
7540			253433422212225262213461	E	5	July 2008	yes	
<b>105R</b>		ATT	<b>241313042122439262212455</b>	R, H, E	10	ND	no	306 ATT
<b>7016</b>		GTG	<b>253433422212225262213461</b>	E	7.5	April 2007	no	306 GTG
<b>7451</b>			<b>253433422212225262213461</b>	E	15	May 2008	no	
<b>5731</b>			<b>253433422212225262213461</b>	E	7.5	August 2008	no	
165R			273335444432657253213463	R, H, E, S	15	ND	yes	
303R			354233344242315252213463	R, H, E, Z	10	January 2002	no	
310R			274336444434447253113463	R, H, E, S, Z	15	March 2002	yes	
2496			225433422212437262213461	R, H, E, Z	15	December 2001	yes	
5630			254313342222325252212373	R, H, E, S, Z	15	May 2008	yes	
5734			273334444434647253213463	R, H, E, S, Z	7.5	August 2008	yes	
5821			261423441122436262213463	R, H, E	7.5	October 2008	yes	
06/114			261423442122237262213463	R, H, E, Z	>20	ND	yes	
<b>220R</b>		TTG	<b>254313243232425252113463</b>	R, H, E	10	November 1997	no	306 TTG
<b>235R</b>			<b>254313243232425252113463</b>	R, H, E, Z	7.5	February 1998	no	
<b>4757</b>	306, 406	ATC, GAC	<b>254314243232425252213465</b>	R, H, E, S, Z	15	September 2006	yes	306 ATC, 406 GAC
<b>4946</b>			<b>254314243232425252213465</b>	R, H, E, S, Z	20	February 2007	yes	
<b>5462</b>			<b>254314243232425252213465</b>	R, H, E, S, Z	15	January 2008	yes	
<b>5511</b>			<b>254314243232425252213465</b>	R, H, E, S, Z	15	February 2008	yes	
<b>250R</b>	328	TAT	<b>253325444434562263213463</b>	R, H, E	15	August 1999	yes	(-) probe 2
<b>254R</b>			<b>253325444434562263213463</b>	R, H, E, S, Z	15	December 1999	yes	
5765	378	GCG	[102]52233055220314242223293	E, Z	5	September 2008	no	(-) probe 3
106R	406	AGC	240432342122236162213463	R, H, E	15	November 1997	yes	406 AGC
<b>279R</b>		GCC	<b>25443333323338252113463</b>	R, H, E, S, Z	15	August 2001	yes	406 GCC
<b>3867</b>			<b>25443333323338252113463</b>	R, H, E, S, Z	20	January 2005	yes	
<b>7358</b>			<b>25253323333638232213263</b>	R, H, E, S, Z	>20	March 2008	yes	
<b>7796</b>			<b>25253323333638232213263</b>	R, H, E, S	15	March 2009	no	
6569			244313243222325252213463	R, H, E, S, Z	7.5	August 2010	yes	
<b>188R</b>		TGC	<b>262333343232326352213463</b>	R, H, E, S, Z	15	February 1996	no	406 TGC
<b>261R</b>			<b>262333343232326352213463</b>	R, H, E, S, Z	15	November 2000	no	
<b>301R</b>			<b>262333343232326352213463</b>	R, H, E, S, Z	15	March 2001	yes	
194R			262333343232226352213463	R, H, E, S, Z	10	May 1996	no	
233R			352233255421235242223383	R, H, E, S, Z	20	December 1998	no	
5758	497	CGG	23333243232425152113453	R, H, E, S	7.5	September 2008	yes	497 CGG
107R	none	none	273344422234247253213463	R, H, E	7.5	January 2002	yes	wild-type
4508			273335444432647253213463	R, H, E, S, Z	7.5	February 2006	yes	
5226			244433342212427262213461	H, E	7.5	August 2007	yes	
5573			25533334322225262213464	E	7.5	April 2008	no	
6031			254314243232425252113463	E	7.5	April 2009	yes	
6043			253433233433636252213463	E	7.5	March 2009	yes	
7065			253523233453437232113263	E, S, Z	5	May 2007	yes	
7170			273334444432657253213463	R, H, E, S, Z	7.5	October 2007	yes	

Continued

**Table 2.** Continued

No. of isolate	Sequencing		24-locus MIRU-VNTR genotype	Resistance pattern	Ethambutol MIC (mg/L)	Date of extraction	Foreign born?	Result of the LD-EMB array <sup>a</sup>
	<i>embB</i> codon mutated <sup>a</sup>	specific mutation <sup>a</sup>						
04/004	none	none	ND	E	7.5	ND	no	wild-type
05/105			ND	E	7.5	ND	no	
07/113			253423222212439262213463	E	7.5	ND	no	
08/042			254423422212136241213461	E	7.5	ND	no	

R, rifampicin; H, isoniazid; E, ethambutol; S, streptomycin; Z, pyrazinamide; ND, not determined. Isolates belonging to clusters according to 24-locus MIRU-VNTR genotyping are marked in bold. <sup>a</sup>In this column a blank indicates a repeat of the value listed above.



**Figure 2.** Examples of results obtained with the LD-EMB array. (a) Single mutation in (1) codon 306 (ATG→ATA), (2) codon 406 (GGC→GCC) and (3) codon (497→CGG). (b) Double mutation in codons 306 (ATG→ATC) and 406 (GCC→GAC). (c) Absence of hybridization in wild-type (1) 328 or (2) 378, suggesting the existence of a mutation in this position. (d) Wild-type *embB* pattern.

towards a relationship between mutation in *embB406* and international migration was observed, although this did not reach statistical significance. This trend for isolates from foreign-born patients to present *embB406* mutations is likely to be explained by the previously reported association between international migration flows and multidrug resistance<sup>28</sup> and the relationship between multidrug resistance and *embB406* mutations identified in the present study. However, further studies are needed to confirm this hypothesis. The fact that the analysis of the relationship between these features and mutations in codons 306 and 406 did not show statistical significance when considering only unrelated *embB*-mutated isolates could be due to small size of this subsample. The analysis of the whole set of ethambutol-resistant isolates aimed to give some idea of the global prevalence of *embB*

mutations among ethambutol-resistant clinical isolates in our area, whereas the analysis of unrelated isolates (and one representative isolate of each cluster) reflects the real occurrence of each *embB* mutation among circulating MTBC isolates in Barcelona.

It should also be noted that clustering was found only among *embB*-mutated isolates since all non-mutated isolates seemed to be unrelated according to 24-locus MIRU-VNTR genotyping, thereby supporting previously reported data and the possible epidemiological implications involved.<sup>14</sup>

Among ethambutol-resistant isolates, especially those with substitutions in codon 306, the MIC values were not always correlated exclusively with a specific substitution. In some cases, the same substitution (e.g. 306 ATG→ATC) conferred a different level of resistance to ethambutol, depending on the pattern of



resistance of the isolate, being higher (up to 2-fold) if the isolate was MDR. Likewise, isolates belonging to the same cluster that presented the same mutation (e.g. 306 ATG→GTG) and the same pattern of resistance sometimes presented different MIC values of ethambutol. These findings confirm the previously proposed hypothesis regarding the multifactorial nature of phenotypic resistance to ethambutol, and the idea that the acquisition of a mutation in the *embB* gene is a first step in developing resistance to ethambutol and other anti-TB drugs.<sup>17–20</sup>

Our analysis of codons *embB*306 and *embB*406 in a large set of ethambutol-susceptible isolates (of which 7.3% were MDR and 12.4% were polydrug resistant) revealed an absence of mutations in these positions, thereby demonstrating the significance of these codons with regard to ethambutol resistance. This finding contrasts with previous reports that questioned the role of codons *embB*306 and *embB*406 in resistance to ethambutol. This discrepancy may be due, in part, to heterogeneity in the methodologies used (e.g. drug susceptibility testing methods) or to the intrinsic molecular variability among isolates from diverse geographical regions.

According to the data shown by the analysis of the whole set of ethambutol-resistant isolates, which gives the idea of the global prevalence of the *embB* mutations in Barcelona, current molecular tests for detecting *embB* mutations, which are based solely on the *embB*306 target, would be insufficient in our setting. Indeed, when using the available commercial techniques for detecting genotypic resistance to ethambutol, >20% of ethambutol-resistant isolates with *embB* mutations would remain undetected in our area. The LD-EMB array proposed in the present study as a molecular method for detecting mutations related to ethambutol resistance included four additional targets, thereby increasing the spectrum of detection, mostly as a result of the inclusion of codon *embB*406. The system also contemplates a wider variety of possible substitutions in the case of *embB*306. The LD-EMB array described here demonstrated good effectiveness due to its excellent sensitivity and specificity. Furthermore, it was easy to handle, the results were obtained in one working day, and the cost (~15 euros per sample) was lower than that of other commercially available techniques. Finally, as this is an array system, it offers enough flexibility to allow the inclusion of more or different targets of interest, depending on the epidemiological and molecular characteristics of each setting.

## Acknowledgements

This work was partially presented at the 48th ICAAC/46th IDSA Annual Meeting, Washington, DC, USA, 2008 (poster number C2-1981) and at the XVI Congress of the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica), Bilbao, Spain, 2012 (poster number 358).

The present study was carried out under the aegis of the GEIM (Grupo de Estudio de Infecciones por Micobacterias) study group of the SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). We thank N. Martín for help with collecting the clinical isolates, J. M. Sierra for technical assistance with optimizing the LD-EMB array and N. Porta and D. Cuadras for their contribution to the statistical analysis.

## Funding

This study was funded by Spain's Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 06/0328) and supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de

Salud Carlos III—FEDER, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). R. M. received a grant from the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- 1 WHO. *Treatment of Tuberculosis Guidelines*. 4th edn. Geneva, Switzerland: WHO, 2010.
- 2 Mikusova K, Slayden RA, Besra GS *et al*. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2484–9.
- 3 Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**: 1493–9.
- 4 WHO. *Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance*. Geneva, Switzerland: WHO, 2010.
- 5 Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S *et al*. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* 1997; **3**: 567–70.
- 6 Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 2270–3.
- 7 Ahmad S, Jaber AA, Mokaddas E. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; **87**: 123–9.
- 8 Plinke C, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Significance of mutations in *embB* codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1900–2.
- 9 Safi H, Sayers B, Hazbon MH *et al*. Transfer of *embB* codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2027–34.
- 10 Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X *et al*. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 1677–81.
- 11 Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1767–72.
- 12 Johnson R, Jordaan AM, Pretorius L *et al*. Ethambutol resistance testing by mutation detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; **10**: 68–73.
- 13 Shen X, Shen GM, Wu J *et al*. Association between *embB* codon 306 mutations and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2618–20.
- 14 Hazbon MH, del Bobadilla V, Guerrero MI *et al*. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3794–802.
- 15 Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A *et al*. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2218–25.
- 16 Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S *et al*. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 326–36.

- 17** Safi H, Fleischmann RD, Peterson SN et al. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical *embCAB* gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 103–8.
- 18** Lee AS, Othman SN, Ho YM et al. Novel mutations within the *embB* gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4447–9.
- 19** Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B et al. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3810–3.
- 20** Perdigo J, Macedo R, Ribeiro A et al. Genetic characterisation of the ethambutol resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence and significance of *embB306* mutations. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **33**: 334–8.
- 21** Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 2004; **53**: 107–13.
- 22** Srivastava S, Garg A, Ayyagari A et al. Nucleotide polymorphism associated with ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol* 2006; **53**: 401–5.
- 23** Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 531–9.
- 24** Tang X, Morris SL, Langone JJ et al. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 318–30.
- 25** Aragon LM, Navarro F, Heiser V et al. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 825–31.
- 26** Moure R, Tudó G, Medina R et al. Detection of streptomycin and quinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a low-density DNA array. *Tuberculosis (Edinb)* 2013; **93**: 508–14.
- 27** Supply P, Allix C, Lesjean S et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 4498–510.
- 28** Fortun J, Martin-Davila P, Navas E et al. Changes in the epidemiology of tuberculosis: the influence of international migration flows. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; **29**: 654–9.





## V. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## **1. Evaluación de un nuevo sistema integrado de amplificación de ácidos nucleicos e hibridación simultánea con sondas marcadas con fluoróforo (PCR a tiempo real) para la detección directa de *M. tuberculosis* complex y su resistencia a la rifampicina (Xpert MTB/RIF).**

Las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de la tuberculosis han supuesto, especialmente en la última década, una importante reducción en el tiempo de respuesta para la detección de *M. tuberculosis* complex y su sensibilidad antibiótica.

Dentro de este tipo de técnicas se halla el sistema comercial GeneXpert (Cepheid, EEUU), con el ensayo Xpert MTB/RIF específico para la detección de *M. tuberculosis* complex, que apareció a finales del año 2009. Un año más tarde, se publicaron los primeros estudios que avalaban su buen rendimiento tanto en la detección directa de *M. tuberculosis* complex como de la resistencia a la rifampicina, muy útil como indicador de tuberculosis multirresistente. En un primer estudio, Helb *et al* [75] analizaron un grupo de 107 pacientes con sospecha de tuberculosis y obtuvieron una sensibilidad de detección del Xpert MTB/RIF del 81,7%, aunque tan sólo 39 de las muestras estudiadas tenían un resultado negativo de baciloscopia (el resto eran baciloscopia-positiva). Por otro lado, estudiaron la sensibilidad de detección de la resistencia a rifampicina en un grupo de 64 pacientes de Uganda, previamente tratados y con baciloscopia positiva, donde el Xpert MTB/RIF detectó los 9 casos de resistencia a la rifampicina demostrada con el antibiograma fenotípico. En un segundo estudio, a gran escala (casi 2000 pacientes) también en países endémicos (Peru, Azerbaijan, Sudáfrica e India), Boehme *et al* [76] determinaron una sensibilidad de detección de *M. tuberculosis* complex del 98,2% y 72,5% en pacientes con baciloscopia positiva y negativa, respectivamente, además de un 97,6% en la detección de la resistencia a la rifampicina. Además, ambos estudios mostraron valores de especificidad cercanos al 100% en muestras con cultivo negativo de *M. tuberculosis* complex.

En los trabajos de esta tesis con la técnica Xpert MTB/RIF, quisimos centrarnos exclusivamente en el estudio de muestras con baciloscopia negativa, donde el diagnóstico rápido convencional (microscopía) no había sido concluyente y, por tanto, donde la técnica Xpert MTB/RIF sería de mayor utilidad en nuestro medio. Además, las características epidemiológicas son diferentes a las de estudios anteriores, ya que nuestros trabajos fueron realizados en un país de baja-media incidencia de tuberculosis. Los resultados de sensibilidad y especificidad en

muestras pulmonares corroboraron los resultados de estudios previos, siendo el valor de sensibilidad incluso un poco superior a los publicados anteriormente (78,2%; Artículo 1, Tabla 2). En cuanto a la resistencia a la rifampicina (menor al 1% en nuestra área, en pacientes no tratados previamente), analizamos también la capacidad del Xpert MTB/RIF para detectar mutaciones en *rpoB*, en una pequeña colección de muestras respiratorias donde se aislaron cepas fenotípicamente resistentes a la rifampicina. Todos los casos de resistencia fenotípica fueron detectados con el Xpert MTB/RIF, que se reflejó por la ausencia de hibridación con una de las sondas *molecular beacons* (sonda E: codón 528-533). Esta capacidad de detección de la resistencia a la rifampicina directamente en muestra clínica ofrece un gran potencial en la predicción de la multirresistencia y permite, por tanto, establecer desde un inicio una orientación del tratamiento farmacológico más adecuado. Partiendo de esta premisa es importante resaltar, sin embargo, que los resultados de resistencia farmacológica obtenidos con un sistema molecular han de ser considerados como una característica genotípica que no siempre se corresponderá con el patrón fenotípico de la cepa clínica. A pesar de que las mutaciones en la región *core* del gen *rpoB* se relacionan con la resistencia fenotípica en un 95-98% de los casos [115], no siempre una mutación en esta región conlleva un fenotipo resistente. De hecho, entre las cepas analizadas en nuestro centro con el sistema Xpert MTB/RIF, un 1,4% presentaron un resultado molecular de “resistente a la rifampicina” por ausencia de hibridación con la sonda B (codón 512-517). Sin embargo, dicha resistencia no se confirmó con la prueba de sensibilidad y la secuenciación reveló que la sustitución nucleotídica, en el codón 514, no había supuesto un cambio aminoacídico, por lo que la cepa se mantuvo fenotípicamente sensible (ver Carta Científica; Anexo). Estos resultados han sido hallados también por otros grupos de estudio, usando otros sistemas moleculares basados en la detección de mutaciones genéticas en el gen *rpoB* [184] e incluso posteriormente con el Xpert MTB/RIF [185],[202]. Este hecho pone de manifiesto la importancia de interpretar correctamente los resultados de las técnicas moleculares y de seguir realizando las pruebas de sensibilidad fenotípica como *gold standard* del patrón de resistencia, a pesar de obtener una primera orientación diagnóstica con el método molecular. Si bien existen alternativas terapéuticas a la rifampicina, la no inclusión (basada en un resultado erróneo de resistencia obtenido con el sistema molecular) de este fármaco, que es de gran eficacia en la terapia antituberculosa, podría tener consecuencias indeseables, tanto clínicas como epidemiológicas.



Por último, respecto al estudio en muestras pulmonares cabe destacar que, al contrario de los trabajos publicados por Helb *et al* y Boehme *et al*, el análisis con el Xpert MTB/RIF fue realizado de forma retrospectiva, en muestras obtenidas años atrás y que llevaban congeladas (-80°C) entre 1 y 10 años. No se observó diferencias significativas en cuanto al porcentaje de positividad con el Xpert MTB/RIF, entre el grupo de muestras congeladas menos de 5 años y las que llevaban congeladas entre 5 y 10 años, lo que demostró la gran robustez del método Xpert MTB/RIF.

La OMS, en el año 2011 y tras la revisión de los estudios publicados hasta la fecha acerca de la efectividad del Xpert MTB/RIF, publicó una serie de recomendaciones acerca del uso de este test en los laboratorios de diagnóstico de tuberculosis. En un primer lugar, recomendó la realización de este ensayo como primera herramienta de diagnóstico en países con alta incidencia de tuberculosis multirresistente o coinfección con el VIH. En el resto de países, recomendó considerar este ensayo como segundo sistema de diagnóstico rápido, tras un resultado negativo de microscopía. Estas recomendaciones sólo se aplicaron al diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

Fruto de los buenos resultados de sensibilidad y especificidad en la detección de *M. tuberculosis* complex obtenidos con el Xpert MTB/RIF en colecciones de muestras pulmonares, nos planteamos un segundo estudio con esta técnica, en un tipo de muestra más exigente como son las extrapulmonares. Hasta la fecha de nuestro estudio, se publicaron algunos trabajos donde analizaban series pequeñas de muestras extrapulmonares con el Xpert MTB/RIF [79-81], con resultados dispares de sensibilidad, o bien series más largas pero en países de alta incidencia de tuberculosis [82]. Nuestro estudio fue el primero desarrollado en un país de baja-media incidencia de tuberculosis con una serie superior al centenar de muestras, todas ellas baciloscopia-negativa, donde se constató una buena sensibilidad del sistema en general (superior al 50%) (Artículo 2, Tabla 1). Al igual que el estudio de muestras pulmonares, este trabajo se llevó a cabo de forma retrospectiva, y las muestras analizadas habían pasado largos periodos de almacenamiento a -80°C. Nuevamente, se confirmó la robustez de la técnica también en muestras extrapulmonares, ya que la sensibilidad del sistema Xpert MTB/RIF no variaba significativamente en función del periodo de congelación.

Las muestras extrapulmonares, al contrario de las pulmonares, son muy heterogéneas, lo cual determina que su rentabilidad con los métodos moleculares de detección directa sea muy variable. Por ello, se dividió la colección analizada en varios tipos de muestras: líquidos estériles, líquidos no estériles (orina y aspirados gástricos), nódulos linfáticos, abscesos, tejidos, y muestras de heces, y se analizaron los resultados de sensibilidad de la técnica dentro de cada uno de estos grupos. Se observó que las muestras con mayor rentabilidad eran las de nódulos linfáticos y abscesos, con valores de sensibilidad cercanos a los obtenidos previamente en muestras pulmonares. Esto fue debido probablemente a su similitud en cuanto a la carga de inóculo presente (superior a la de otras muestras extrapulmonares) y a las características físicas (textura, viscosidad...) que determinan la eficacia en la extracción del ADN. Los grupos de líquidos no estériles y heces presentaron también buenos valores de sensibilidad, por razones similares a las previamente explicadas para nódulos y abscesos. Por el contrario, en las muestras de tejido, el inóculo bacteriano suele ser menor y además la textura de estas muestras suele ofrecer resistencia a su disgregación, dificultando la extracción del material genético; todo ello explicaría el menor rendimiento en estas muestras. En último lugar encontramos el grupo de líquidos estériles, donde la carga bacilar es extremadamente baja, por ello el porcentaje de positivos con el Xpert MTB/RIF fue menor. Este hecho fue especialmente notable en las muestras de líquido pleural, donde el porcentaje de positivos fue sólo de un 26,9%, coincidiendo con otros estudios publicados [203]. La dificultad en el diagnóstico de la tuberculosis pleural, incluso mediante métodos moleculares, es bien conocida [204-206]. El Xpert MTB/RIF supone una mejoría (mayor sensibilidad) con respecto a otros métodos, sin embargo constata la dificultad de detección directa en muestras extremadamente paucibacilares como éstas (Artículo 2, Tabla 1).

En este sentido, la relación inóculo-dependencia de la técnica Xpert MTB/RIF fue determinada en ambos estudios (tanto en el de muestras pulmonares como extrapulmonares). Para ello, se correlacionó la mediana de días hasta el crecimiento en cultivo líquido de las muestras (indicador del tamaño del inóculo bacteriano presente), con su resultado cualitativo (Positivo/Negativo) del Xpert MTB/RIF. Se observó una diferencia significativa (mayor número de días hasta el crecimiento en los casos de Xpert MTB/RIF negativo), tanto en muestras pulmonares ( $P=0,003$ ) como extrapulmonares ( $P<0,001$ ). Con ello, se confirmó que la capacidad de detección del Xpert MTB/RIF dependía de la carga bacilar presente en las muestras clínicas.

En nuestros estudios se obtuvieron 3 casos de resultados inválidos. Los 3 casos se trataban de muestras de aspirados gástricos, que no habían sido previamente tratados (decontaminados y tamponados) [41]. Aunque según las instrucciones del fabricante del Xpert MTB/RIF es posible procesar directamente las muestras clínicas sin tratar, los aspirados gástricos presentan algunas dificultades al tratarse de muestras ácidas, cuyo pH (muy bajo) probablemente inhibió la reacción de amplificación genética.

## **2. Estudio de la rentabilidad potencial del uso en rutina de la técnica Xpert MTB/RIF para la detección directa de *M. tuberculosis* complex y su resistencia a la rifampicina en casos con baciloscopia negativa, en una zona de baja-media incidencia de tuberculosis.**

El coste de la técnica Xpert MTB/RIF es bastante alto en países de alta renta, ya que oscila entre los 50 y 80 euros/prueba. Este aspecto hace necesario plantear la viabilidad de la implantación de este sistema en la rutina diagnóstica de cada centro, mediante estudios de coste-efectividad. Hasta la fecha de nuestro trabajo, pocos estudios existían a este respecto. El grupo de Vassall [207] publicó el primer trabajo de coste-efectividad del Xpert MTB/RIF en países de alta incidencia de tuberculosis y pocos recursos económicos, y determinó un ICER (*incremental cost effectiveness ratio*) de 41-110 \$ si la realización del ensayo se sumaba a la microscopía, y de 52-138 \$ si el Xpert MTB/RIF sustituía a la microscopía. Asimismo, el grupo de Theron [208], demostró que la combinación de microscopía seguida del ensayo Xpert MTB/RIF en los casos de sospecha de tuberculosis, era la estrategia más rentable en el diagnóstico de tuberculosis, en países de alta incidencia y bajos recursos económicos.

El tercer trabajo publicado que se incluye en esta tesis fue una aproximación al concepto de coste-beneficio que conllevaría la implementación del Xpert MTB/RIF en la práctica asistencial para el diagnóstico rápido de la tuberculosis, en nuestro medio. Aunque se trató de un estudio retrospectivo de “caso-control” donde sólo se analizaron pacientes con tuberculosis confirmada, se pudo obtener una estimación de los beneficios que hubiera supuesto la realización de esta prueba en un grupo de pacientes con baciloscopia negativa y alta-media sospecha clínica, y en un contexto de área geográfica de baja-media incidencia de tuberculosis. Los resultados (incremento de un 30% de diagnóstico rápido y un hipotético ahorro medio de casi 2000 euros por paciente, en caso de realizar el Xpert MTB/RIF)

(Artículo 3) permitieron concluir que esta técnica se perfila como un ensayo coste-efectivo, a falta de estudios prospectivos que lo confirmen definitivamente.

La rapidez y la sencillez metodológica de esta técnica fueron otros de los puntos fuertes valorados en los estudios de esta tesis sobre el Xpert MTB/RIF. Estas características, además de los buenos resultados de sensibilidad-especificidad y las estimaciones positivas de coste-beneficio, llevaron a nuestro centro a implementar el Xpert MTB/RIF como técnica de rutina en el Servicio de Microbiología, en los casos de alta-media sospecha de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar donde la baciloscopia sea negativa. Asimismo, los estudios acerca de la efectividad en muestras pulmonares y extrapulmonares han sido incluidos en una revisión del centro Cochrane [209]; dicha revisión es la base, en parte, de la actualización de las recomendaciones de uso del Xpert MTB/RIF descritas por la OMS [210].

### **3. Evaluación de un nuevo sistema basado en la amplificación de ácidos nucleicos e hibridación en tiras de nitrocelulosa (*dipstick*) para la detección directa de *M. tuberculosis complex* (GenoQuick MTB)**

El coste económico de los sistemas moleculares de diagnóstico suele ser elevado, en especial cuanto más automatizada es la metodología empleada. Por ello, es necesario tener en cuenta diversos aspectos a la hora de elegir una metodología u otra, en función de las necesidades y exigencias de cada centro de diagnóstico.

Casi al mismo tiempo que el sistema Xpert MTB/RIF, apareció otra metodología de diagnóstico directo de tuberculosis, el GenoQuick MTB (Hain Lifescience, Alemania), que ofrecía una metodología más laboriosa (PCR convencional y extracción no integrada) pero con unos resultados de sensibilidad y especificidad similares (según estudios de validación interna de la casa comercial) con casi el mismo tiempo de respuesta y a un precio más económico. El Laboratorio de Micobacterias del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge llevó a cabo la primera evaluación externa a nivel mundial de esta técnica. Se analizaron más de un centenar de muestras clínicas con cultivo positivo, en su mayoría respiratorias y con baciloscopia negativa (Artículo 4, Tabla 1). Los resultados de sensibilidad que se obtuvieron fueron elevados (78,1% en muestras con baciloscopia negativa). La especificidad no llegó a ser del 100%, ya que se obtuvo un falso positivo entre las 15 muestras con MNT estudiados (en una muestra que contenía *M. fortuitum* que, tal como se comprobó posteriormente, poseía una

región homóloga al IS6110 de *M. tuberculosis* complex). Sin embargo, este fenómeno, aunque ya observado previamente [211],[212], es bastante infrecuente y, por ello, no debería comprometer la especificidad general de la técnica.

Tal como sucedía en los trabajos con el sistema Xpert MTB/RIF, el estudio con el sistema GenoQuick MTB fue realizado retrospectivamente, con muestras congeladas durante largos periodos de tiempo (1-10 años), y se comprobó que el almacenamiento prolongado no influía en la capacidad de detección, evidenciando la robustez de la técnica.

Además, también se trató de establecer una relación de inóculo-dependencia de la técnica, observando la mediana de días hasta el crecimiento en cultivo de las muestras (indicador del tamaño del inóculo bacteriano presente), con su resultado Positivo/Negativo del GenoQuick MTB. A pesar de observar una tendencia (mayor número de días hasta el crecimiento en las muestras con resultado negativo del GenoQuick MTB) no se pudo determinar que existieran diferencias estadísticamente significativas, con lo que este sistema podría ser menos dependiente de la carga bacilar presente en la muestra, que otras técnicas de detección directa disponibles en la actualidad en el mercado.

Desde un punto de vista metodológico, el sistema GenoQuick MTB no requiere un equipamiento adicional específico (instrumentación propia); tan sólo se necesita un termociclador, un baño y una centrífuga, presentes en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico microbiológico. Además, al tratarse de una técnica de hibridación colorimétrica por *lateral-flow dipstick* (Artículo 4, Figura 1), es más rápido que otras técnicas de hibridación en fase sólida. Por otro lado, es un sistema abierto que permite la realización simultánea de un número teóricamente indeterminado de pruebas.

Debido a las ventajas mencionadas anteriormente y al menor coste económico de este sistema para el diagnóstico rápido de la tuberculosis, comparado con otras técnicas comerciales, se concluyó en este estudio que el GenoQuick MTB parece adecuado para su implementación en laboratorios donde otras técnicas más automatizadas no sean coste-efectivas.

La mayor limitación que se detectó durante la realización de este estudio fue el riesgo potencial de contaminación cruzada durante los procesos de extracción de

ADN (si se realiza de forma manual) y de hibridación con el *dipstick*. Así pues, tras el estudio recomendamos que esta técnica debiera ser siempre realizada por personal cualificado y entrenado en técnicas de biología molecular y siguiendo estrictamente todas las normas que este tipo de metodología requiere.

#### **4. Desarrollo y evaluación de un sistema de *microarrays* de baja densidad para la detección rápida de la resistencia a fármacos de segunda línea, en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis complex*.**

En los casos de tuberculosis resistente a alguno de los fármacos antituberculosos tradicionalmente denominados de primera línea (en especial si se trata de tuberculosis multirresistente), se requiere conocer de forma rápida el patrón de sensibilidad a otros fármacos, como inyectables y fluoroquinolonas. Sin embargo, las pruebas de sensibilidad convencionales, a pesar de seguir considerándose el *gold standard*, son muy lentas ya que requieren varias semanas hasta la obtención de resultados.

Al igual que se ha comentado en el bloque 1 (detección directa de *M. tuberculosis complex*), las técnicas moleculares también se han convertido en metodologías muy útiles para tener una aproximación, de forma mucho más rápida, al patrón de sensibilidad a los fármacos de una cepa determinada. Estas técnicas, se basan en la detección de mutaciones puntuales en genes diana relacionados con la resistencia fenotípica a los diversos fármacos. Por ello, se le ha llegado a denominar “antibiograma genotípico” que, en la mayoría de casos, se relaciona con el antibiograma fenotípico. Uno de los métodos comercialmente disponibles en la actualidad es el GenoType (MTBDR, MTBDR*plus* y MTBDR*sI*) para la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a antituberculosos de primera y segunda línea, que presenta buenos resultados de sensibilidad y especificidad aplicados en cepa, incluso algunos de ellos también en muestra directa [172],[174-176]. Sin embargo, al tratarse de sistemas cerrados, las dianas y mutaciones incluidas son a veces insuficientes o inadecuadas, ya que existe una cierta variabilidad geográfica en su prevalencia, a parte del notable coste económico de estos ensayos.

Por ello, cuando nuestro grupo se planteó el desarrollo de una técnica molecular para la detección rápida de las resistencias, se optó por el sistema de *microarrays* de ADN de baja densidad (también denominados chips de ADN), con el fin de

obtener un sistema sensible y específico, pero más flexible y con un menor coste económico. Además, nuestro grupo había desarrollado previamente (en el año 2006), un *microarray* para la detección de mutaciones relacionadas con la multirresistencia, con buenos resultados de sensibilidad y especificidad aplicado en cepa [189], y se podía aprovechar esta experiencia para el desarrollo de una plataforma similar con otras dianas para diferentes fármacos.

En el quinto artículo de esta tesis, se describen los resultados obtenidos con un *microarray* diseñado para la detección de mutaciones relacionadas con la estreptomicina y las fluoroquinolonas (LD-SQ *array*). El diseño se basó en un metanálisis de la literatura existente acerca de las principales mutaciones relacionadas con la resistencia a estos fármacos descritas en todo el mundo. Así, se establecieron 3 dianas de detección: región 530 del gen *rrs* y un fragmento del gen *rpsL* (resistencia a la estreptomicina) y un fragmento del gen *gyrA* (resistencia a las fluoroquinolonas). Mediante el LD-SQ *array*, se analizaron más de un centenar de muestras resistentes a la estreptomicina y/o a las fluoroquinolonas, y 20 cepas sensibles a estos fármacos. Se obtuvo una buena correlación global entre los resultados obtenidos con LD-SQ *array* y los resultados de secuenciación de estas regiones (superior al 80%). Además, la sensibilidad respecto a la secuenciación en la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la estreptomicina y a las fluoroquinolonas fue cercana al 90% (Artículo 5, Tabla 4).

En este sistema se incluyó también una cuarta diana: la región 1400 del gen *rrs*, implicada en la resistencia a los inyectables de segunda línea, con el propósito de permitir la detección de cepas extremadamente resistentes. El LD-SQ *array* permitió la detección del 80% de las mutaciones reveladas con la secuenciación; sin embargo no se pudieron extraer conclusiones relevantes respecto a la efectividad del *microarray* en la detección de la resistencia a estos fármacos debido a dos razones: 1) el número de cepas con mutaciones en esta región (según la secuenciación) fue bajo, y 2) no se pudo establecer una correlación con el fenotipo, ya que en la mayoría de las cepas del estudio no se disponía del patrón de sensibilidad a los inyectables de segunda línea.

La mayor limitación de este sistema se encontró en el análisis de las mutaciones del gen *gyrA*. La existencia de polimorfismos próximos a posiciones informativas (dianas de mutaciones relacionadas con la resistencia) dificultó la interpretación de resultados, al hallarse en algunos casos hibridación cruzada entre varias sondas, lo

cual hacía difícil discernir el resultado correcto. Por ello, en algunos casos se determinó la existencia de falsas mutaciones en *gyrA* en cepas fenotípicamente sensibles (donde también la secuenciación reveló un genotipo *wild-type*) (Artículo 5, Tabla 3). Esta limitación nos llevó a determinar que el LD-SQ *array* desarrollado para la detección de mutaciones relacionadas con la estreptomicina y las fluoroquinolonas (y potencialmente a los inyectables de segunda línea) debiese considerarse un primer paso hacia la consecución de una versión mejorada del *array*. Dicha versión optimizada se conseguiría probablemente mediante ajuste de los puntos de corte del *software* que analiza las señales colorimétricas de las sondas correspondientes al gen *gyrA* o, en caso que fuera insuficiente, con el diseño de nuevas sondas que presentaran una menor hibridación cruzada entre sí.

También se destaca en este trabajo, que la correlación entre los resultados del LD-SQ *array* y el fenotipo de resistencia, especialmente en el caso de la estreptomicina, fue bajo. Esto no se debió a una limitación del sistema. En un estudio paralelo de caracterización de mutaciones relacionadas con la estreptomicina realizado por nuestro grupo [213] se observó que existe una baja frecuencia de mutación (inferior al 40%) en las dianas *rrs* y *rpsL* de las cepas resistentes a la estreptomicina en nuestra área geográfica, lo que sugiere la presencia de otros mecanismos o dianas relacionados con la resistencia (como por ejemplo el gen *gidB*, relacionado con bajos niveles de resistencia a la estreptomicina), ya descritos por otros grupos [141] y que podrían tener bastante relevancia en nuestro medio.

Sin embargo, a pesar de las limitaciones, se pudo concluir que el LD-SQ *array* constituye una buena aproximación como herramienta para el diagnóstico de tuberculosis resistente a la estreptomicina y las fluoroquinolonas (y potencialmente a la tuberculosis extramadamente resistente), debido a la buena sensibilidad de detección de mutaciones relacionadas con la resistencia, su flexibilidad a la hora de introducir o cambiar dianas de interés, así como su simplicidad metodológica y rapidez (menos de 4 horas). Además, se estimó que el coste de cada prueba estaba en torno a los 17 euros, precio notablemente inferior al de otras técnicas moleculares existentes en el mercado para la detección genotípica de la resistencia a los antituberculosos de segunda línea.

## **5. Caracterización fenotípica de la resistencia al etambutol y determinación de las mutaciones en el gen *embB* más frecuentes en nuestro medio. Desarrollo**



**y evaluación de un sistema de *microarrays* de baja densidad para la detección rápida de las mutaciones relacionadas con la resistencia a etambutol en nuestra área, en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis complex*.**

En la línea del capítulo anterior, nos propusimos el desarrollo de un sistema de detección rápida de la resistencia al etambutol, un fármaco incluido en la terapia estándar contra la tuberculosis [96], debido a la creciente aparición de cepas resistentes a alguno de los otros fármacos de primera línea.

En primer lugar, se analizó la colección de cepas resistentes a etambutol, obtenidas a lo largo de 16 años (53 cepas) en el área de Barcelona, con el fin de caracterizar las mutaciones más importantes relacionadas con la resistencia a este fármaco. La diana de resistencia más importante es el gen *embB*, y diversos estudios en la literatura han publicado frecuencias de mutación en este gen del 50-70% [121], [122]. Dentro del *embB*, el codón que recoge el mayor porcentaje de sustituciones es el 306 (*embB306*), mutado en el 30-68% de las cepas con mutaciones en el gen [123],[124],[126],[129]. Nuestros resultados concordaron con esas cifras (77,4% de las cepas resistentes a etambutol con mutaciones en *embB* y, de ellas, 53,7% en el codón 306). Se han descrito otros codones secundarios implicados en la resistencia al etambutol, aunque con bajas frecuencias de mutación. Sin embargo, en la colección de cepas resistentes de nuestro medio, se halló una elevada frecuencia de mutación en el codón 406 (26,8%). Además, se observó una relación entre el hecho de presentar mutaciones en el codón 406 del gen *embB*, y factores como la multiresistencia, mayores niveles de CIM, o con la inmigración (Artículo 6, Tabla 2). Esta relación fue estadísticamente significativa en los dos primeros casos, mientras que no se pudo establecer dicha relación estadística cuando la mutación estuvo presente en el codón 306. Así pues, este fue el primer estudio que resaltó la relevancia del codón *embB406*, y su relación con mayores niveles de resistencia al etambutol y la multiresistencia.

El análisis de las frecuencias de mutación, así como los cálculos estadísticos para determinar las relaciones entre el *embB406* y los factores epidemiológicos, se realizaron de dos maneras a) teniendo en cuenta el número total de cepas y b) teniendo en cuenta sólo las cepas independientes y un representante de cada uno de los *clusters* obtenidos con la técnica de tipado molecular MIRU-24 (se hallaron 9 *clusters* entre las 53 cepas resistentes a etambutol). La intención en el primer caso fue la de tener una idea de la prevalencia global de las mutaciones en el gen *embB*

en nuestro medio, sin tener en cuenta, por ejemplo, que las mutaciones prevalentes pudieran deberse a la transmisión reciente de un clon mutado mayoritario. Y en el segundo caso, la de obtener una frecuencia real de las mutaciones en *embB* de las cepas circulantes. Las frecuencias de mutación descendieron ligeramente, al analizar sólo cepas independientes, aunque se mantuvieron las proporciones entre cada uno de los codones. Por otro lado, no fue posible reproducir la relación entre el codón 406 y el patrón de resistencia fenotípico y los factores epidemiológicos, probablemente debido a la reducción en el tamaño muestral (tan sólo 27 cepas con mutación) una vez eliminados los componentes de un mismo *cluster*. Por último, en cuanto a la clonalidad, se observó que la existencia de *clusters* sólo estaba presente entre las cepas resistentes a etambutol con mutaciones en el gen *embB* (las que presentaron un gen *embB* *wild-type* eran todas independientes), lo que corrobora los datos y las implicaciones epidemiológicas sugeridas previamente por otros grupos de estudio [112].

En este trabajo también se observó que los valores de CIM no siempre se correlacionaron exclusivamente con un tipo de mutación. Por ejemplo, se observó que, dentro de un grupo de cepas con un mismo cambio nucleotídico en el codón 306, había diferentes valores de CIM, siendo superior si la cepa era MDR (Artículo 6, Tabla 2). Este hallazgo confirma la hipótesis ya expuesta previamente [127],[128],[130],[134] de que la resistencia al etambutol es una característica multifactorial, donde la aparición de mutación en el gen *embB* podría ser simplemente un primer paso en el desarrollo de resistencia, no sólo a este fármaco, sino también a otros fármacos antituberculosos.

Por otro lado, varios estudios han puesto en duda el papel relevante del codón 306, y también del 406, en la resistencia al etambutol, ya que han descrito la existencia de mutaciones en estas posiciones en cepas fenotípicamente sensibles a este fármaco [112],[119],[125],[128-130],[132]. En nuestro estudio se planteó comprobar si este fenómeno sucedía también en el área geográfica de Barcelona. Para ello, se secuenció un fragmento del gen *embB* que abarcaba los codones más importantes, 306 y 406, en una amplia colección de cepas sensibles al etambutol (más de 200 cepas con resistencia a alguno de los otros antituberculosos y 500 aislamientos pansensibles). Contrariamente a los datos publicados por otros grupos citados previamente, no se halló mutación alguna en la región del *embB* estudiada, en ninguna de las más de 700 cepas analizadas. Esto confirma el papel relevante de los codones 306 y 406 en la resistencia al etambutol en las cepas de *M.*

*tuberculosis* complex en nuestro medio. Las diferencias entre nuestros resultados y los de estudios anteriores pueden responder simplemente a razones metodológicas (diferentes métodos de sensibilidad antibiótica fenotípica que hagan variar el diagnóstico resistente/sensible), o quizá manifiestan efectivamente una variabilidad molecular entre diferentes zonas geográficas.

En la actualidad, existen en el mercado sistemas comerciales para la detección rápida de mutaciones relacionadas con la resistencia a etambutol [214]. Sin embargo, estas técnicas se basan sólo en la diana *embB306*. Con los resultados obtenidos en el presente estudio de caracterización de las mutaciones en *embB*, se pudo afirmar que con los sistemas comerciales disponibles, el 20% de las cepas con mutaciones en el *embB* pasarían desapercibidas en nuestra área (falsos sensibles).

Con todos estos datos, se diseñó un sistema de *microarray* (misma plataforma que el estudio anterior) para la detección rápida de resistencia al etambutol en cepas de *M. tuberculosis* complex de nuestro medio (LD-EMB *array*). Este *microarray* constó de 15 sondas: 5 con secuencia *wild-type*, y 10 con las sustituciones más importantes encontradas en los codones 306, 406 y 497 (Artículo 6, Figura 1). Con este sistema, se analizaron las 53 cepas resistentes al etambutol caracterizadas previamente mediante secuenciación, y 5 cepas pansensibles. Los resultados de sensibilidad y especificidad fueron del 100%, respecto a la secuenciación. En el caso de los codones 328 y 378 (posiciones con una relevancia menor), no se incluyó la sonda con mutación, pero sí se pudo inferir la alteración en estas posiciones, debido a la ausencia de hibridación con la sonda *wild-type*. Con estos resultados, se pudo concluir que con el LD-EMB *array* se consigue una detección rápida (4 horas) de un mayor número de mutaciones del gen *embB* que con otros métodos, de forma altamente sensible y específica, y con un coste menor (15 euros por muestra) que el de otras técnicas disponibles comercialmente. Además, tal como se ha mencionado anteriormente en el caso del LD-SQ *array*, el LD-EMB *array* ofrece la flexibilidad necesaria para poder intercambiar dianas de interés, en función de las características moleculares (mutaciones prevalentes) de cada área geográfica.







## VI. CONCLUSIONS





**Part I****Effectiveness of the Xpert MTB/RIF for direct detection of *M. tuberculosis* complex and rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary samples (Article 1 and 2)**

---

1. The Xpert MTB/RIF assay has a good ability for the direct detection of *M. tuberculosis* complex in clinical samples, showing a 78.2% and a 58.3% of sensitivity in pulmonary and extrapulmonary specimens respectively, and a 100% of specificity.
2. The sensitivity of the Xpert MTB/RIF assay is variable depending on the source of the extrapulmonary clinical specimen, with a better performing in lymph nodes and abscesses. Lower detection ability was found in sterile specimens, especially in pleural fluids, probably due to the low bacterial load present in these samples.
3. The Xpert MTB/RIF assay turns out to be a useful test for direct detection of rifampin resistance (predictor of multi-drug resistance) since it detected *rpoB* mutations in all rifampin-resistant samples studied.
4. Apart from the good sensitivity and specificity, the Xpert MTB/RIF assay is also rapid and easy to perform. Therefore, it should be considered a good tool in the routine practice for rapid diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, whenever the smear microscopy is negative but the clinical suspicion is high.

**Potential cost-effectiveness of the Xpert MTB/RIF assay for rapid detection of *M. tuberculosis* complex and rifampin resistance, in a country of low tuberculosis burden (Article 3)**

---

5. The use of the Xpert MTB/RIF assay can increase in our setting the early diagnosis of tuberculosis up to 30% compared to smear-microscopy.
6. The performance of the Xpert MTB/RIF assay in smear-negative cases can reduce the time until initiation of treatment and contact tracing studies.

Moreover, the use of the Xpert MBT/RIF assay can reduce expenses (in terms of cost per patient) until diagnosis as well as invasive complementary tests.

#### **Effectiveness of the GenoQuick MTB assay for direct detection of *M. tuberculosis* complex (Article 4)**

---

7. The GenoQuick MTB assay has a good ability for the direct detection of *M. tuberculosis* complex, showing a 78.1% of sensitivity among smear-negative specimens and a 92.9% of specificity.
8. The GenoQuick MTB assay can be considered a good tool for rapid diagnosis, especially in medium-low economical resources laboratories. However, the methodological performing offers a certain risk of cross-contamination. Therefore, staff trained on molecular biology should perform this technique.

## **Part II**

#### **Development of a low-cost low-density DNA array for the rapid detection of streptomycin and fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis* complex isolates (Article 5)**

---

9. The LD-SQ array is a good approach for rapid detection of main mutations related to streptomycin and fluoroquinolones in clinical isolates, showing a sensitivity of 92.5% and 87.5% respectively, compared to sequencing.
10. The problems of cross-hybridization due to proximity of *gyrA* polymorphisms to informative codons, suggests that this version should be considered a first step to a forthcoming optimized version of the LD-SQ array.

#### **Phenotypic and molecular characterization of the ethambutol resistance in *M. tuberculosis* complex isolates in our area. Development of a low-cost low-density DNA array for the rapid detection of most important *embB* mutations (Article 6)**

---

11. The *embB* mutations at codon 306 are predominant in our setting, followed by *embB406* substitutions. Moreover, the role of these codons in the ethambutol

resistance is demonstrated, since none of the ethambutol-susceptible isolates studied presented a substitution in either of these positions.

12. Mutations at codon 406 in our area are related to higher values of MIC of ethambutol, and to multi-drug resistance.
13. The LD-EMB array is a good molecular tool for rapid detection of ethambutol resistance in clinical isolates, since it offers 100% of sensitivity and specificity, and includes more targets at lower cost than other commercially available systems.







## VII. BIBLIOGRAFÍA





1. **Gutierrez, M. C., S. Brisse, R. Brosch, M. Fabre, B. Omais, M. Marmiesse, P. Supply, and V. Vincent.** 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS.Pathog. 1:e5.
2. **Koch, R.** 1891. A further communication on a remedy for tuberculosis. Br.Med.J. 1:125-127.
3. **Chatterjee, D.** 1997. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. Curr.Opin.Chem.Biol. 1:579-588.
4. **Verma, A., A. K. Sampla, and J. S. Tyagi.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* *rrn* promoters: differential usage and growth rate-dependent control. J.Bacteriol. 181:4326-4333.
5. **Brennan, P. J.** 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb.) 83:91-97.
6. **Neyrolles, O., R. Hernandez-Pando, F. Pietri-Rouxel, P. Fornes, L. Tailleux, J. A. Barrios Payan, E. Pivert, Y. Bordat, D. Aguilar, M. C. Prevost, C. Petit, and B. Gicquel.** 2006. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? PLoS.One. 1:e43.
7. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 393:537-544.
8. **Camus, J. C., M. J. Pryor, C. Medigue, and S. T. Cole.** 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology 148:2967-2973.
9. **World Health Organization.** 2013. Global tuberculosis control: 2013 report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
10. **European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe.** 2013. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control.
11. **Rodríguez E, S. Villarrubia Díaz, G. Hernández and O. Tello and Área de Vigilancia de la Salud Pública. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.** 2012. Situación de la tuberculosis en España, 2011. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
12. **Generalitat de Catalunya. Departament de Salut.** 2011. Informe anual 2011. Situació epidemiològica i tendència de l'endèmica tuberculosa a Catalunya. Departament de Salut, Barcelona, Catalonia, Spain.

13. **World Health Organization.** 2005. Addressing poverty in TB control. Options for national TB control programmes. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
14. **World Health Organization.** 2009. Fact sheet on tuberculosis and tobacco. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
15. **World Health Organization.** 2013. TB/HIV facts 2012-2013. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
16. **Aaron, L., D. Saadoun, I. Calatroni, O. Launay, N. Memain, V. Vincent, G. Marchal, B. Dupont, O. Bouchaud, D. Valeyre, and O. Lortholary.** 2004. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review *Clin.Microbiol.Infect.* **10**:388-398.
17. **Sanz-Pelaez, O., J. A. Caminero-Luna, and J. L. Perez-Arellano.** 2006. Tuberculosis and immigration in Spain. Evidences and controversies. *Med.Clin.(Barc.)* **126**:259-269.
18. **Sonkin, L. S.** 1951. The role of particle size in experimental air-borne infection. *Am.J.Hyg.* **53**:337-354.
19. **Behr, M. A., S. A. Warren, H. Salamon, P. C. Hopewell, L. A. Ponce de, C. L. Daley, and P. M. Small.** 1999. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* **353**:444-449.
20. **Thierry, D., A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault, S. Nguyen, J. L. Guesdon, and B. Gicquel.** 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J.Clin.Microbiol.* **28**:2668-2673.
21. **van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and .** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J.Clin.Microbiol.* **31**:406-409.
22. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, A. M. van, S. D. van, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and E. J. van.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J.Clin.Microbiol.* **35**:907-914.
23. **Barnes, P. F. and M. D. Cave.** 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N.Engl.J.Med.* **349**:1149-1156.
24. **Yeremian, E. and H. Buc.** 1999. Tandem repeats in complete bacterial genome sequences: sequence and structural analyses for comparative studies. *Res.Microbiol.* **150**:745-754.
25. **Supply, P., J. Magdalena, S. Himpens, and C. Locht.** 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol.Microbiol.* **26**:991-1003.

26. **Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht.** 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J.Clin.Microbiol.* **39**:3563-3571.
27. **Mazars, E., S. Lesjean, A. L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, and P. Supply.** 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:1901-1906.
28. **Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, H. P. de, D. H. van, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen.** 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **44**:4498-4510.
29. **Oelemann, M. C., R. Diel, V. Vatin, W. Haas, S. Rusch-Gerdes, C. Locht, S. Niemann, and P. Supply.** 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* **45**:691-697.
30. **Golden, M. P. and H. R. Vikram.** 2005. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am.Fam.Physician* **72**:1761-1768.
31. **von Reyn, C. F., S. Kimambo, L. Mtei, R. D. Arbeit, I. Maro, M. Bakari, M. Matee, T. Lahey, L. V. Adams, W. Black, T. Mackenzie, J. Lyimo, S. Tvaroha, R. Waddell, B. Kreiswirth, C. R. Horsburgh, and K. Pallangyo.** 2011. Disseminated tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: ineffective immunity, polyclonal disease and high mortality. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **15**:1087-1092.
32. **Light, R. W.** 1999. Useful tests on the pleural fluid in the management of patients with pleural effusions. *Curr.Opin.Pulm.Med.* **5**:245-249.
33. **Seibert, A. F., J. Haynes, Jr., R. Middleton, and J. B. Bass, Jr.** 1991. Tuberculous pleural effusion. Twenty-year experience. *Chest* **99**:883-886.
34. **Cardona, P. J.** 2009. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* **37**:80-86.
35. **Cardona, P. J. and I. Amat.** 2006. Origin and development of RUTI, a new therapeutic vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Arch.Bronconeumol.* **42**:25-32.
36. **Borrero, R., N. Álvarez, F. Reyes, M. E. Sarmiento, and A. Acosta.** 2011. *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. *VacciMonitor.* **20**:34-38.
37. **González-Martín, J., J. M. García-García, L. Anibarro, R. Vidal, J. Esteban, R. Blanquer, S. Moreno, and J. Ruiz-Manzano.** 2010. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **28**:297.e1–297.e20.

38. **Dominguez, J., I. Latorre, N. Altet, L. Mateo, M. De Souza-Galvao, J. Ruiz-Manzano, and V. Ausina.** 2009. IFN-gamma-release assays to diagnose TB infection in the immunocompromised individual. *Expert.Rev.Respir.Med.* **3**:309-327.
39. **Diel, R., D. Goletti, G. Ferrara, G. Bothamley, D. Cirillo, B. Kampmann, C. Lange, M. Losi, R. Markova, G. B. Migliori, A. Nienhaus, M. Ruhwald, D. Wagner, J. P. Zellweger, E. Huitric, A. Sandgren, and D. Manissero.** 2011. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur.Respir.J.* **37**:88-99.
40. **Santin, M., L. Munoz, and D. Rigau.** 2012. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in HIV-infected adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS.One.* **7**:e32482.
41. **Kubica, G. P., W. E. Dye, M. L. Cohn, and G. Middlebrook.** 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am.Rev.Respir.Dis.* **87**:775-779.
42. **Luquin, M., V. Ausina, C. F. Lopez, F. Belda, B. M. Garcia, C. Celma, and G. Prats.** 1991. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J.Clin.Microbiol.* **29**:120-130.
43. **Yamaguchi, R., K. Matsuo, A. Yamazaki, C. Abe, S. Nagai, K. Terasaka, and T. Yamada.** 1989. Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect.Immun.* **57**:283-288.
44. **Brent, A. J., D. Mugo, R. Musyimi, A. Mutiso, S. Morpeth, M. Levin, and J. A. Scott.** 2011. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid culture. *J.Clin.Microbiol.* **49**:4343-4346.
45. **Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer.** 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J.Clin.Microbiol.* **31**:175-178.
46. **Arnold, C., L. Westland, G. Mowat, A. Underwood, J. Magee, and S. Gharbia.** 2005. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. *Clin.Microbiol.Infect.* **11**:122-130.
47. **Richter, E., S. Rusch-Gerdes, and D. Hillemann.** 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J.Clin.Microbiol.* **44**:1769-1775.
48. **Banaiee, N., M. Bobadilla-Del-Valle, Bardarov S Jr, P. F. Riska, P. M. Small, A. Ponce-De-Leon, W. R. Jacobs, Jr., G. F. Hatfull, and J. Sifuentes-Osornio.** 2001. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J.Clin.Microbiol.* **39**:3883-3888.

49. **Alcaide, F., N. Gali, J. Dominguez, P. Berlanga, S. Blanco, P. Orus, and R. Martin.** 2003. Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* **41**:2867-2871.
50. **Piersimoni, C. and C. Scarparo.** 2003. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J.Clin.Microbiol.* **41**:5355-5365.
51. **Palomino, J. C.** 2005. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur.Respir.J.* **26**:339-350.
52. **Neonakis, I. K., Z. Gitti, E. Krambovitis, and D. A. Spandidos.** 2008. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J.Microbiol.Methods* **75**:1-11.
53. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2009. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **58**:7-10.
54. **Catanzaro, A.** 1997. What is the appropriate use of the rapid diagnostic tests for tuberculosis? *Monaldi Arch.Chest Dis.* **52**:27-32.
55. **Catanzaro, A., S. Perry, J. E. Clarridge, S. Dunbar, S. Goodnight-White, P. A. Lobue, C. Peter, G. E. Pfyffer, M. F. Sierra, R. Weber, G. Woods, G. Mathews, V. Jonas, K. Smith, and P. Della-Latta.** 2000. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *JAMA* **283**:639-645.
56. **Lemaitre, N., S. Armand, A. Vachee, O. Capilliez, C. Dumoulin, and R. J. Courcol.** 2004. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. *J.Clin.Microbiol.* **42**:4307-4309.
57. **Musial, C. E., L. S. Tice, L. Stockman, and G. D. Roberts.** 1988. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J.Clin.Microbiol.* **26**:2120-2123.
58. **D'Amato, R. F. and A. Miller.** 1998. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *Methods Mol.Biol.* **92**:203-214.
59. **Ausina, V., F. Gamboa, E. Gazapo, J. M. Manterola, J. Lonca, L. Matas, J. R. Manzano, C. Rodrigo, P. J. Cardona, and E. Padilla.** 1997. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J.Clin.Microbiol.* **35**:1996-2002.
60. **Tortoli, E., F. Lavinia, and M. T. Simonetti.** 1997. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J.Clin.Microbiol.* **35**:2424-2426.

61. **Barrett, A., J. G. Magee, and R. Freeman.** 2002. An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples. *J.Med.Microbiol.* **51**:895-898.
62. **McHugh, T. D., C. F. Pope, C. L. Ling, S. Patel, O. J. Billington, R. D. Gosling, M. C. Lipman, and S. H. Gillespie.** 2004. Prospective evaluation of BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of tuberculosis in non-respiratory and respiratory samples. *J.Med.Microbiol.* **53**:1215-1219.
63. **Barber, R.** 2008. Evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical samples. *Br.J.Biomed.Sci.* **65**:7-12.
64. **Franco-Alvarez de, L. F., P. Ruiz, J. Gutierrez, and M. Casal.** 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples. *J.Clin.Microbiol.* **44**:3025-3027.
65. **Neonakis, I. K., Z. Gitti, S. Baritaki, E. Petinaki, M. Baritaki, and D. A. Spandidos.** 2009. Evaluation of GenoType mycobacteria direct assay in comparison with Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and GenoType MTBDRplus for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J.Clin.Microbiol.* **47**:2601-2603.
66. **Kiraz, N., I. Saglik, A. Kiremitci, N. Kasifoglu, and Y. Akgun.** 2010. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *J.Med.Microbiol.* **59**:930-934.
67. **Syre, H., V. P. Myneedu, V. K. Arora, and H. M. Grewal.** 2009. Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid amplification tests, the gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and the genotype mycobacteria direct test. *J.Clin.Microbiol.* **47**:3635-3639.
68. **Bicmen, C., A. T. Gunduz, M. Coskun, G. Senol, A. K. Cirak, and A. Ozsoz.** 2011. Molecular detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four clinically important nontuberculous mycobacterial species in smear-negative clinical samples by the genotype mycobacteria direct test. *J.Clin.Microbiol.* **49**:2874-2878.
69. **Sherlock, O., A. Dolan, and H. Humphreys.** 2010. MRSA screening: can one swab be used for both culture and rapid testing? An evaluation of chromogenic culture and subsequent Hain GenoQuick PCR amplification/detection. *Clin.Microbiol.Infect.* **16**:955-959.
70. **Cohen-Bacrie, S., F. Bertin, A. S. Gassiot, and M. F. Prere.** 2010. Rapid molecular genetic assay for direct identification of Bordetella from patients specimens. *Pathol.Biol.(Paris)* **58**:52-54.
71. **Weizenegger M.** 2010. Lateral flow PCR-dipstick for fast and sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from pulmonary and extrapulmonary specimens. Abstract. 31st Annual Congress of the European Society of Micobacteriology, Bled, Slovenia.

72. **Kim, J. H., Y. J. Kim, C. S. Ki, J. Y. Kim, and N. Y. Lee.** 2011. Evaluation of Cobas TaqMan MTB PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **49**:173-176.
73. **Yang, Y. C., P. L. Lu, S. C. Huang, Y. S. Jenh, R. Jou, and T. C. Chang.** 2011. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J.Clin.Microbiol.* **49**:797-801.
74. **Tortoli, E., P. Urbano, F. Marcelli, M. T. Simonetti, and M. D. Cirillo.** 2012. Is real-time PCR better than conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in clinical samples? *J.Clin.Microbiol.* **50**:2810-2813
75. **Helb, D., M. Jones, E. Story, C. Boehme, E. Wallace, K. Ho, J. Kop, M. R. Owens, R. Rodgers, P. Banada, H. Safi, R. Blakemore, N. T. Lan, E. C. Jones-Lopez, M. Levi, M. Burday, I. Ayakaka, R. D. Mugerwa, B. McMillan, E. Winn-Deen, L. Christel, P. Dailey, M. D. Perkins, D. H. Persing, and D. Alland.** 2010. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J.Clin.Microbiol.* **48**:229-237.
76. **Boehme, C. C., P. Nabeta, D. Hillemann, M. P. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore, R. Rustomjee, A. Milovic, M. Jones, S. M. O'Brien, D. H. Persing, S. Ruesch-Gerdes, E. Gotuzzo, C. Rodrigues, D. Alland, and M. D. Perkins.** 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N.Engl.J.Med.* **363**:1005-1015.
77. **World Health Organization.** 2011. Rapid Implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
78. **Nicol, M. P., L. Workman, W. Isaacs, J. Munro, F. Black, B. Eley, C. C. Boehme, W. Zemanay, and H. J. Zar.** 2011. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study. *Lancet Infect.Dis.* **11**:819-824.
79. **Hillemann, D., S. Rusch-Gerdes, C. Boehme, and E. Richter.** 2011. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J.Clin.Microbiol.* **49**:1202-1205.
80. **Armand, S., P. Vanhuls, G. Delcroix, R. Courcol, and N. Lemaitre.** 2011. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J.Clin.Microbiol.* **49**:1772-1776.
81. **Causse, M., P. Ruiz, J. B. Gutierrez-Aroca, and M. Casal.** 2011. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* **49**:3065-3067.
82. **Vadwai, V., C. Boehme, P. Nabeta, A. Shetty, D. Alland, and C. Rodrigues.** 2011. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis? *J.Clin.Microbiol.* **49**:2540-2545.

83. **Alcaide, F. and P. Coll.** 2011. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **29 Suppl 1**:34-40.
84. **Ruiz-Manzano, J., J. González, J. A. Domínguez, J. A. Martínez, J. A. Caylà.** 2012. Tuberculosis y otras infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas. En: C. Rozman, F. Cardellach (eds). *Tratado de Medicina Interna Farreras-Rozman.* 2012 (XVII ed.). Vol. II. Capítulo 257. Págs 2073-2085. Elsevier España, S.L. ISBN: 978-84-8086-896-9 (Obra completa). ISBN: 978-84-8086-895-2 (Volumen II). Depósito Legal: B-17100-2012.
85. **Banerjee, A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K. S. Um, T. Wilson, D. Collins, L. G. de, and W. R. Jacobs, Jr.** 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**:227-230.
86. **Wehrli, W., F. Knusel, K. Schmid, and M. Staehelin.** 1968. Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **61**:667-673.
87. **Zimhony, O., J. S. Cox, J. T. Welch, C. Vilcheze, and W. R. Jacobs, Jr.** 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat.Med.* **6**:1043-1047.
88. **Shi, W., X. Zhang, X. Jiang, H. Yuan, J. S. Lee, C. E. Barry, III, H. Wang, W. Zhang, and Y. Zhang.** 2011. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **333**:1630-1632.
89. **Mikusova, K., R. A. Slayden, G. S. Besra, and P. J. Brennan.** 1995. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:2484-2489.
90. **Moazed, D. and H. F. Noller.** 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* **327**:389-394.
91. **Honore, N. and S. T. Cole.** 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:238-242.
92. **Magnet, S. and J. S. Blanchard.** 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem.Rev.* **105**:477-498.
93. **Trnka, L. and D. W. Smith.** 1970. Proteosynthetic activity of isolated ribosomes of *Mycobacteria* and its alteration by rifampicin and related tuberculostatic drugs. *Antibiot.Chemother.* **16**:369-379.
94. **Leysen, D. C., A. Haemers, and S. R. Pattyn.** 1989. Mycobacteria and the new quinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:1-5.
95. **Berlin, O. G., L. S. Young, and D. A. Bruckner.** 1987. In-vitro activity of six fluorinated quinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Antimicrob.Chemother.* **19**:611-615.
96. **World Health Organization.** 2010. Treatment of tuberculosis guidelines, 4th ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.



97. **Cynamon, M. H., S. P. Klemens, C. A. Sharpe, and S. Chase.** 1999. Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1189-1191.
98. **Lee, M., J. Lee, M. W. Carroll, H. Choi, S. Min, T. Song, L. E. Via, L. C. Goldfeder, E. Kang, B. Jin, H. Park, H. Kwak, H. Kim, H. S. Jeon, I. Jeong, J. S. Joh, R. Y. Chen, K. N. Olivier, P. A. Shaw, D. Follmann, S. D. Song, J. K. Lee, D. Lee, C. T. Kim, V. Dartois, S. K. Park, S. N. Cho, and C. E. Barry, III.** 2012. Linezolid for treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis. *N.Engl.J.Med.* **367**:1508-1518.
99. **Migliori, G. B., B. Eker, M. D. Richardson, G. Sotgiu, J. P. Zellweger, A. Skrahina, J. Ortmann, E. Girardi, H. Hoffmann, G. Besozzi, N. Bevilacqua, D. Kirsten, R. Centis, and C. Lange.** 2009. A retrospective TBNET assessment of linezolid safety, tolerability and efficacy in multidrug-resistant tuberculosis. *Eur.Respir.J.* **34**:387-393.
100. **de Jonge, M. R., L. H. Koymans, J. E. Guillemont, A. Koul, and K. Andries.** 2007. A computational model of the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* ATPase by a new drug candidate R207910. *Proteins* **67**:971-980.
101. **Nuermberger, E., I. Rosenthal, S. Tyagi, K. N. Williams, D. Almeida, C. A. Peloquin, W. R. Bishai, and J. H. Grosset.** 2006. Combination chemotherapy with the nitroimidazopyran PA-824 and first-line drugs in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:2621-2625.
102. **Tasneen, R., S. Tyagi, K. Williams, J. Grosset, and E. Nuermberger.** 2008. Enhanced bactericidal activity of rifampin and/or pyrazinamide when combined with PA-824 in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:3664-3668.
103. **Matsumoto, M., H. Hashizume, T. Tomishige, M. Kawasaki, H. Tsubouchi, H. Sasaki, Y. Shimokawa, and M. Komatsu.** 2006. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS.Med.* **3**:e466.
104. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2000. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **49** (RR6):1-71.
105. **Ena, J. and V. Valls.** 2005. Short-course therapy with rifampin plus isoniazid, compared with standard therapy with isoniazid, for latent tuberculosis infection: a meta-analysis. *Clin.Infect.Dis.* **40**:670-676.
106. **Aspler, A., R. Long, A. Trajman, M. J. Dion, K. Khan, K. Schwartzman, and D. Menzies.** 2010. Impact of treatment completion, intolerance and adverse events on health system costs in a randomised trial of 4 months rifampin or 9 months isoniazid for latent TB. *Thorax* **65**:582-587.
107. **World Health Organization.** 2010. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

108. **David, H. L. and C. M. Newman.** 1971. Some observations on the genetics of isoniazid resistance in the tubercle bacilli. *Am.Rev.Respir.Dis.* **104**:508-515.
109. **Zhang, Y., T. Garbe, and D. Young.** 1993. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol.Microbiol.* **8**:521-524.
110. **Coll, P., L. M. Aragon, F. Alcaide, M. Espasa, M. Garrigo, J. Gonzalez, J. M. Manterola, P. Orus, and M. Salvado.** 2005. Molecular analysis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Barcelona. *Microb.Drug Resist.* **11**:107-114.
111. **van Soolingen, D., P. E. de Haas, H. R. van Doorn, E. Kuijper, H. Rinder, and M. W. Borgdorff.** 2000. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J.Infect.Dis.* **182**:1788-1790.
112. **Hazbon, M. H., M. Brimacombe, d. Bobadilla, V, M. Cavatore, M. I. Guerrero, M. Varma-Basil, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, C. I. Leon, M. Bose, F. Chaves, M. Murray, K. D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, M. D. Cave, L. A. Ponce de, and D. Alland.** 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:2640-2649.
113. **Sherman, D. R., K. Mdluli, M. J. Hickey, T. M. Arain, S. L. Morris, C. E. Barry, III, and C. K. Stover.** 1996. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **272**:1641-1643.
114. **Mdluli, K., R. A. Slayden, Y. Zhu, S. Ramaswamy, X. Pan, D. Mead, D. D. Crane, J. M. Musser, and C. E. Barry, III.** 1998. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science* **280**:1607-1610.
115. **Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer.** 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**:647-650.
116. **Musser, J. M.** 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin.Microbiol.Rev.* **8**:496-514.
117. **Somoskovi, A., L. M. Parsons, and M. Salfinger.** 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir.Res.* **2**:164-168.
118. **Negi, S. S., U. Singh, S. Gupta, S. Khare, A. Rai, and S. Lal.** 2009. Characterization of *rpoB* gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis. *Indian J.Med.Microbiol.* **27**:226-230.
119. **Mokrousov, I., T. Otten, B. Vyshnevskiy, and O. Narvskaya.** 2003. Allele-specific *rpoB* PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:2231-2235.

120. **Prammananan, T., W. Cheunoy, D. Taechamahapun, J. Yorsangsukkamol, S. Phunpruch, P. Phdarat, M. Leechawengwong, and A. Chaiprasert.** 2008. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection. *Clin.Microbiol.Infect.* **14**:446-453.
121. **Telenti, A., W. J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J. M. Musser, and W. R. Jacobs, Jr.** 1997. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat.Med.* **3**:567-570.
122. **Alcaide, F., G. E. Pfyffer, and A. Telenti.** 1997. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:2270-2273.
123. **Sreevatsan, S., K. E. Stockbauer, X. Pan, B. N. Kreiswirth, S. L. Moghazeh, W. R. Jacobs, Jr., A. Telenti, and J. M. Musser.** 1997. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:1677-1681.
124. **Plinke, C., S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann.** 2006. Significance of mutations in *embB* codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:1900-1902.
125. **Shen, X., G. M. Shen, J. Wu, X. H. Gui, X. Li, J. Mei, K. DeRiemer, and Q. Gao.** 2007. Association between *embB* codon 306 mutations and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **51**:2618-2620.
126. **Safi, H., B. Sayers, M. H. Hazbon, and D. Alland.** 2008. Transfer of *embB* codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:2027-2034.
127. **Mokrousov, I., T. Otten, B. Vyshnevskiy, and O. Narvskaya.** 2002. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J.Clin.Microbiol.* **40**:3810-3813.
128. **Lee, A. S., S. N. Othman, Y. M. Ho, and S. Y. Wong.** 2004. Novel mutations within the *embB* gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:4447-4449.
129. **Ahmad, S., A. A. Jaber, and E. Mokaddas.** 2007. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. *Tuberculosis (Edinb.)* **87**:123-129.
130. **Perdigao, J., R. Macedo, A. Ribeiro, L. Brum, and I. Portugal.** 2009. Genetic characterisation of the ethambutol resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence and significance of *embB306* mutations. *Int.J.Antimicrob.Agents* **33**:334-338.

131. **Plinke, C., H. S. Cox, S. Kalon, D. Doshetov, S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann.** 2009. Tuberculosis ethambutol resistance: concordance between phenotypic and genotypic test results. *Tuberculosis.(Edinb.)* **89**:448-452.
132. **Ramaswamy, S. V., A. G. Amin, S. Goksel, C. E. Stager, S. J. Dou, S. H. El, S. L. Moghazeh, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2000. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:326-336.
133. **Parsons, L. M., M. Salfinger, A. Clobridge, J. Dormandy, L. Mirabello, V. L. Polletta, A. Sanic, O. Sinyavskiy, S. C. Larsen, J. Driscoll, G. Zickas, and H. W. Taber.** 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:2218-2225.
134. **Safi, H., R. D. Fleischmann, S. N. Peterson, M. B. Jones, B. Jarrahi, and D. Alland.** 2010. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical *embCAB* gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **54**:103-108.
135. **Scorpio, A. and Y. Zhang.** 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat.Med.* **2**:662-667.
136. **Cheng, S. J., L. Thibert, T. Sanchez, L. Heifets, and Y. Zhang.** 2000. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:528-532.
137. **Sreevatsan, S., X. Pan, Y. Zhang, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:636-640.
138. **Lemaitre, N., W. Sougakoff, C. Truffot-Pernot, and V. Jarlier.** 1999. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *pncA*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1761-1763.
139. **Finken, M., P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede, and E. C. Bottger.** 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol.Microbiol.* **9**:1239-1246.
140. **Dobner, P., G. Bretzel, S. Rusch-Gerdes, K. Feldmann, M. Rifai, T. Loscher, and H. Rinder.** 1997. Geographic variation of the predictive values of genomic mutations associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol.Cell Probes* **11**:123-126.
141. **Wong, S. Y., J. S. Lee, H. K. Kwak, L. E. Via, H. I. Boshoff, and C. E. Barry, III.** 2011. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **55**:2515-2522.

142. **Spies, F. S., P. E. da Silva, M. O. Ribeiro, M. L. Rossetti, and A. Zaha.** 2008. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:2947-2949.
143. **Alangaden, G. J., B. N. Kreiswirth, A. Aouad, M. Khetarpal, F. R. Igno, S. L. Moghazeh, E. K. Manavathu, and S. A. Lerner.** 1998. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:1295-1297.
144. **Maus, C. E., B. B. Plikaytis, and T. M. Shinnick.** 2005. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:3192-3197.
145. **Jugheli, L., N. Bzekalava, R. P. de, K. Fissette, F. Portaels, and L. Rigouts.** 2009. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:5064-5068.
146. **Sirgel, F. A., M. Tait, R. M. Warren, E. M. Streicher, E. C. Bottger, P. D. van Helden, N. C. Gey van Pittius, G. Coetzee, E. Y. Hoosain, M. Chabula-Nxiweni, C. Hayes, T. C. Victor, and A. Trollip.** 2011. Mutations in the *rrs* A1401G gene and phenotypic resistance to amikacin and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb.Drug Resist.* **18**:193-197.
147. **Maus, C. E., B. B. Plikaytis, and T. M. Shinnick.** 2005. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:571-577.
148. **Zaunbrecher, M. A., R. D. Sikes, Jr., B. Metchock, T. M. Shinnick, and J. E. Posey.** 2009. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**:20004-20009.
149. **Takiff, H. E., L. Salazar, C. Guerrero, W. Philipp, W. M. Huang, B. Kreiswirth, S. T. Cole, W. R. Jacobs, Jr., and A. Telenti.** 1994. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:773-780.
150. **Maruri, F., T. R. Sterling, A. W. Kaiga, A. Blackman, Y. F. van der Heijden, C. Mayer, E. Cambau, and A. Aubry.** 2012. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J.Antimicrob.Chemother.* **67**:819-831.
151. **Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam, and J. M. Musser.** 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:9869-9874.

152. **Escribano, I., J. C. Rodriguez, B. Llorca, E. Garcia-Pachon, M. Ruiz, and G. Royo.** 2007. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemotherapy* **53**:397-401.
153. **Devasia, R., A. Blackman, S. Eden, H. Li, F. Maruri, A. Shintani, C. Alexander, A. Kaiga, C. W. Stratton, J. Warkentin, Y. W. Tang, and T. R. Sterling.** 2011. High proportion of fluoroquinolone-resistant *M. tuberculosis* isolates with novel gyrase polymorphisms and a *gyrA* region associated with fluoroquinolone susceptibility. *J.Clin.Microbiol.* **50**:1390-6.
154. **Canetti, G., N. Rist, and J. Grosset.** 1963. 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)* **27**:217-272.
155. **Canetti, G., S. Froman, J. Grosset, P. Haudroy, M. Langeriva, H. T. Mahler, G. Meissner, D. A. Mitchison, and L. Sula.** 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull.World Health Organ* **29**:565-578.
156. **Roberts, G. D., N. L. Goodman, L. Heifets, H. W. Larsh, T. H. Lindner, J. K. McClatchy, M. R. McGinnis, S. H. Siddiqi, and P. Wright.** 1983. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *J.Clin.Microbiol.* **18**:689-696.
157. **Siddiqi, S. H., J. E. Hawkins, and A. Laszlo.** 1985. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. *J.Clin.Microbiol.* **22**:919-923.
158. **Garrigo, M., L. M. Aragon, F. Alcaide, S. Borrell, E. Cardenosa, J. J. Galan, J. Gonzalez-Martin, N. Martin-Casabona, C. Moreno, M. Salvado, and P. Coll.** 2007. Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **45**:1766-1770.
159. **Espasa, M., M. Salvado, E. Vicente, G. Tudo, F. Alcaide, P. Coll, N. Martin-Casabona, M. Torra, D. Fontanals, and J. Gonzalez-Martin.** 2012. Evaluation of the VersaTREK system compared to the Bactec MGIT 960 system for first-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **50**:488-491.
160. **World Health Organization.** 2008. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
161. **Jacobs, W. R., Jr., R. G. Barletta, R. Udani, J. Chan, G. Kalkut, G. Sosne, T. Kieser, G. J. Sarkis, G. F. Hatfull, and B. R. Bloom.** 1993. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science* **260**:819-822.

162. **Wilson, S. M., Z. al-Suwaidi, R. McNerney, J. Porter, and F. Drobniewski.** 1997. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat.Med.* **3**:465-468.
163. **Gali, N., J. Dominguez, S. Blanco, C. Prat, M. D. Quesada, L. Matas, and V. Ausina.** 2003. Utility of an in-house mycobacteriophage-based assay for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J.Clin.Microbiol.* **41**:2647-2649.
164. **Gali, N., J. Dominguez, S. Blanco, C. Prat, F. Alcaide, P. Coll, and V. Ausina.** 2006. Use of a mycobacteriophage-based assay for rapid assessment of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to isoniazid and influence of resistance level on assay performance. *J.Clin.Microbiol.* **44**:201-205.
165. **Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini, and T. Bodmer.** 1993. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:2054-2058.
166. **Xu, H. B., R. H. Jiang, W. Sha, L. Li, and H. P. Xiao.** 2010. PCR-single-strand conformational polymorphism method for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. *J.Clin.Microbiol.* **48**:3635-3640.
167. **Rossau, R., H. Traore, B. H. De, W. Mijs, G. Jannes, R. P. de, and F. Portaels.** 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:2093-2098.
168. **Morgan, M., S. Kalantri, L. Flores, and M. Pai.** 2005. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC.Infect.Dis.* **5**:62.
169. **Tortoli, E. and F. Marcelli.** 2007. Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. *Eur. J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **26**:51-55.
170. **Hillemann, D., M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter, and S. Niemann.** 2005. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J.Clin.Microbiol.* **43**:3699-3703.
171. **Ling, D. I., A. A. Zwerling, and M. Pai.** 2008. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur.Respir.J.* **32**:1165-1174.
172. **Bwanga, F., S. Hoffner, M. Haile, and M. L. Joloba.** 2009. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. *BMC.Infect.Dis.* **9**:67.

173. **Hillemann, D., S. Rusch-Gerdes, and E. Richter.** 2006. Application of the Genotype MTBDR assay directly on sputum specimens. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **10**:1057-1059.
174. **Barnard, M., H. Albert, G. Coetzee, R. O'Brien, and M. E. Bosman.** 2008. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **177**:787-792.
175. **Feng, Y., S. Liu, Q. Wang, L. Wang, S. Tang, J. Wang, and W. Lu.** 2013. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using Genotype MTBDRs/ Assay: A meta-analysis. *PLoS.One* **8**:e55292.
176. **Ajbani, K., C. Nikam, M. Kazi, C. Gray, C. Boehme, K. Balan, A. Shetty, and C. Rodrigues.** 2012. Evaluation of genotype MTBDRsl assay to detect drug resistance associated with fluoroquinolones, aminoglycosides and ethambutol on clinical sediments. *PLoS.One* **7**:e49433.
177. **Garcia de Viedma, D., M. del Sol Díaz Infantes, F. Lasala, F. Chaves, L. Alcalá, and E. Bouza.** 2002. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **40**:988-995.
178. **Espasa, M., J. Gonzalez-Martin, F. Alcaide, L. M. Aragon, J. Lonca, J. M. Manterola, M. Salvado, G. Tudo, P. Orus, and P. Coll.** 2005. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. *J.Antimicrob.Chemother.* **55**:860-865.
179. **Ramirez, M. V., K. C. Cowart, P. J. Campbell, G. P. Morlock, D. Sikes, J. M. Winchell, and J. E. Posey.** 2010. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J.Clin.Microbiol.* **48**:4003-4009.
180. **Pholwat, S., S. Heysell, S. Stroup, S. Foongladda, and E. Houpt.** 2011. Rapid first- and second-line drug susceptibility assay for *Mycobacterium tuberculosis* isolates by use of quantitative PCR. *J.Clin.Microbiol.* **49**:69-75.
181. **Luo, T., L. Jiang, W. Sun, G. Fu, J. Mei, and Q. Gao.** 2011. Multiplex real-time PCR melting curve assay to detect drug-resistant mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **49**:3132-3138.
182. **Boehme, C. C., M. P. Nicol, P. Nabeta, J. S. Michael, E. Gotuzzo, R. Tahirli, M. T. Gler, R. Blakemore, W. Wordria, C. Gray, L. Huang, T. Caceres, R. Mehdiyev, L. Raymond, A. Whitelaw, K. Sagadevan, H. Alexander, H. Albert, F. Cobelens, H. Cox, D. Alland, and M. D. Perkins.** 2011. 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* **377**:1495-1505.
183. **Barnard, M., N. C. Gey van Pittius, P. D. van Helden, M. Bosman, G. Coetzee, and R. M. Warren.** 2012. The diagnostic performance of the



- GenoType MTBDR*plus* version 2 line probe assay is equivalent to that of the Xpert MTB/RIF assay. *J.Clin.Microbiol.* **50**:3712-3716.
184. **Alonso, M., J. J. Palacios, M. Herranz, A. Penedo, A. Menendez, E. Bouza, and d. Garcia, V.** 2011. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J.Clin.Microbiol.* **49**:2688-2690.
  185. **Van Rie, A., K. Mellet, M. A. John, L. Scott, L. Page-Shipp, H. Dansey, T. Victor, and R. Warren.** 2012. False-positive rifampicin resistance on Xpert(R) MTB/RIF: case report and clinical implications. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **16**:206-208.
  186. **Vernet, G., C. Jay, M. Rodrigue, and A. Troesch.** 2004. Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. *J.Appl.Microbiol.* **96**:59-68.
  187. **Tang, X., S. L. Morris, J. J. Langone, and L. E. Bockstahler.** 2005. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance. *J.Microbiol.Methods* **63**:318-330.
  188. **Gryadunov, D., V. Mikhailovich, S. Lapa, N. Roudinskii, M. Donnikov, S. Pan'kov, O. Markova, A. Kuz'min, L. Chernousova, O. Skotnikova, A. Moroz, A. Zasedatelev, and A. Mirzabekov.** 2005. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin.Microbiol.Infect.* **11**:531-539.
  189. **Aragon, L. M., F. Navarro, V. Heiser, M. Garrigo, M. Espanol, and P. Coll.** 2006. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J.Antimicrob.Chemother.* **57**:825-831.
  190. **Garcia-Sierra, N., A. Lcoma, C. Prat, L. Haba, J. Maldonado, J. Ruiz-Manzano, P. Gavin, S. Samper, V. Ausina, and J. Dominguez.** 2011. Pyrosequencing for rapid molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* **49**:3683-3686.
  191. **Engstrom, A., N. Morcillo, B. Imperiale, S. E. Hoffner, and P. Jureen.** 2012. Detection of first- and second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by pyrosequencing. *J.Clin.Microbiol.* **50**:2026-2033.
  192. **Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane, and P. M. Small.** 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**:1520-1523.
  193. **Brewer, T. F.** 2000. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin.Infect.Dis.* **31 Suppl 3**:S64-S67.
  194. **Brandt, L., C. J. Feino, O. A. Weinreich, B. Chilima, P. Hirsch, R. Appelberg, and P. Andersen.** 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis*

- BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect.Immun.* **70**:672-678.
195. **Young, D. and C. Dye.** 2006. The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell* **124**:683-687.
196. **Brooks, J. V., A. A. Frank, M. A. Keen, J. T. Bellisle, and I. M. Orme.** 2001. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect.Immun.* **69**:2714-2717.
197. **Martin, C., A. Williams, R. Hernandez-Pando, P. J. Cardona, E. Gormley, Y. Bordat, C. Y. Soto, S. O. Clark, G. J. Hatch, D. Aguilar, V. Ausina, and B. Gicquel.** 2006. The live *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* **24**:3408-3419.
198. **Asensio, J. A., A. Arbues, E. Perez, B. Gicquel, and C. Martin.** 2008. Live tuberculosis vaccines based on *phoP* mutants: a step towards clinical trials. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **8**:201-211.
199. **Centers for Disease Control and Prevention.** 1998. Development of new vaccines for tuberculosis recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis (ACET). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **47**(RR13):1-6.
200. **Cardona, P. J., I. Amat, S. Gordillo, V. Arcos, E. Guirado, J. Diaz, C. Vilaplana, G. Tapia, and V. Ausina.** 2005. Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine* **23**:1393-1398.
201. **Vilaplana, C., E. Montane, S. Pinto, A. M. Barriocanal, G. Domenech, F. Torres, P. J. Cardona, and J. Costa.** 2010. Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine* **28**:1106-1116.
202. **Williamson, D. A., I. Basu, J. Bower, J. T. Freeman, G. Henderson, and S. A. Roberts.** 2012. An evaluation of the Xpert MTB/RIF assay and detection of false-positive rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **74**:207-209.
203. **Friedrich, S. O., F. von Groote-Bidlingmaier, and A. H. Diacon.** 2011. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* **49**:4341-4342.
204. **Nagesh, B. S., S. Sehgal, S. K. Jindal, and S. K. Arora.** 2001. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid. *Chest* **119**:1737-1741.
205. **Pai, M., L. L. Flores, A. Hubbard, L. W. Riley, and J. M. Colford, Jr.** 2004. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC.Infect.Dis.* **4**:6.
206. **Trajman, A., M. Pai, K. Dheda, S. R. van Zyl, A. A. Zwerling, R. Joshi, S. Kalantri, P. Daley, and D. Menzies.** 2008. Novel tests for diagnosing

- tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur.Respir.J.* **31**:1098-1106.
207. **Vassall, A., K. S. van, H. Sohn, J. S. Michael, K. R. John, B. S. den, J. L. Davis, A. Whitelaw, M. P. Nicol, M. T. Gler, A. Khaliqov, C. Zamudio, M. D. Perkins, C. C. Boehme, and F. Cobelens.** 2011. Rapid diagnosis of tuberculosis with the Xpert MTB/RIF assay in high burden countries: a cost-effectiveness analysis. *PLoS.Med.* **8**:e1001120.
208. **Theron, G., A. Pooran, J. Peter, R. van Zyl-Smit, M. H. Kumar, R. Meldau, G. Calligaro, B. Allwood, S. K. Sharma, R. Dawson, and K. Dheda.** 2012. Do adjunct tuberculosis tests, when combined with Xpert MTB/RIF, improve accuracy and the cost of diagnosis in a resource-poor setting? *Eur.Respir.J.* **40**:161-168.
209. **Steingart, K.R., H. Sohn, I. Schiller; L. A. Kloda, C. C. Boehme, M. Pai, N. Dendukuri.** 2013. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* **1**: CD009593.
210. **World Health Organization.** 2013. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
211. **Bhanu, N. V., S. D. van, J. D. van Embden, and P. Seth.** 2004. Two *Mycobacterium fortuitum* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in Delhi harbour IS6110 homologue. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **48**:107-110.
212. **Kent, L., T. D. McHugh, O. Billington, J. W. Dale, and S. H. Gillespie.** 1995. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp.? *J.Clin.Microbiol.* **33**:2290-2293.
213. **Tudo, G., E. Rey, S. Borrell, F. Alcaide, G. Codina, P. Coll, N. Martin-Casabona, M. Montemayor, R. Moure, A. Orcau, M. Salvado, E. Vicente, and J. Gonzalez-Martin.** 2010. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J.Antimicrob.Chemother.* **65**:2341-2346.
214. **Hillemann, D., S. Rusch-Gerdes, and E. Richter.** 2009. Feasibility of the GenoType MTBDR<sub>s</sub> assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* **47**:1767-1772.







## VIII. ANEXO





## Silent Mutation in *rpoB* Detected from Clinical Samples with Rifampin-Susceptible *Mycobacterium tuberculosis*

We read with great interest the note of Alonso et al. (1) concerning the existence of a silent mutation in *rpoB* in *Mycobacterium tuberculosis* strains. In this note, the authors describe a phenomenon already observed by several study groups. The misassignment of phenotypic resistance due to the results of molecular tests, whenever there is an absence of hybridization with wild-type probes, is a matter of great relevance.

Our experience with the Xpert system in clinical samples, which we have published in part elsewhere (3), corroborates the results obtained by Alonso et al. (1) in clinical strains. In fact, in our series of almost 150 specimens retrospectively studied and detected as positive for the *Mycobacterium tuberculosis* complex with Xpert MTB/RIF, the system also reported a “Rif resistance detected” result in eight cases, six of which showed a lack of hybridization with probe E and two a lack of hybridization with probe B. The isolates corresponding to these samples had already been analyzed for susceptibility testing using the Bactec 460 radiometric method. Of the eight isolates defined as resistant by Xpert MTB/RIF, two were phenotypically susceptible to rifampin (those with the probe B failure). Sequencing confirmed that these two isolates (1.4%) had a silent TTC (Phe)-to-TTT (Phe) shift (the same replacement found in the isolates included in the study by Alonso et al. [1]).

In our opinion, these data highlight the importance of correct interpretation of results of rifampin resistance when working with molecular tests, since this drug is the cornerstone of antituberculosis treatment (6). Even though therapeutic alternatives to the use of rifampin are available, the noninclusion of this drug, based on a misleading molecular test result suggesting resistance, may have undesirable clinical and epidemiological consequences—all the more so when, as in our study, the detection is made directly in clinical specimens (2, 3), since this means that rifampin is excluded from the very beginning of the drug therapy.

We would also like to comment on the conclusion of Alonso et al. (1) regarding the need for confirmation of the results for drug resistance obtained by the molecular tests, especially when the detection of mutations (and therefore the assumption of resistance) is based on the “absence of hybridization

with the wild-type probe” pattern. Even though these methods are a very useful preliminary measure, phenotypic susceptibility testing is still the gold standard for determining the real drug resistance of the clinical isolates (4, 5). We also stress that specifications and reports of the results provided by the commercial molecular systems should be precise and rigorous and should not automatically correlate genetic mutation with phenotypic resistance.

### REFERENCES

1. Alonso, M., et al. 2011. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J. Clin. Microbiol.* **49**:2688–2690.
2. Boehme, C. C., et al. 2011. 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* **377**: 1495–1505.
3. Moure, R., et al. 2011. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* **49**:1137–1139.
4. WHO. 2010. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). 2010 Global report on surveillance and response. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
5. WHO. 2011. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Technical and operational ‘how to.’ Practical considerations. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
6. WHO. 2010. Treatment of tuberculosis guidelines, 4th ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

**Raquel Moure**

**Rogelio Martín**

**Fernando Alcaide\***

*Department of Microbiology*

*IDIBELL-Bellvitge Hospital*

*Department of Pathology and Experimental Therapeutics*

*University of Barcelona*

*Feixa Llarga s/n*

*08907 L'Hospitalet Llobregat, Barcelona, Spain*

\*Phone: 34 93 2607930

Fax: 34 93 2607547

E-mail: falcaide@bellvitgehospital.cat

*Ed. Note:* The authors of the published article did not feel that a reply was necessary.