



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA   
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Microbiología y Ecología

**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización epidemiológica, clínica, microbiológica y  
genómica de *Mycobacterium tuberculosis* en el  
Departamento de Salud La Fe de Valencia**

Presentada por

**Ana Gil-Brusola**

Licenciada en Medicina y Cirugía

Valencia, 2017





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA [ ( ) ]  
Facultat de Medicina i Odontologia

Programa de Doctorado 3139 Medicina: Microbiología

**Caracterización epidemiológica, clínica, microbiológica y  
genómica de *Mycobacterium tuberculosis* en el  
Departamento de Salud La Fe de Valencia**

Presentada por

**Ana Gil-Brusola**

Dirigida por

**Dr. José Miguel Nogueira Coito**

**Dr. Iñaki Comas Espadas**

Valencia, 2017



El **Prof. Dr. JOSÉ MIGUEL NOGUEIRA COITO**, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Doctor Peset de Valencia y Profesor titular del Departamento de Microbiología y Ecología en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

El **Dr. IÑAKI COMAS ESPADAS**, Científico titular del Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigación Científica

CERTIFICAN:

Que la Licenciada en Medicina y Cirugía **ANA GIL BRUSOLA**, ha realizado, bajo su dirección en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia, el trabajo titulado:

**“CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA Y GENÓMICA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD LA FE DE VALENCIA”**, habiendo sido revisado y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Valencia, septiembre de 2017



## **AGRADECIMIENTOS**

Muchos sois los que me habéis acompañado y ayudado a lo largo de estos años de tesis doctoral, ya fuera preguntándome cómo iba (no fuera a ser que se me olvidara terminarla) o aportándome información y guiándome en su redacción. A todos vosotros, os mencione o no a continuación, ¡muchas gracias!

Gracias a mis directores por haberme orientado a la hora de realizar este trabajo. Al Prof. José Miguel Nogueira porque, sin conocerme prácticamente de nada, aceptó la tarea de ser mi director, invirtiendo sus pocos ratos libres en mí, siendo paciente conmigo y docente, encaminándome a no dejar de perseguir y centrarme en el objetivo del estudio. Al Dr. Iñaki Comas por haber confiado en mí y haberme abierto las puertas de un campo en pleno desarrollo, el de la secuenciación, demostrando que para la lucha frente a una enfermedad tan versátil como la tuberculosis, es preciso actuar en equipo desde distintas disciplinas, aunando herramientas de trabajo.

Esta tesis no estaría finalizada sin la ayuda de mis primeros tutores y jefes, el Dr. Gobernado y la Dra. Santos, ambos ejemplares en su dedicación a la Microbiología. A ellos les debo toda mi formación, incluso estando jubilados, porque nunca han dejado de enseñarme y siguen sorprendiéndome.

Gracias al Dr. Pemán, mi jefe de Sección, que me ha apoyado desde un principio, me ha aleccionado a no rendirme y ha sido capaz de leer este trabajo y darme sus consejos, desinteresadamente.

A mi actual jefe de Servicio, el Dr. López Hontangas, que me ha permitido acudir a cursos y congresos y me ha dado permisos sin cuestionar en ningún momento mi capacidad.

A mis compañeros y compañeras del Servicio de Microbiología, gracias a todos. Y en concreto a M<sup>a</sup> José Giménez, pilar de apoyo diario. Gracias por recordarme que esto era posible y por buscar datos interesantes con los que hacer más valiosa esta tesis. Contigo escribí mi primer artículo, y ahora me has ayudado a presentar este trabajo. Eva M<sup>a</sup> González, tú me ayudaste a inscribirme, así que te agradezco que me ayudaras a empezar el camino. M<sup>a</sup> José Guillot, Violeta, Javi, Yolanda y todos los que habéis hecho y hacéis el trabajo diario en la Sección de Micobacterias, sin vuestra precisión, no obtendríamos resultados.

Al equipo multidisciplinar que hace posible el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis en el HUP La Fe. A los compañeros del Servicio de Neumología y la Unidad de Enfermedades Infecciosas, gracias por vuestras anamnesis detalladas que han facilitado la recogida de datos y a los radiólogos y anatomopatólogos, que también contribuís al diagnóstico de esta enfermedad.

A David Hervás, estadístico del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, por su colaboración en el análisis de datos.

Al equipo de trabajo del FISABIO, en concreto Luis Villamayor e Irving Cancino, que me han solucionado cualquier duda al momento. A Elvira Pérez, siempre pendiente de nuevas declaraciones, y Francisco González, del CSISP, quien planteó inicialmente esta colaboración con nuestro Servicio.

*Y last but not least*, mi familia, gracias a mis padres por todo lo que me han dado, enseñado y ayudado, y a mi marido, por entender y aceptar que invirtiera y siga invirtiendo horas de estudio a expensas de momentos de disfrute y descanso. Os debo mucho.



## RESUMEN

**ANTECEDENTES:** La tuberculosis (TB) es una enfermedad asociada a importante morbi-mortalidad en todo el mundo. En la Comunidad Valenciana (CV), al igual que en el resto de España, la tasa de TB según datos oficiales ha disminuido entre el año 2011 y 2015, así como el porcentaje de enfermos inmigrantes y coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), descenso que no se ha visto reflejado, sin embargo, en los datos oficiales del Departamento de Salud (DS) La Fe. La inmigración desde países de alta endemia de TB hace necesario revisar la epidemiología de los pacientes atendidos en el Hospital Universitario y Politécnico (HUP) La Fe y el patrón de resistencias de las cepas aisladas, para comprobar la utilidad de las nuevas técnicas moleculares incorporadas, así como la de la secuenciación completa del genoma (SCG) de *Mycobacterium tuberculosis*, método que está siendo evaluado como herramienta para el diagnóstico precoz de la enfermedad y de predicción de resistencias.

**OBJETIVO:** Conocer las características epidemiológicas y clínicas de los enfermos con TB confirmada por microbiología en el HUP La Fe de Valencia entre enero de 2011 y diciembre de 2015, así como la repercusión de la SCG de los aislados de MTBC en la gestión de los pacientes.

**METODOLOGÍA:** Estudio descriptivo retrospectivo de las características de los pacientes con TB confirmada por microbiología en el HUP La Fe entre 2011 y 2015 y análisis comparativo con los resultados de linaje y resistencias obtenidos tras SCG de las cepas aisladas en 2014 y 2015.

**RESULTADOS PRINCIPALES:** De los 194 casos confirmados en el HUP La Fe, sólo el 39,8% pertenecían al DS La Fe, por lo que las tasas calculadas no se corresponden con los datos oficiales. La tasa media fue de 9,7 casos/100.000 hab, con mortalidad

asociada del 5%. La edad media de los enfermos fue 39,6 años, con un 5,7% de casos en edad infantil, un 10% de coinfectados con el VIH y un 51,3% de inmigrantes, no presentando este grupo diferencias importantes respecto al resto. La mayoría de los casos se concentraron en Torrefiel-Rascaña, en Secciones Censales de alta vulnerabilidad. La presentación clínica predominante fue la pulmonar (62,9%), y la existencia de coinfección con VIH se asoció a forma extrapulmonar. El tiempo de crecimiento medio en medio líquido fue 14,87 días frente a 21,4 en medio sólido. Hubo un 16% de resistencia fenotípica a los fármacos de primera línea, con resistencia a isoniacida (INH) del 9,2% y a rifampicina (RIF) del 3,6%. El linaje predominante fue el L4, con linajes distintos al L4 en pacientes extranjeros. La concordancia kappa de la resistencia detectada por SCG con la fenotípica fue para INH 0,95 (IC: 0,83-0,999) y para RIF 0,999, siendo las mutaciones más frecuentes las localizadas en -15 *fabG1-inhA* y codón 315 del gen *katG* para el primer fármaco y codón 450 del gen *rpoB* para el segundo.

CONCLUSIONES: A pesar de que la tasa de TB es menor, el número de inmigrantes afectados es mayor al estimado en el resto de la CV y de España. La presencia de enfermedades de base no es determinante para el desarrollo de enfermedad tuberculosa, pero sí para el desarrollo de formas extrapulmonares, en concreto en el caso de coinfección con VIH. Las técnicas de biología molecular ayudan al diagnóstico, siendo más útiles en las formas pulmonares y en la detección precoz de resistencia a RIF. La SCG es una herramienta más precisa que las moleculares, en concreto para la detección precoz de resistencia a INH en nuestra área, y para el estudio epidemiológico de contactos.

## SUMMARY

**BACKGROUND:** Tuberculosis (TB) is a disease associated with significant morbidity and mortality throughout the world. In the Valencian Community (CV), as in the rest of Spain, the TB rate according to official data has decreased between 2011 and 2015, as well as the percentage of immigrant patients and of those coinfecting with the human immunodeficiency virus (HIV), a decline that has not been reflected, however, in the official data of the Health Department (DS) La Fe. Immigration from high endemic TB countries, makes it necessary to review the epidemiology of patients attended at the Hospital Universitario y Politécnico (HUP) La Fe and the resistance pattern of the isolated strains, to verify the usefulness of the recently introduced molecular techniques, as well as that of the whole genome sequencing (WGS) of *Mycobacterium tuberculosis*, a tool that is being evaluated for early diagnosis of the disease and prediction of resistance to first line drugs.

**OBJECTIVE:** To determine the epidemiological and clinical characteristics of patients with microbiologically confirmed TB at the HUP La Fe of Valencia, Spain, between January 2011 and December 2015, as well as the usefulness of WGS of MTBC isolates in the management of the patients.

**METHODS:** Retrospective study of the characteristics of patients with TB confirmed by microbiology in HUP La Fe between 2011 and 2015 and comparative analysis with the results of lineage and resistance obtained after WGS of isolated strains during 2014 and 2015.

**MAIN RESULTS:** Of the 194 confirmed cases, only 39.8% belonged to DS La Fe, so the calculated rates do not correspond to the official data. The mean incidence rate

was 9.7 cases / 100,000 inhabitants, with associated mortality of 5%. The mean age of the patients was 39.6 years, with 5.7% of cases in childhood, 10% of co-infection with HIV and 51.3% of cases in immigrants. Most of the cases were concentrated in Torrefiel-Rascaña, in highly vulnerable Censal Sections. The predominant clinical presentation was pulmonary TB (62.9%), and the existence of HIV co-infection was associated with extrapulmonary forms. The mean growth time in liquid medium was 14.87 days versus 21.4 in solid medium. Phenotypic resistance to first line drugs accounted for 16% of cases - isoniazid (INH) resistance of 9.2% and rifampicin (RIF) of 3.6%. The predominant lineage was L4, with non-L4 lineages in foreign patients. The kappa concordance of phenotypic resistance to the resistance detected by WGS was for INH 0.95 (IC: 0.83-0.999) and for RIF 0.999, with the most frequent mutations being located in -15 *fabG1-inhA* and codon 315 of the *katG* gene for INH and codon 450 of the *rpoB* gene for RIF.

CONCLUSIONS: Although the rate of TB is lower in DS La Fe than estimated for the rest of the CV and Spain, the percentage of immigrants affected is higher. The presence of underlying disease is not determinant for the development of TB; however, it is for the development of extrapulmonary TB, specifically in the case of HIV co-infection. Molecular biology techniques aid in the diagnosis, being more useful in pulmonary presentations and in the early detection of RIF resistance. WGS is a more precise tool, specifically for the early detection of INH resistance in our area, and for contact tracing.

A Dani, Carla, Marcos y Ana

A mis padres



## ÍNDICE

<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1. Historia natural de la tuberculosis.....	5
2. Epidemiología .....	7
3. Formas de presentación clínica .....	13
4. Tratamiento .....	20
5. Prevención .....	25
6. Diagnóstico microbiológico .....	26
7. Secuenciación genómica .....	39
<b>II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>III MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
1. Recogida de datos epidemiológicos y de presentación clínica .....	56
2. Procesamiento microbiológico de las muestras.....	59
3. Secuenciación e interpretación del genoma completo .....	63
4. Método estadístico .....	66
<b>IV RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL .....</b>	<b>71</b>
1. Datos epidemiológicos y de presentación clínica .....	71
1.1 Generalidades, mapas de localización y estudio de contactos .....	74
1.2 Factores de riesgo.....	87
1.3 Manifestaciones clínicas en global y en grupos de riesgo.....	93
2. Resultados microbiológicos .....	97
3. Resultados de secuenciación completa del genoma.....	105
<b>V CONCLUSIONES .....</b>	<b>125</b>
<b>VI BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>129</b>
<b>VII ANEXOS.....</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO I: Informe científico y ético de Investigación. ....</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO II: Encuesta epidemiológica de tuberculosis de la CV.....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO III: Tabla resumen de las características de los pacientes VIH positivos.....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO IV: Resumen de las características de los enfermos menores de 15 años..</b>	<b>150</b>
<b>ANEXO V: Resumen de las características de pacientes con cepas secuenciadas...</b>	<b>151</b>





## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura I.1:</b> Incidencia estimada de tuberculosis en el mundo en el año 2015. ....	9
<b>Figura I.2:</b> Granuloma en un paciente con TB. ....	15
<b>Figura I.3:</b> RMN (Mal de Pott).....	16
<b>Figura I.4:</b> Colonias de <i>M. tuberculosis</i> en medio de cultivo de Löwenstein. ....	26
<b>Figura I.5:</b> Inyección intradérmica de PPD en antebrazo para realizar Mantoux.....	28
<b>Figura I.6:</b> Proceso de extracción de tubos para Quantiferon®TB Gold In Tube.....	29
<b>Figura I.7:</b> Micobacterias del MTBC teñidas con ZN formando un cordón .....	32
<b>Figura I.8:</b> Resultado positivo para MTBC por Xpert® MTB/RIF, sensible a RIF. ....	35
<b>Figura I.9:</b> Resultado de prueba molecular de sensibilidad GenoType MTBDRplus.....	35
<b>Figura I.10:</b> Resultado de la prueba molecular Anyplex™ II MTB/MDR/XDR.....	36
<b>Figura I.11:</b> Distribución de los linajes dominantes de MTBC en el mundo.....	41
<b>Figura I.12:</b> Distribución de los linajes de MTBC siguiendo las migraciones.....	41
<b>Figura IV.1:</b> Casos de TB diagnosticados por año.....	71
<b>Figura IV.2:</b> Distribución de los enfermos según intervalo de edad.....	75
<b>Figura IV.3:</b> Localización de la residencia habitual de los enfermos .....	75
<b>Figura IV.4:</b> Ampliación de la Figura IV.3.....	76
<b>Figura IV.5:</b> Ampliación de la zona Torrefiel-Rascaña. En verde el .....	76
<b>Figura IV.6:</b> Resumen de los resultados obtenidos tras realizar análisis MIRU-VNTR...	77
<b>Figura IV.7:</b> Número de casos según años de antigüedad de contacto.....	78
<b>Figura IV.8:</b> Residencia habitual de los enfermos que desconocían contacto previo. ..	79
<b>Figura IV.9:</b> Resultados de detección de ITL en los enfermos con ambas pruebas.....	81
<b>Figura IV.10:</b> Porcentaje de empleo/desempleo de los enfermos con TB.....	87
<b>Figura IV.11:</b> Evolución del porcentaje de enfermos con TB coinfectados con VIH. ....	89
<b>Figura IV.12:</b> Porcentaje de enfermos por región de origen. ....	91
<b>Figura IV.13:</b> Número total de enfermos por región de origen y año. ....	91
<b>Figura IV.14:</b> Distribución por edad, sexo y procedencia (en naranja los inmigrantes).91	
<b>Figura IV.15:</b> Presentación clínica de tuberculosis. Número de casos por año.....	93
<b>Figura IV.16:</b> Forma de presentación clínica de TB según enfermedades de base. ....	95
<b>Figura IV.17:</b> Tiempos de crecimiento según medio de cultivo para muestras de esputo.....	100

<b>Figura IV.18:</b> Distribución de enfermos por región de procedencia. ....	<b>106</b>
<b>Figura IV.19:</b> Distribución de linajes de las cepas secuenciadas según <i>PhyResSE</i> .....	<b>106</b>
<b>Figura IV.20:</b> Distribución de linajes en cepas aisladas en enfermos extranjeros.....	<b>107</b>
<b>Figura IV.21:</b> Comparación del linaje con forma de presentación clínica.....	<b>109</b>
<b>Figura IV.22:</b> Comparación entre la sensibilidad fenotípica y de secuenciación de cada cepa (marcadas en rojo las discordancias por antituberculoso) .....	<b>115</b>
<b>Figura IV.23:</b> Comparación del linaje con el patrón de sensibilidad de las cepas. ....	<b>116</b>
<b>Figura IV.24:</b> Evolución de mutaciones en muestras de un mismo paciente. ....	<b>117</b>
<b>Figura IV.25:</b> Residencia habitual de los enfermos cuyas cepas se han secuenciado, marcando en azul los linajes distintos al L4 .....	<b>118</b>
<b>Figura IV.26:</b> Árbol filogenético, estudio de sensibilidad (en verde sensible, en rojo resistente) según WGS y linaje (por colores de las ramas: L4 en rojo, L3 en morado, L2 en azul y L1 en rosa fucsia) de las cepas secuenciadas.....	<b>120</b>

## INDICE TABLAS

<b>Tabla I.1:</b> Resumen de los datos de los Informes de Tuberculosis de la CV 2011-2015.	<b>12</b>
<b>Tabla I.2:</b> Grupos de fármacos antituberculosos de segunda línea.	<b>23</b>
<b>Tabla I.3:</b> Métodos de diagnóstico disponibles en ITL y enfermedad tuberculosa.	<b>27</b>
<b>Tabla I.4:</b> Principales genes de MTBC asociados a resistencia a fármacos.	<b>43</b>
<b>Tabla III.1:</b> Población asignada al DS La Fe por año de estudio (habitantes).	<b>58</b>
<b>Tabla III.2:</b> Resistencias conocidas detectadas por <i>PhyResSE</i> .	<b>65</b>
<b>Tabla IV.1:</b> Comparación de los resultados emitidos en los Informes de TB de la CV con los obtenidos en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe.	<b>72</b>
<b>Tabla IV.2:</b> Resumen de las características epidemiológicas según forma de presentación clínica.	<b>74</b>
<b>Tabla IV.3:</b> Características de los enfermos con prueba de tuberculina negativa.	<b>80</b>
<b>Tabla IV.4:</b> Características de los enfermos con Quantiferon® negativo.	<b>81</b>
<b>Tabla IV.5:</b> Resumen de los casos con antecedentes de TB.	<b>84</b>
<b>Tabla IV.6:</b> Características de los pacientes que fallecieron tras el diagnóstico de TB.	<b>86</b>
<b>Tabla IV.7:</b> Enfermos de tuberculosis con enfermedad subyacente por año.	<b>87</b>
<b>Tabla IV.8:</b> Número y tipo de formas extrapulmonares por año.	<b>94</b>
<b>Tabla IV.9:</b> Tabla de contingencia país de procedencia-forma de presentación clínica.	<b>95</b>
<b>Tabla IV.10:</b> Distribución de las muestras positivas según año de aislamiento.	<b>97</b>
<b>Tabla IV.11:</b> Tinción, medios de cultivo y días de crecimiento por tipo de muestra.	<b>98</b>
<b>Tabla IV.12:</b> Tabla de contingencia país de procedencia-sensibilidad de la cepa.	<b>102</b>
<b>Tabla IV.13:</b> Características de los enfermos con cepas resistentes, sin las becegeitis.	<b>101</b>
<b>Tabla IV.14:</b> Tabla de mutaciones detectadas con el programa <i>PhyResSE</i> .	<b>111</b>
<b>Tabla IV.15:</b> Lista de las cepas secuenciadas que presentaban resistencia fenotípica a alguno de los fármacos antituberculosos de primera línea.	<b>112</b>



## ABREVIATURAS

<b>ADA:</b> Adenosindeaminasa	<b>ECU:</b> Ecuador
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>EII:</b> Enfermedad inflamatoria intestinal
<b>AGI:</b> Aminoglucósidos inyectables	<b>EMB:</b> Etambutol
<b>AK:</b> Amikacina	<b>ETH:</b> Etionamida
<b>ARG:</b> Argentina	<b>ESP:</b> España
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>FDA:</b> <i>Food and Drugs Administration</i>
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>FISABIO:</b> Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica
<b>AU:</b> Tinción auramina-rodamina	<b>FQ:</b> Fluoroquinolonas
<b>BAAR:</b> Bacilo ácido-alcohol resistente	<b>FRA:</b> Francia
<b>BCG:</b> Bacilo Calmette Guérin	<b>GAM:</b> Gambia
<b>BGR:</b> Bulgaria	<b>GHA:</b> Ghana
<b>BOL:</b> Bolivia	<b>GNQ:</b> Guinea Ecuatorial
<b>CAM:</b> Camerún	<b>HUP:</b> Hospital Universitario y Politécnico
<b>CAST:</b> Centro de Atención a "sin techo"	<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b> Interferón gamma
<b>CDC:</b> <i>Center for Diseases Control</i>	<b>IGRA:</b> Ensayo para la detección de IFN- $\gamma$
<b>CHN:</b> China	<b>IND:</b> India
<b>CIV:</b> Costa de Marfil	<b>INH:</b> Isoniacida
<b>CMI:</b> Concentración mínima inhibitoria	<b>ITL:</b> Infección tuberculosa latente
<b>CPR:</b> Capreomicina	<b>KAN:</b> Kanamicina
<b>CSISP:</b> Centro Superior de Investigación en Salud Pública	<b>L:</b> Linaje
<b>CV:</b> Comunidad Valenciana	<b>LCR:</b> Líquido cefalorraquídeo
<b>DES:</b> <i>DNA extraction solution</i> (tampón de extracción del ADN)	<b>LEV:</b> Levofloxacino
<b>DM:</b> Diabetes mellitus	<b>LJ:</b> Cultivo Löwenstein-Jensen
<b>DOM:</b> República Dominicana	<b>LPA:</b> <i>Line-probe assay</i> (hibridación sondas)
<b>DOTS:</b> <i>Directly observed treatment, short-course</i> (tratamiento observado)	<b>LSPs:</b> <i>Large sequence polymorphisms</i> (Polimorfismos de secuencia larga)
<b>DR:</b> Estudio de sensibilidad molecular	<b>LTU:</b> Lituania
<b>DS:</b> Departamento de Salud	<b>LZD:</b> Linezolid
<b>DST:</b> Estudio de sensibilidad fenotípica	<b>MAR:</b> Marruecos
<b>DZA:</b> Argelia	<b>MDR-TB:</b> Tuberculosis multirresistente
	<b>MGIT:</b> <i>Middlebrook Growth Indicator Tube</i>

**MIRU-VNTR:** Tipado de las unidades de repetición dentro del genoma de MTBC

**MNT:** Micobacterias no tuberculosas

**MPB64:** Antígeno específico de MTBC

**MRR:** Mutaciones asociadas a resistencia

**MTBC:** complejo *M. tuberculosis*

**MXF:** Moxifloxacino

**NGA:** Nigeria

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de Salud

**PAAF:** Punción aspiración con aguja fina

**PAK:** Pakistán

**PAS:** Ácido para-aminosalicílico

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PPD:** Derivado proteico purificado

**PRK:** Corea del Norte

**PZA:** Pirazinamida

**PT:** Prueba de tuberculina

**QTF:** *Quantiferon®-TB Gold In Tube*

**RD1:** Región de delección

**RedMIVA:** Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana

**RFLP:** Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

**RIF:** Rifampicina

**ROS:** Receptor de órgano sólido

**ROU:** Rumanía

**RRDR:** Región de resistencia a RIF del gen *rpoB*

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**RUS:** Rusia

**SCG:** Secuenciación completa genoma

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SIP:** Sistema de Información Poblacional

**SNC:** Sistema nervioso central

**STR:** Estreptomina

**TB:** Tuberculosis

**TBEP:** TB extrapulmonar

**TBP:** TB pulmonar

**TC:** Tomografía computerizada

**TD:** Tiempo transcurrido hasta el diagnóstico microbiológico

**TE:** Tris con ácido etilendiaminotetraacético

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**UE:** Unión Europea

**UKR:** Ucrania

**VFR:** *Visiting friends and relatives*

**VHB:** Virus de la hepatitis B

**VHC:** Virus de la hepatitis C

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**VPN:** Valor predictivo negativo

**VPP:** Valor predictivo positivo

**WGS-DR:** Resistencias detectadas por SCG

**WTC:** *Wild-type control* (cepa silvestre)

**XRDR-TB:** Tuberculosis extremadamente resistente

**ZN:** Tinción Ziehl Neelsen

## **INTRODUCCIÓN**





## I INTRODUCCIÓN

La distribución geográfica y características epidemiológicas de la tuberculosis (TB) están bien definidas en el mundo, pero los movimientos poblacionales podrían contribuir a cambios en las características epidemiológicas, clínicas, patrón de resistencia y capacidad de infección de las cepas aisladas en cada región. El descenso de casos de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en nuestra área y su mejor control, el aumento del número de trasplantes realizados y de enfermos que reciben tratamiento inmunosupresor por diversas enfermedades, así como las migraciones, pueden haber modificado la epidemiología y características clínicas de esta enfermedad en nuestro Departamento de Salud (DS).

En los últimos quince años se ha producido una evolución en los métodos de diagnóstico, con la aparición de nuevas técnicas microbiológicas, moleculares e incluso genómicas para el diagnóstico de la TB, cuya incorporación al quehacer habitual en el Servicio de Microbiología, hace necesaria la evaluación de su repercusión en los distintos aspectos de la enfermedad. La utilidad de las técnicas moleculares en concreto, viene determinada por la epidemiología local, puesto que detectan dianas concretas del genoma de la micobacteria que no siempre están presentes en todas las regiones del planeta.

La técnica más recientemente desarrollada, aunque aún no incorporada al trabajo diario de los laboratorios clínicos, es la secuenciación completa del genoma (SCG) de las micobacterias incluidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC).

Esta aproximación se emplea a día de hoy para conocer y analizar las posibles vías de transmisión en el campo de la epidemiología molecular, pero en países como el Reino Unido ya se están realizando estudios para incorporar este método diagnóstico al laboratorio de los hospitales para reducir el tiempo hasta la identificación de especie y de resistencias a fármacos antituberculosos.

Con este trabajo se pretende profundizar en el conocimiento del perfil de la enfermedad tuberculosa atendida actualmente en el DS La Fe de Valencia, considerando aspectos epidemiológicos (edad, sexo, país de origen y hábitos de cada enfermo) y clínicos (forma de presentación y enfermedad de base) y compararlos con lo declarado por los sistemas de salud pública. Además, se valorará la utilidad de las técnicas para el diagnóstico microbiológico de las micobacteriosis que se han ido incorporando y se analizará la información obtenida tras la SCG de MTBC, comparándola con la obtenida por otras técnicas disponibles en nuestro Servicio.

De esta manera, pretendemos ahondar en el conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad en nuestra área, mejorar el rendimiento del protocolo de diagnóstico actual de la Sección de Micobacterias del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario y Politécnico (HUP) La Fe y tratar de correlacionar la información obtenida de la secuenciación completa de las cepas de MTBC con los datos fenotípicos y genotípicos obtenidos por los métodos disponibles en la actualidad en este Servicio.

## 1. Historia natural de la tuberculosis

La TB es una enfermedad presente desde los inicios de la humanidad. Ya en murales de momias egipcias del año 4.000 a.C. se observan lesiones vertebrales sugerentes de esta enfermedad (1), aunque no es posible confirmar su causalidad en seres humanos antes del siglo XIX. En 1882, Robert Koch descubrió el agente causal de esta enfermedad, un microorganismo con forma bacilar presente en muestras de enfermos con tuberculomas, hemoptisis y aspecto caquético, características que le confirieron el nombre de tuberculosis, *phtysis* (griego) o *consumptione* (latín) a la enfermedad (2).

Hace más de 15.000 años que existen micobacterias causantes de enfermedad en animales (3). Actualmente se reconocen distintas especies de micobacterias dentro del MTBC capaces de causar clínica tuberculosa: *M. tuberculosis* (el más frecuente en humanos), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*, aunque algunos estudios consideran a esta última una subespecie de *M. tuberculosis* (4).

*M. bovis* es la más antigua de las especies incluidas en el MTBC y se cree que su evolución a patógeno humano se debió a la domesticación de los animales (5). Engloba las subespecies *bovis* y *caprae*, causa síntomas gastrointestinales en humanos, se transmite por ingestión de derivados lácteos no pasteurizados y es la especie empleada para el desarrollo de la vacuna del bacilo de Calmette-Guérin (BCG).

La especie *M. africanum*, cuya primera descripción data de 1968, ha sido aislada con distinta frecuencia en varios países del continente africano y, aunque en un principio se clasificó en dos subtipos, I y II, recientemente se ha descrito que sólo el subtipo I, predominante en África Occidental, sería el que coincide con la cepa patrón y que el subtipo II sería en realidad *M. tuberculosis sensu stricto* (6). *M. microti* afecta con mayor frecuencia a roedores y su aislamiento en humanos ha sido esporádico (7).

La TB es una enfermedad de transmisión interhumana principalmente por vía respiratoria, a través de gotitas de Flügge eliminadas por el enfermo al toser, estornudar o escupir. El riesgo de transmisión es mayor a partir de aquellos enfermos con micobacterias en sus muestras respiratorias, es decir, bacilíferos (8), pero también los enfermos no bacilíferos pueden transmitirla (9). Una vez inhaladas, las micobacterias se reproducen en los alvéolos pulmonares, a un ritmo lo suficientemente lento como para no activar la inmunidad celular del huésped. Una vez que el macrófago alveolar está repleto de micobacterias que es incapaz de contener, éstas son expulsadas del mismo e invaden nuevos alvéolos próximos, causando mayor daño celular. En este momento se pone en marcha el sistema inmunitario del huésped, que, si es adecuado, permitirá la destrucción de las micobacterias o su encapsulación. Algunas micobacterias pueden quedar previamente en estadio de latencia dentro de los macrófagos, de forma que éstos no presentarán antígenos en su membrana y no serán, por tanto, correctamente destruidos, con la posibilidad de reactivación si el sistema inmunitario del enfermo infectado dejara de ser competente (10).

Se estima que una tercera parte de la población mundial tiene infección tuberculosa latente (ITL), aunque es difícil definir este término. Hay estudios que sugieren que, incluso con tratamiento, algunos bacilos podrían persistir (11). El riesgo de enfermar de una persona infectada es del 5 al 10% a lo largo de toda su vida, variando el tiempo hasta el desarrollo de enfermedad, siendo más frecuente en los dos primeros años tras el contagio, pero pudiendo llegar a presentarse hasta más de 10 años postinfección (12). Entre los factores que se han asociado a mayor riesgo de desarrollo de enfermedad destacan la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ser receptor de órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos, la silicosis, ser conviviente o contacto estrecho del enfermo bacilífero y la diálisis renal (13); sin embargo, muchas personas que enferman no recordarán ni reconocerán ningún posible foco de contagio.

## **2. Epidemiología**

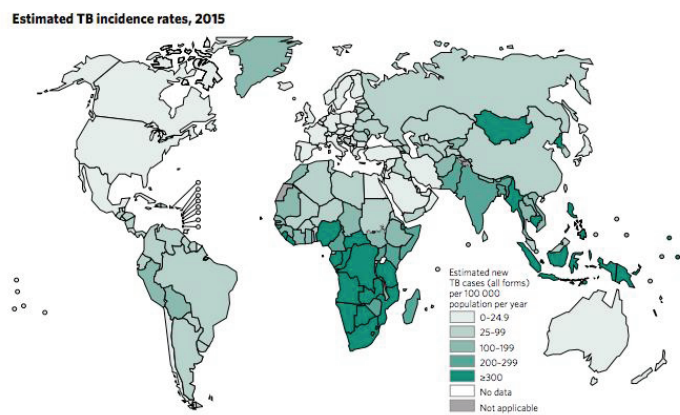
La TB es una enfermedad de ámbito mundial, que afecta mayoritariamente a personas que viven en situaciones precarias de higiene y hacinamiento. Con la mejora de las condiciones sanitarias hubo un descenso importante en su prevalencia, pero la llegada de la epidemia del VIH la hizo resurgir, y la enfermedad causada por las micobacterias incluidas en el MTBC era, a finales del siglo XX, la infección causante del mayor número de muertes en el mundo (14).

A pesar de que el número de casos declarados de TB ha disminuido respecto a finales del siglo XX, esta enfermedad sigue causando elevada morbi-mortalidad en personas de todo el mundo.

En un informe de 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS) resumía la situación de la enfermedad en el año 2012 (15): i) se mantienen los progresos hacia la consecución de las metas mundiales de reducción de los casos y la mortalidad por TB a la mitad de la registrada en 1990 para 2015, aunque las regiones de África y Europa aún no están en camino de lograr este objetivo; ii) el acceso al tratamiento ha sido ampliado, consiguiendo salvar 20 millones de vida; iii) la innovación en las pruebas diagnósticas ha sido evidente, sobre todo con el desarrollo de una técnica rápida de detección de TB multirresistente (MDR-TB); iv) existen avances en la detección de coinfección por VIH y TB, pero los progresos en la lucha contra la MDR-TB son lentos y la financiación del tratamiento y control de la enfermedad no son adecuados.

En el año 2014, según datos de la OMS, alrededor de 9,6 millones de personas padecieron TB, un 18% menos que en el año 2000, y murieron un millón y medio por causas relacionadas con la misma, un 47% menos que en 1994, 140.000 de ellas menores de edad (16). La tasa media mundial fue de 133 casos/100.000 habitantes, variando por regiones, con el mayor número de casos declarados en el sudeste asiático, y con una tasa media en África de más de 281 casos/100.000 habitantes (17). Sin embargo, en 2015 el número de casos aumentó respecto al año anterior, enfermaron 10,4 millones de personas; el 83% de los casos se declararon en 22 países y el 60% de los mismos se concentraron en 5 países: Indonesia, Nigeria, China, Pakistán y Sudáfrica

(Figura I.1). En este año, 1,8 millones de personas murieron a consecuencia de la TB. Más del 95% de las muertes fueron en países con nivel socioeconómico bajo y medio, siendo la principal causa de muerte en aquellos coinfectados por VIH (18). La información recogida en la nota descriptiva de la OMS en octubre de 2016 sitúa a la TB entre las 10 principales causas de mortalidad del mundo, por delante de la malaria.



En: WHO. Global Tuberculosis Report 2016. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>

**Figura I.1:** Incidencia estimada de tuberculosis en el mundo en el año 2015.

La resistencia a los fármacos antituberculosos está muy extendida; India, China, Rusia y Sudáfrica reúnen casi el 60% de los casos mundiales de MDR-TB y Europa del Este y Asia Central también presentan un número elevado de resistencias. En 2010, se registraron 81.000 casos de MDR-TB en Europa, casi el 20% de los declarados en el mundo. En 2012, la OMS consideraba que la TB era la causa del fallecimiento de 7 personas a la hora en la región europea, reflejando el aumento de los casos de MDR-TB y la ineficacia de las estrategias de control (15). En 2014 se declararon 40.302 casos de TB en Ucrania, dos tercios del total de casos declarados en toda la Unión Europea (UE),

siendo un 34% de estos MDR-TB (19). En 2015 la OMS estimó 480.000 episodios de MDR-TB en todo el mundo.

En España, en 2013, la incidencia de TB declarada fue 11,88 casos/100.000 habitantes, descendiendo en 2014 a 10,8, ambas tasas ligeramente inferiores a la media de la UE, con más de 30 casos/100.000 habitantes en estos dos años (20). Es importante saber que en países como Rumania y Ucrania la tasa fue de 83,5 y 106/100.000 habitantes, respectivamente.

En la Comunidad Valenciana (CV) también se observa un descenso mantenido en la incidencia declarada de la TB en las últimas décadas, disminuyendo de 24 casos/100.000 habitantes en 1998 a 8,4/100.000 habitantes en 2015 (21); sin embargo, estas cifras podrían ser inferiores a las reales, entre otras razones, porque se trata de una enfermedad infradiagnosticada en nuestro entorno ya que no siempre es incluida en la sospecha diagnóstica. Además, en nuestra región, existen inmigrantes en situación irregular que no aparecen en los censos y que, a no ser que su vida corra peligro, no acuden a los centros sanitarios. En el año 1998 los casos de TB en personas nacidas fuera de España representaban el 2,7% de todos los casos notificados, se incrementaron hasta el 37,6% en el año 2008, siendo del 28,8% en 2014. Según el Informe de Tuberculosis de la CV del año 2011, la tasa global de TB por 100.000 habitantes era de 11,9 (15,3 en varones y 8,6 en mujeres) y la tasa en extranjeros residentes en la CV de 22,9/100.000 habitantes, habiéndose reducido progresivamente desde 2008 (39,9/100.000 habitantes) (22). La reciente llegada de refugiados podría hacer que este descenso que se observa desde hace menos de diez años, vuelva a sufrir variación, ya



que muchos de los inmigrantes a nuestra región proceden de los países con mayores tasas de resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea.

Desde 1994, la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han acordado tres estrategias frente a la TB: “DOTS” (*Directly observed treatment, short-course*) en 1994 (23), “Alto a la Tuberculosis” en 2006 (24) y “Fin de la Tuberculosis” en 2014 (25). La última de éstas, marca como uno de sus objetivos principales la reducción de la tasa de incidencia en un 90% entre los años 2015 y 2035 o, lo que es lo mismo, conseguir llegar a un máximo de 10 casos de TB por cada 100.000 habitantes, cifra similar a la declarada en nuestra Comunidad. El descenso del 1,5% anual desde el año 2000 declarado por la OMS sería insuficiente para alcanzar los objetivos de la estrategia *Fin de la Tuberculosis*. El diagnóstico precoz, con inclusión de pruebas de sensibilidad a los fármacos antituberculosos y pruebas sistemáticas de detección en contactos, se menciona en el primero de los tres apartados de esta estrategia, mientras que en el tercero se hace hincapié en el descubrimiento, desarrollo y aplicación de nuevas técnicas diagnósticas. En resumen, en su nueva estrategia, *End TB Strategy (2016-2035)*, la OMS incluye como una de sus metas el diagnóstico precoz de la TB así como el estudio de sensibilidad antituberculosa universal, por lo que los laboratorios de microbiología tienen un papel crítico en la era post-2015.

El Servicio de Microbiología del HUP La Fe está integrado en la Red de Vigilancia Microbiológica (RedMIVA) de la CV, un sistema de información de la Conselleria de Sanitat que recoge los resultados de los Servicios de Microbiología de todos los hospitales de la CV, los almacena y analiza. A estos datos se les asocian los del paciente

desde el Sistema de Información Poblacional (SIP) o el Sistema de Admisión de los hospitales, para posteriormente difundir esta información de forma activa (los usuarios consultan lo que les interesa) o pasiva (mediante la generación y envío periódico de informes) (26). Anualmente se redacta un Informe de Tuberculosis, que resume el número de casos de TB declarados en toda la CV y en cada DS en concreto, describiendo las características de los enfermos y presentando los resultados de sensibilidad *in vitro* de las cepas de MTBC aisladas. Así, en 2011, se declararon 607 casos de TB en la CV y en el DS La Fe, 30 (30,8% de resistencia global); en 2012, 508 y en el DS La Fe, 25 (10% de resistencia global), con 38 enfermos ingresados; en 2013, 512 y en el DS La Fe 32 (18,5% de resistencia global), con 39 pacientes ingresados; en 2014, 424 y en el DS La Fe 27 (16,7% de resistencia global), con 38 enfermos ingresados; y en 2015, 421 y en el DS La Fe 27 (21,1% de resistencia global), con 22 casos ingresados (26). En la Tabla I.1 se resumen los datos de la CV entre los años 2011 y 2015.

**Tabla I.1:** Resumen de los datos de los Informes de tuberculosis de la CV 2011-2015.

Año	Tasa CV (100.000/h)	Edad media	Varones (%)	VIH (%)	Inmigrantes (%)	Tasa DS La Fe (100.000/h)
2011	11,9	41,8	63,9	10,4	13	16,6
2012	9,9	42,1	65,7	6,7	8,9	13,9
2013	10	39,9	63,9	5,1	9,6	18,1
2014	8,3	45,9	59,2	5,9	7,1	15,3
2015	8,4	45,2	61,8	5,2	12,4	9,7

Tabla adaptada de datos extraídos de [www.sp.san.gva.es](http://www.sp.san.gva.es)

### **3. Formas de presentación clínica**

La forma de presentación más frecuente de esta enfermedad es la **TB pulmonar**. Clásicamente se ha dividido esta forma clínica en primaria y reactivación, aunque las similares manifestaciones radiográficas hacen difícil su diferenciación. La forma primaria es más común en niños, aunque se está observando también en adultos (23-34%). La forma post-primaria es casi siempre la consecuencia de la reactivación de una ITL, aunque en ocasiones es la continuación de una infección primaria, y se observa principalmente en adolescentes y adultos jóvenes.

Los síntomas en la TB aparecen de forma gradual, en un periodo que puede durar de semanas a meses, aunque puede ser más aguda en niños e inmunodeprimidos (27). Los síntomas más comunes en los enfermos con TB pulmonar son fiebre vespertina, sudoración nocturna, tos productiva o no, hemoptisis en ocasiones, anorexia y pérdida de peso. La triada de fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso aparece en un 75%, 45% y 55%, respectivamente, mientras que la tos persistente se da hasta en un 95% de los enfermos (28).

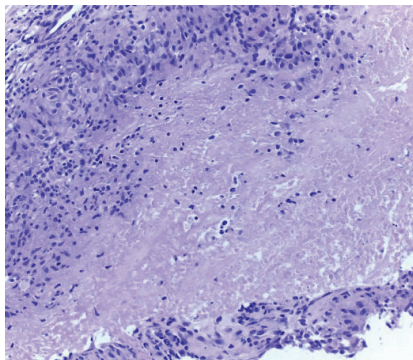
En la radiografía de tórax de un enfermo con TB pulmonar primaria es fácil encontrar afectación parenquimatosa, adenopatías y derrame pleural, pero hasta en un 15% de los casos no se observan hallazgos patológicos (29). La tomografía computerizada (TC) de tórax muestra áreas de consolidación bien definidas. Las formas de reactivación se acompañan generalmente de cavitaciones pulmonares (30).

A pesar de que el pulmón es el órgano diana, en un 10-20% de los casos en enfermos inmunocompetentes y hasta en más del 50% en los inmunodeprimidos otros sistemas también pueden verse afectados, por lo que es importante descartar coinfección por el VIH y realizar cribado de ITL en enfermos que vayan a recibir inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) u otros tratamientos inmunomoduladores (31). El diagnóstico de la TB extrapulmonar (TBEP) es difícil, puesto que puede simular otras enfermedades, los resultados del cribado de ITL son variables, no siempre hay granulomas ni micobacterias visibles en las muestras clínicas y el cultivo tiene menor rendimiento. Es importante, por lo tanto, considerar también el uso de técnicas diagnósticas de biología molecular y otros marcadores como la adenosindeaminasa (ADA) o valorar cualquier lesión sugestiva en las pruebas radiográficas, teniendo en cuenta que un resultado negativo no excluye el diagnóstico cuando la evidencia clínica es importante (32). La sospecha clínica es crucial para realizar las pruebas diagnósticas confirmatorias e iniciar tratamiento adecuado lo antes posible.

En la **TB pleural**, los hallazgos radiográficos (TC con adenopatías, infiltrados o cavitación) y las características bioquímicas del líquido pleural (exudado con predominio linfocitario, glucosa baja y niveles de ADA > 47 U/L) ayudan al diagnóstico. La confirmación microbiológica no siempre es posible, ya que las tinciones sólo muestran bacilos en un 5% y el cultivo es positivo en menos del 40% de los casos. El diagnóstico molecular de líquido pleural es específico, pero poco sensible. La biopsia pleural tiene mayor rentabilidad diagnóstica que el líquido. El tratamiento es efectivo, pero puede haber complicaciones como empiema, fibrotórax o fistulización.

## Introducción

La localización ganglionar (**linfadenitis TB**) es la más común de las formas extrapulmonares, habiéndose descrito hasta en el 40% de las formas de TBEP en los Estados Unidos y siendo la causa de más del 50% de las linfadenitis cervicales en Pakistán (33,34). Antiguamente se conocía con el nombre de escrófula, siendo su localización más común el triángulo cervical anterior, ganglios submandibulares y supraclaviculares, seguida de la mediastínica, axilar, mesentérica, hepatoportal, peripancreática e inguinal (35). Es frecuente en enfermos VIH positivos y en los niños mayores de 14 años en India. Los ganglios linfáticos afectados son pequeños e indoloros, pero pueden llegar a fistulizarse si no se tratan. En el caso de afectación intraabdominal, el enfermo puede debutar con disfagia e incluso perforación intestinal. No suele presentar síntomas sistémicos, la radiografía de tórax suele ser normal y el cribado de ITL es normalmente positivo. Para su diagnóstico etiológico se recomienda realizar una biopsia de la adenopatía, mejor que la punción aspiración con aguja fina (PAAF). El tratamiento es similar al de la forma pulmonar y suele tener buen pronóstico. El fenómeno paradójico o empeoramiento transitorio es posible al inicio del tratamiento y se ha descrito hasta en un 25% de casos (36).



(Imagen cedida por el Servicio de Anatomía Patológica del HUP La Fe)

**Figura I.2:** Granuloma teñido con hematoxilina-eosina hallado en un paciente con TB.

La forma más frecuente de la **TB musculoesquelética** es la vertebral (Mal de Pott o espondilitis TB), en la columna dorsal baja y lumbar y se puede asociar a absceso paravertebral. La artritis TB se presenta con mayor frecuencia en las articulaciones que mayor peso soportan, como cadera y rodilla, y suele ser monoarticular, aunque se han descrito formas poliarticulares (37). En la radiografía se aprecia inflamación de tejidos blandos y reducción del espacio articular. Rara vez se observa afectación pulmonar concomitante. Aunque el cultivo del líquido sinovial puede ser positivo, la biopsia ofrece mayor rendimiento diagnóstico. El tratamiento suele requerir cirugía, con desbridamiento y drenaje.



(Imagen cedida por el Servicio de Radiodiagnóstico del HUP La Fe)

**Figura I.3:** RMN con destrucción de dos cuerpos vertebrales secundaria a TB (Mal de Pott)

La afectación del **sistema nervioso central** (SNC) incluye meningitis TB, tuberculoma intracraneal y aracnoiditis espinal. Es más frecuente en niños pequeños y VIH positivos. El líquido cefalorraquídeo (LCR) presenta proteinorraquia (100-500 mg/dL), pleocitosis mononuclear (100-500 células), aunque al principio puede haber predominio de polimorfonucleares, hipogluorraquia (< 45 mg/dL) y elevación de la concentración de ADA. El rendimiento diagnóstico de la baciloscopia y el cultivo del LCR

aumenta si se procesan cuatro muestras, prefiriéndose el último tubo de cada extracción y mejor si se procesa tras centrifugación. Las técnicas moleculares tienen una especificidad del 100%, pero su sensibilidad no supera el 60%. La TC con contraste es útil y puede observarse aracnoiditis basilar, edema, infartos cerebrales, hidrocefalia y tuberculomas. La clínica de la meningitis tuberculosa puede derivar a un coma de rápida instauración, por lo que su sospecha es esencial y debe iniciarse tratamiento empírico precoz y prolongarlo hasta 12 meses. En este caso, existe suficiente evidencia como para aconsejar el uso de corticoides (38).

La presentación de la **TB abdominal** puede ser en forma de enteritis o peritonitis. En las enteritis se afecta con mayor frecuencia la región ileocecal, con úlceras, hipertrofia y en ocasiones fístulas o abscesos perirrectales. Cursa con dolor abdominal crónico e inespecífico, astenia, fiebre, alteración del tránsito intestinal y ascitis. La peritonitis es más frecuente en inmunodeprimidos por reactivación de foco latente de TB en peritoneo tras diseminación hematogena, y cursa con ascitis, dolor abdominal crónico y anemia normocítica normocrómica. El líquido peritoneal presenta leucocitosis de predominio linfocitario (50-4000 células/dL), proteínas >3 mg/dL y elevación de ADA (>33 U/L) (39). Aunque la radiografía con contraste de bario y la TC son útiles, la biopsia es la prueba recomendada para confirmar el diagnóstico.

La **TB genitourinaria** representa el 8-20% de los casos de TBEP, según el país. Puede afectar al riñón, epidídimo y próstata, en adultos jóvenes varones, con disuria, hematuria macroscópica, piuria y cálculos renales e infertilidad. También puede presentarse como endometritis tuberculosa, más frecuente en mujeres jóvenes de

países endémicos o ancianas con historia de TB sin tratamiento adecuado, afectando la trompa y el endometrio con mayor frecuencia. En general, el tiempo entre la infección y la aparición de esta forma de enfermedad es de unos 20 años, lo que justificaría la aparición de síntomas en jóvenes (40). A pesar de esto, en países como India sí se ha descrito esta forma de presentación en la infancia (41). Para un adecuado diagnóstico microbiológico son necesarias 3 muestras de orina de primera hora de la mañana o biopsia de los órganos genitales. El tratamiento es el mismo que en la forma pulmonar y la cirugía puede ser necesaria en presencia de abscesos.

La **pericarditis tuberculosa** supone un 1-2% de los casos y se manifiesta como disnea y dolor torácico con cardiomegalia, derrame pericárdico, engrosamiento de la pared con dilatación auricular e incluso calcificaciones pericárdicas. La biopsia pericárdica es la muestra más rentable para su diagnóstico; como alternativa, la pericardiocentesis permitirá extraer líquido pericárdico que podrá tener aumento de proteínas, leucocitosis, elevación de ADA y la baciloscopia positiva en un 40-60% de los casos. En esta forma de presentación, al tratamiento habitual se le deberán añadir corticoides en caso de pericarditis constrictiva.

Se considera **TB miliar** a la progresión o diseminación de la enfermedad que puede llevar a fallo multiorgánico. El término fue acuñado en el año 1700 por John Jacob Manget, quien describió una forma diseminada de tuberculosis en la que se observaban múltiples lesiones similares a semillas de *millet* (mijo), que tenía peor pronóstico. Es la forma de presentación más frecuente en la infancia (42) y, en niños de zonas endémicas, pueden encontrarse en ocasiones lesiones cutáneas, como pápulas y máculas



eritematosas (*tuberculosis miliaria cutis*), una presentación menos frecuente en los vacunados con BCG (43). En adultos inmunocompetentes, representa menos del 2% de las formas de TB y aproximadamente el 20% de las formas extrapulmonares (44). En enfermos inmunocomprometidos este porcentaje es mayor, llegando al 50% de los casos de TBEP en los infectados por el VIH. En ancianos, la forma críptica de TB miliar puede confundirse con metástasis. Los factores predisponentes descritos, aunque no probados, para esta forma de TB son: edad pediátrica, malnutrición, VIH/SIDA, enolismo, diabetes mellitus (DM), enfermedad hepática crónica, diálisis, receptor de trasplante de órgano, conectivopatía, embarazo, posparto, neoplasia y silicosis (45). El uso de corticoesteroides, inmunosupresores y tratamiento biológico con fármacos de anticuerpos monoclonales anti-TNF (infliximab, etanercept y adalimumab) han sido asociados a TB miliar en pacientes con artritis reumatoide (46). En un estudio reciente, se comparaba el riesgo y tiempo hasta el desarrollo de TB miliar en enfermos con anti-TNF, siendo el riesgo mayor para infliximab y adalimumab que para etanercept, y el tiempo menor para infliximab (5,5 meses de media frente a 13,4 para etanercept y 18,5 para adalimumab) (47). En esta forma de presentación, se observan en la TC múltiples nódulos de 2-3 mm de diámetro en pulmón en un 85% de los casos. Los hallazgos de laboratorio incluyen anemia, hiponatremia y alteración del recuento de glóbulos blancos y las muestras más útiles para el diagnóstico de confirmación son la médula ósea y la biopsia esplénica (48).

#### 4. Tratamiento

El tratamiento de la TB en los enfermos considerados *naïve* (nuevos), es decir, aquellos que nunca han sido tratados o que han recibido tratamiento previo durante menos de un mes, consiste en la administración de los 4 fármacos de primera línea isoniacida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) durante dos meses de fase intensiva y posteriormente reducir a los dos primeros durante cuatro meses más en la fase de continuación. Es importante no administrar los fármacos en monoterapia para evitar el riesgo de desarrollo de resistencias y facilitar que el enfermo complete el período de tratamiento. Hace años se aconsejaba el uso de sólo tres fármacos en la primera etapa del tratamiento, principalmente cuando no se sospechaba riesgo de resistencia, pero las directrices de la OMS ya no aprueban esta práctica (47).

El tratamiento debe ser preferiblemente directamente observado (DOTS), se iniciará lo antes posible y, en ocasiones, deberá prolongarse la fase intensiva y administrarse hasta nueve meses o más, especialmente en casos de cavitación o cultivo positivo a los 2 meses de tratamiento, resistencia *in vitro* o respuesta incompleta y localizaciones extrapulmonares (49). En el caso de meningitis, pericarditis o TB miliar con hipoxemia incontrolable, la asociación de corticoesteroides ha demostrado ser muy beneficiosa para el enfermo (50).

La **INH** es un compuesto relacionado con la nicotinamida que se introdujo en 1952. Inhibe la síntesis de los ácidos micólicos, componente principal en la envoltura de la micobacteria que interviene en su impermeabilidad (51). Es un profármaco que se

activa por la catalasa peroxidasa codificada por el gen *katG* de la micobacteria. Es bactericida frente a las micobacterias metabólicamente activas y bacteriostático frente a los bacilos latentes.

La **RIF** es un antibiótico semisintético derivado de la rifamicina B, producida por *Streptomyces mediterranei*. Se introdujo en 1967 y es bactericida frente a los bacilos que están tanto en fase de multiplicación activa como los que están metabólicamente inactivos. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con la subunidad beta de la polimerasa del ácido ribonucleico (ARN) (52) inhibiendo el ARN mensajero y con ello la transcripción. Esta subunidad está codificada por el gen *rpoB*, por lo que mutaciones en el mismo podrán causar resistencia a este fármaco.

El **EMB** es un fármaco sintético, bacteriostático, que disminuye la aparición de resistencias a otros fármacos antituberculosos. Es una etilendiamina que altera la biosíntesis del arabinogalactano de la pared micobacteriana (53). Su diana es el operón *embCAB* de la micobacteria.

La introducción de la **PZA**, derivado sintético de la nicotinamida, permitió acortar la duración del tratamiento a 6 meses, al actuar como bactericida sobre los bacilos tuberculosos latentes (54). Es un profármaco que se metaboliza a su forma activa (ácido pirazinoico) por la pirazinamidasa micobacteriana codificada por el gen *pncA*.

Se asume que existe resistencia al tratamiento antituberculoso de primera línea cuando persisten los síntomas a los dos meses de inicio del mismo a pesar de buen

cumplimiento, hay recaída al poco tiempo de finalizarlo correctamente o persisten los cultivos positivos a los cuatro meses de inicio del tratamiento. En los países en vías de desarrollo, en los que es difícil realizar cultivo y la baciloscopia es la única técnica disponible, la observación de bacilos característicos en muestras clínicas a los dos meses de inicio de tratamiento es suficiente para cambiar el mismo, aunque en nuestra área, donde existen otros métodos, es importante esperar porque en muchos casos lo que se observa son bacilos no viables en el contexto de tratamiento correcto (55). La confirmación definitiva de resistencia *in vitro* debe realizarse en el laboratorio de microbiología.

La resistencia se clasifica en primaria o adquirida, según el enfermo haya recibido o no tratamiento previo frente a la TB. Además, según el número y tipo de fármacos a los que sea resistente, se clasificará como: monorresistente (resistencia a un único fármaco de primera línea), polirresistente (resistencia a más de uno que no sean INH y RIF juntos), multirresistente o MDR-TB (resistencia a INH y RIF simultáneamente) y extremadamente resistente o XDR (MDR-TB con resistencia además a una fluoroquinolona y a un aminoglucósido inyectable).

Los fármacos disponibles en caso de MDR-TB se dividieron hasta el año 2016 en 5 grupos: orales de segunda línea, aminoglucósidos inyectables (AGi), fluoroquinolonas (FQ), bacteriostáticos orales de segunda línea y aquellos sin papel claro frente a la TB (56). La nueva guía de la OMS, publicada en 2016, los clasifica en 4 grupos, resumidos en la Tabla I.2 (57).

**Tabla I.2:** Grupos de fármacos antituberculosos de segunda línea.

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	
Fluorquinolonas	AG inyectables	Otros	Complementarios ( <i>add-on agents</i> )	
Levofloxacino Moxifloxacino Gatifloxacino	Amikacina Capreomicina Kanamicina (STR)	Etionamida/ Proteonamida Cicloserina/ Terizidona Clofacimina Linezolid	D1	Pirazinamida Etambutol INH alta carga
			D2	Bedaquilina Delamanid
			D3	PAS IMI/MERO AMC (Tioacetazona)

**AG:** aminoglucósidos; **STR:** estreptomina; **INH:** isoniacida; **PAS:** ácido p-aminosalicílico; **IMI/MERO:** imipenem/meropenem; **AMC:** amoxicilina/clavulánico; Tabla adaptada de la OMS.

Para el tratamiento de las formas MDR-TB se recomienda emplear 4 o más fármacos activos, teniendo en cuenta el grado de resistencia a INH y RIF ya que, en caso de resistencia de bajo nivel (concentración mínima inhibitoria -CMI- próxima al punto de corte habitual del fármaco) se permite aumentar la dosis habitual de INH o RIF, respectivamente, o incluso dar rifabutina (58). Las nuevas recomendaciones van orientadas a individualizar el tratamiento según las condiciones de cada caso y a reducir el tiempo de administración, de los 20 meses iniciales a 9 en casos de MDR-TB no complicada (59).

Las **FQ** se han recomendado en casos de enfermos con TB sensible a fármacos de primera línea, pero con efectos secundarios que les impidan tomar el tratamiento habitual, en concreto hepatotoxicidad (56); sin embargo, algunos autores las proponen como parte del tratamiento inicial aún en ausencia de reacciones adversas (60) e, incluso, una de las nuevas combinaciones para reducir el tiempo de tratamiento, aún en fase II de ensayo clínico, incluye moxifloxacino entre sus fármacos de primera línea (61).

Son, además, uno de los pilares fundamentales en el tratamiento de las formas MDR-TB. Su diana es la girasa del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la micobacteria, por lo que algunas de las mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* de MTBC, encargados de la expresión de esta topoisomerasa, impedirán su acción.

Los fármacos más recientemente introducidos en el tratamiento de las formas resistentes de TB son la bedaquilina y el delamanid. La **bedaquilina** fue aprobada en diciembre de 2012 por la *Food and Drugs Administration* (FDA) estadounidense. Es una diarilquinolina que bloquea la adenosín trifosfato (ATP) sintetasa de la micobacteria, impidiendo su generación de energía (62). La OMS ha recomendado añadirla al tratamiento de las formas MDR-TB cuando hay resistencia a FQ o no hay un mínimo de 4 fármacos de segunda línea sensibles *in vitro* (63). El **delamanid** se ha empleado ya en tratamiento de formas XDR-TB. Pertenece a una nueva generación de antituberculosos, los nitroimidazoles (nitro-dihidro-imidazooxazoles), que inhiben la síntesis de los ácidos micólicos que componen la pared celular micobacteriana (los ácidos metoximicólico y cetomicólico). Para poder ejercer su acción, el delamanid tiene que sufrir una reducción de su grupo nitro por el propio *M. tuberculosis*, convirtiéndose así en la forma activa; los valores de CMI para *M. tuberculosis* oscilan entre 0,006 a 0,012 µg/mL y no se ha observado resistencia cruzada con ninguno de los medicamentos antituberculosos utilizados en la actualidad (64). A pesar de la reciente introducción de estos fármacos, ya hay casos publicados de detección de mutaciones en genes micobacterianos asociados a resistencia a bedaquilina (*mmpR*) y a delamanid (*fbiA* y *fgd1*) (65).

## **5. Prevención**

El control de la TB se basa en tres pilares principales: a) prevención de la infección (vacunación con BCG y control de la transmisión) y del desarrollo de enfermedad (profilaxis con INH); b) diagnóstico temprano de la enfermedad (búsqueda activa de casos, técnicas rápidas de laboratorio y mejores estrategias de diagnóstico); y c) tratamiento adecuado con fármacos apropiados y directamente observado si fuera necesario.

La vacuna desarrollada por Calmette-Guérin, conocida como vacuna BCG, tiene un papel principal en los recién nacidos de países con alta prevalencia de TB, donde ha demostrado que reduce el desarrollo de formas complicadas, como meningitis (66). En esta población es importante descartar infección por VIH u otro trastorno inmunitario, bien por cribado previo a la madre o en el momento del nacimiento, por el posible riesgo de becegeitis, es decir, infección en el punto de inoculación de la vacuna o forma diseminada de enfermedad por ser la BCG el resultado de la atenuación de una micobacteria. La vacuna BCG confiere inmunización durante los primeros 10 años y la revacunación en la adolescencia no confiere mayor protección. Su eficacia varía del 0 al 80%, según la localización del ensayo clínico realizado, lo que sugiere una distinta protección frente a diferentes variantes de MTBC, al igual que se ha descrito distinta reacción inmunitaria ante coinfección por helmintos y por micobacterias no tuberculosas (67). Existen nuevas vacunas en fase de desarrollo, entre otras, RUTI y MVA85A que, aunque no parecen generar suficiente inmunidad en niños pequeños,

están sirviendo para estudiar nuevas vías de administración (inhaladas) y para mejorar el efecto de la profilaxis post exposición (68).

La profilaxis con INH debe realizarse a todos los contactos próximos de enfermos bacilíferos y a los convivientes de VIH positivos cuando presenten tos, fiebre, sudoración nocturna o pérdida de peso, una vez descartada enfermedad activa (69).

## 6. Diagnóstico microbiológico

Las micobacterias son bacilos ácido alcohol resistentes. Esta propiedad permite su observación al microscopio tras la tinción de fluorescencia con auramina-rodamina (AU) (bacilos anaranjados sobre fondo oscuro) o tras tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) o variantes como la de Kinyoun (bacilos rosas sobre fondo azul o verde). La tinción no fluorescente permite confirmar su presencia, ya que se observa a mayores aumentos y la fluorescencia puede teñir artefactos. A un microbiólogo experimentado, la tinción de ZN podría sugerirle incluso la especie de micobacteria presente en la muestra observada.



**Figura I.4:** Colonias de *M. tuberculosis* en medio de cultivo de Löwenstein.



## Introducción

El cultivo sigue siendo a día de hoy la técnica de referencia para el diagnóstico de TB, con los medios a base de huevo (Löwenstein-Jensen -LJ) o sintéticos (Middlebrook 7H10 o 7H11). La lenta tasa de multiplicación de las micobacterias (18-24 horas) hace imprescindible su incubación durante al menos 45 días antes de considerar un cultivo como negativo (70). En el caso de las especies incluidas dentro del MTBC que causan la enfermedad tuberculosa, su crecimiento es mejor a 37°C y el tiempo de crecimiento en medio sólido de LJ varía, entre 14-20 días cuando la baciloscopia ha sido positiva (71) siendo el crecimiento máximo a las 4-5 semanas de incubación (72). Con la introducción de los medios de cultivo líquidos se ha disminuido el tiempo de detección del crecimiento de las micobacterias del MTBC.

En los últimos veinte años se ha experimentado una revolución en el diagnóstico microbiológico de la TB, tanto en el diagnóstico de la enfermedad activa como de la infección latente, que se resume en la Tabla I.3.

**Tabla I.3:** Métodos de diagnóstico disponibles en ITL y enfermedad tuberculosa.

	ITL	Enfermedad TB				
		Tinción	Cultivo	Métodos automáticos	Identificación de especie	Estudio de sensibilidad
<b>Clásico</b>	PT	ZN	LJ	Radiométricos	Niacina, nitratos	Método de proporción
<b>Reciente</b>	IGRA (Quantiferon, AU TB.SPOT)		Middlebrook	No radiométricos (MGIT960, VersaTrek, BACTEC)	Antígeno MPB64, LPAs	Detección de genes de resistencia (GeneXpert, Anyplex™, LPAs)

PT: prueba tuberculina; ZN: Ziehl-Neelsen; AU: auramina-rodamina; LJ: Löwenstein Jensen; LPAs: *line probe assays*

Se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico serológico, como la detección de antígeno MPB64 para cepas de MTBC a partir de medio de cultivo líquido positivo, o la detección de secreción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por linfocitos para el diagnóstico de ITL; se han sustituido los métodos automáticos radiométricos que detectaban CO<sub>2</sub> marcado con carbono 14 por otros sistemas de lectura en cultivos líquidos; y se han comercializado técnicas moleculares que permiten detectar MTBC y mutaciones en su genoma relacionadas con resistencias a los fármacos antituberculosos.

El único método de diagnóstico de la ITL disponible hasta principios de este siglo era la prueba de la tuberculina (PT) o Mantoux, que mide la respuesta inmune celular retardada cutánea tras la inyección subcutánea de un derivado proteico purificado (PPD), obtenido tras el filtrado de cultivo de micobacterias del MTBC esterilizado y concentrado. Como ventajas, esta técnica es sencilla, barata y no requiere laboratorio especializado para la obtención del resultado; sin embargo, presenta como limitaciones la interpretación subjetiva de la medida de induración y que los antígenos que emplea los comparten varias especies de micobacterias y no son específicos de MTBC (73).



**Figura I.5:** Inyección subcutánea de PPD en antebrazo para realizar la PT o Mantoux

## Introducción

Más recientemente, se han desarrollado los IGRAs (*IFN-gamma release assays*), que cuantifican *in vitro* la cantidad de IFN- $\gamma$  secretado por los linfocitos de memoria de la sangre del paciente una vez expuestos a antígenos ESAT-6 y CFP-10, específicos de MTBC, adheridos a los tubos de extracción. Existen dos técnicas comercializadas, TSPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK) y Quantiferon®-TB Gold In Tube (Cellestis, Australia), con la ventaja principal, a parte de la no exposición *in vivo* del enfermo a los antígenos, de no dar falsos positivos en aquellos vacunados con BCG (74). Hay que tener en cuenta, no obstante, que estas técnicas pueden dar falsos positivos en infecciones por *M. marinum*, *M. szulgai* y *M. kansasii* (75). Se ha descrito, además, una respuesta celular atenuada a la diana ESAT-6 en los infectados por la variante *M. africanum* (76). La correlación entre estas pruebas está siendo estudiada, habiéndose publicado un amplio número de artículos al respecto. En general, se considera que en los contactos inmunodeprimidos o en aquellos que vayan a ser sometidos a terapia inmunosupresora, debería darse tratamiento profiláctico ante un resultado positivo de cualquiera de las pruebas. En los inmunocompetentes, un resultado negativo de una prueba IGRA tiene un alto valor predictivo y se ha observado que en determinadas poblaciones, como los trabajadores sanitarios, la PT es positiva en mayor número de casos que los IGRA.



**Figura I.6:** Proceso de extracción de tubos para realizar la prueba Quantiferon®TB Gold In Tube

Investigaciones recientes han demostrado que la medición de la expresión de CD27 en los linfocitos T CD4 generados tras la prueba IGRA permite determinar si se trata de ITL o TB activa (77).

Una nueva técnica para el diagnóstico de ITL, aún en fase de ensayo clínico, es la prueba C-Tb (Statens Serum Institute, Copenhagen), que pretende aunar las ventajas de la PT y los IGRAs, mediante la inyección subcutánea de los antígenos ESAT-6 y CFP-10, de modo que permitiría obtener un resultado sin necesidad de laboratorio especializado y emplearía antígenos más específicos de la infección por MTBC (78,79).

Los métodos de cultivo semiautomáticos radiométricos (BACTEC™ 460TB) que detectaban la presencia de MTBC en medio líquido de Middelbrook midiendo el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado por la micobacteria, han sido actualmente sustituidos por otros métodos automáticos de lectura sin isótopos radioactivos, como por ejemplo el BD BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton, Dickinson and Company), que permite detectar el consumo de oxígeno y, por tanto, de crecimiento bacteriano, a través de variaciones detectadas por luz de Wood, en la base de su tubo de Middlebrook 7H9 *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT™). El cultivo en estos medios requiere una descontaminación previa con sosa y N-acetil-cisteína en el caso de muestras no estériles y no admite muestras hemáticas. Para éstas últimas existe un sistema colorimétrico automático de hemocultivos (BACTEC™ serie 9000). Otros métodos de lectura son, por ejemplo, VersaTREK Myco Media (ThermoFischer Scientific) y BacT/ALERT MB (BioMérieux). En general, todos los medios líquidos han reducido el tiempo de detección del crecimiento de MTBC a 10-30 días en comparación con los tiempos más largos de crecimiento en el medio sólido de LJ.

## Introducción

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares que detectan la presencia de ADN de micobacterias en muestra directa antes de su crecimiento, aunque no diferencian entre bacilos viables y no viables, y otras que permiten identificar la especie de micobacteria dentro del MTBC implicada en el proceso. Los métodos de detección molecular disponibles en el diagnóstico de la TB se pueden clasificar en: a) técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-PCR); b) tecnología de tiras de ADN con hibridación reversa (*line probe assays*, LPAs); y c) sistemas de PCR múltiple.

Dentro de las RT-PCR destaca, por su amplia distribución en todo el mundo, la prueba Xpert® MTB/RIF para la plataforma GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, California), aprobada por la FDA y recomendada desde el año 2010 por la OMS. Esta técnica realiza, a partir de muestra clínica y en un mismo proceso, la extracción del ADN, su amplificación y detección, todo ello en un solo cartucho y con un pretratamiento de la muestra en un tampón de lisis durante 20 minutos. Detecta la presencia de MTBC de muestra directa, con una sensibilidad de más del 95% en muestras respiratorias con tinción positiva y en torno al 70% en muestras con tinción negativa (79). El mismo laboratorio está desarrollando un nuevo reactivo (Xpert*plus*) que ha demostrado tener mayor sensibilidad de lo que tiene hasta ahora la técnica para muestras extrapulmonares, pero aún no está disponible en el mercado. Otras plataformas comercializadas son Cobas Amplicor MTB (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), basada en la amplificación de una región de 584 pares de bases (pb) del gen 16S rRNA (80) o su versión más reciente, Cobas TaqMan MTB, del mismo fabricante, con

sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de 91,5%, 98,7%, 91,5% y 98,7%, respectivamente, para muestras respiratorias con tinción positiva y con una sensibilidad del 79,5% en aquellas con tinción negativa (81). En el caso de muestras tanto pulmonares como extrapulmonares, la sensibilidad global es de 77,3% y la especificidad del 99,9% (82). Otra técnica comercializada es la de Anyplex™ (Seegene, Seoul, Korea), que requiere una extracción previa del ADN y presenta dos reactivos para la amplificación: MTB/NTM, que diferencia MTBC de otras micobacterias no tuberculosas (MNT), con una sensibilidad de un 86%; y MTB/MDR/XDR de mayor sensibilidad, que aporta información de resistencias a fármacos de primera y segunda línea en un mismo proceso.



**Figura I.7:** Micobacterias del MTBC teñidas con ZN formando un cordón (*cord factor*).

Para llegar a la identificación de la especie de micobacteria aislada en cultivo, además de las características macroscópicas (no cromógenas, crecimiento lento con aspecto seco y rugoso de las colonias) y microscópicas (*cord factor*), se emplean pruebas bioquímicas (niacina, nitratos y catalasa positivas) (83-85), cromatográficas (poco usadas por ser más complejas), serológicas (antígeno MPB64) y de biología molecular

(hibridación por sondas de ácidos nucleicos y amplificación de secuencias específicas de ADN). Uno de los métodos de LPA comercializados para identificación es GenoType MTBC (HAIN Lifescience, Germany), también aprobado por la FDA. Requiere extracción de ADN y amplificación previas con distintos reactivos. Esta técnica consiste en la hibridación de los amplicones obtenidos tras una PCR múltiple, con las sondas de oligonucleótidos específicos de especies dentro del MTBC, en concreto de los fragmentos de ADN ribosomal 23S, gen *gyrB* y región de delección 1 (RD1), adheridos a una tira (86).

El estudio de las resistencias a fármacos antituberculosos de primera línea se ha realizado clásicamente por el método de proporciones, que actualmente ha sido sustituido por la detección de resistencia a concentraciones fijas de cada fármaco en los tubos de Middlebrook introducidos en las máquinas automáticas anteriormente mencionadas (MGIT960, Versatrek). Ante la presencia de resistencia a alguno de estos antituberculosos de primera línea, se puede determinar la CMI mediante inoculación en placas con diferentes dosis de fármaco en cada pocillo, como es el caso de las placas de microdilución comercializadas de Trek Diagnostic Systems (Thermo Fisher Scientific).

Para la detección molecular de la resistencia a los fármacos antituberculosos, se pueden emplear como dianas dos tipos de genes o regiones:

1. Los que codifican enzimas implicadas en la activación de los profármacos. En este grupo se incluyen los genes *katG* (catalasa peroxidasa que activa a INH), *eth* (monoxigenasa) o *pncA* (pirazinamidasas).

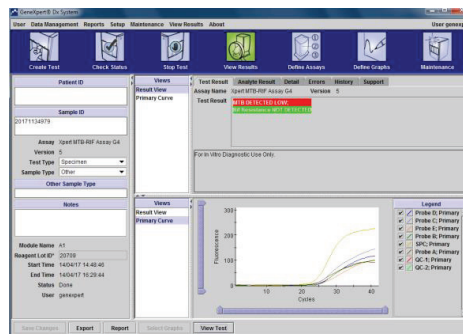
2. Los que codifican dianas específicas del fármaco o profármaco. En este grupo estarían englobados los genes *rpoB* (subunidad de la ARN polimerasa diana de RIF), *inhA* y *p-inhA* (enoiil-ACP reductasa implicada en la formación de ácidos grasos, diana de INH y su profármaco etionamida -ETH), *embB* (arabinosil transferasa diana de EMB), *gyrA/gyrB* (ADN girasa diana de FQ), *rpsL* (proteína ribosomal S12, de estreptomycinina -STR), *eis* (acetiltransferasa, diana de AGi) y *rrs* (rRNA 16S, diana de STR y AGi).

Los métodos de detección molecular de resistencias a fármacos antituberculosos disponibles en el mercado se pueden clasificar en: a) los de RT-PCR, como Xpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA); b) las técnicas de LPAs, como INNO-LiPA RIF TB (Fujirebio, Ghent, Belgium), GenoType MTBDRplus (HAIN Life-Science, Nehren, Germany) o AID TB Resistance assay (Autoimmun Diagnostika GMBH, Strassberg, Germany); y c) los sistemas de PCR múltiple, como Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene, Seoul, Korea) o MeltPro TB Assay (Zeesen Biotech, Xiamen, China).

El sistema de detección Xpert® MTB/RIF revela, además de la presencia de MTBC, mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a resistencia a RIF, mediante 5 sondas que se unen a secuencias conocidas de las cepas salvajes (WTC), por lo que la detección de resistencia se basa en la falta de fijación de alguna de las sondas y no en la presencia de una mutación concreta que confiera resistencia (87). Las regiones cubiertas por cada sonda son: sonda A codones 426 a 431; sonda B codones 430 a 436; sonda C codones 435 a 442; sonda D codones 442 a 449; y sonda E codones 447 a 452. Como ventajas, destaca su fácil manejo, rapidez de obtención de resultado, seguridad para el usuario, identificación de resistencia a RIF, reproducibilidad, especificidad (99%) y sensibilidad



(92,1% en general y 97,9% en muestras con tinción positiva). Entre sus desventajas hay que resaltar su elevado coste, el hecho de que no se puede recuperar el ADN extraído, que no detecta resistencia a otros fármacos y la posibilidad de falsos negativos de resistencia a RIF según la región del mundo en que se emplee (88).



**Figura I.8:** Resultado positivo para MTBC por Xpert® MTB/RIF, sensible a RIF.

Un ejemplo de los LPAs, sistemas basados en la incorporación de cadenas de oligonucleótidos complementarios de secuencias salvajes y otras mutaciones que confieren resistencia a INH, RIF, FQ, AGi y EMB, a una membrana de nitrocelulosa, es el GenoType MTBDRplus (HAIN Lifescience, Germany). Esta técnica detecta mutaciones en: gen *rpoB* (D516V, H526Y, H526D, S531L) que confieren resistencia a RIF; codón 315 de *katG* (S315T1, S315T2) asociadas a resistencia a INH de alta carga; promotor *inhA* (c-15t, a-16g, t-8c, t-8a) asociadas a resistencia a INH de bajo nivel y ETH; y en los genes *gyrA*, *rrs*, *embB* y una nueva versión que incluye *gyrB* y *eis* (sensibilidad 94,8% para FQ y en torno al 90% para AGi) (89,90).



**Figura I.9:** Resultado de prueba molecular de sensibilidad GenoType MTBDRplus.

Los sistemas de PCR múltiple son sistemas basados en la detección simultánea de distintas mutaciones por varias reacciones en cadena de la polimerasa. El sistema Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene, Seoul, Korea), permite la detección de MTBC y el análisis de mutaciones que confieren resistencia a fármacos antituberculosos de primera y segunda línea, por detección de mutaciones en los genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *rrs* y *eis*. Emplean la tecnología TOCE, con tres tipos de *primers*: 2 DPO (pareja de *primers* para amplificación), 1 *Pitcher* (oligonucleotido complementario a la diana, que etiqueta pero no se hibrida a ella) y 1 *Catcher* (secuencia con fluorescencia). Esta técnica detecta en total 38 mutaciones en dos amplificaciones distintas, pero una misma carrera o *run* (18 en *rpoB*: L511P, Q513K, Q513L, Q513P, D516V, D516Y, S522L, S522Q, H526C, H526D, H526L, H526N, H526R, H526Y, S531L, S531W, L533P y delección de 3 aminoácidos entre los codones 513 y 516; 3 en la región promotora de *inhA*: c-15t, t-8a,t-8c; 4 en *katG*:S315I, S315N, S315T1, S315T2; 7 en *gyrA*: A90V, S91P, D94A, D94G, D94H, D94N, D94Y; 3 en *rrs*: 1401, 1402, 1484; y 3 en *eis*: g37t, c14t, g10a) (90).

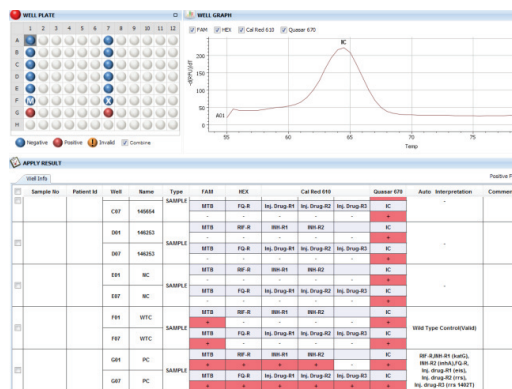


Figura I.10: Resultado de la prueba molecular Anyplex™ II MTB/MDR/XDR.

## Introducción

En el análisis de esta técnica de Seegene realizado por Causse y colaboradores, se detectaron todas las cepas XDR-TB pero falló en 2 MDR-TB de las 25 que se probaron, por lo que la sensibilidad sería 97% para RIF, ya que no detectó la mutación asociada a resistencia S531L; 61% para INH, ya que no detectó la mutación S315T; 95% para FQs; y del 100% para AGi; todo ello comparado con lo que detectaron por HAIN MTBDR*plus*. La especificidad fue del 100%, 98%, 99% y 100%, respectivamente. La prueba MeltPro TB Assay (Zeesen Biotech, Xiamen, China), también permite detectar resistencia a INH, RIF y FQs empleando el análisis de las curvas de fusión (*melting curve analysis*) con sondas etiquetadas por partida doble (*dually labeled probes*). En el estudio multicéntrico de Pang y cols (91), se demostró su utilidad en muestras de esputo con diferente grado de sensibilidad según el fármaco: RIF (94%), INH (85%), ofloxacino (83%), amikacina (75%), kanamicina (63%).

En general, con estas técnicas se pueden detectar gran parte de las mutaciones que con mayor frecuencia confieren resistencia frente a los fármacos antituberculosos, pero queda un porcentaje no detectable que varía en función del fármaco, la técnica empleada y la epidemiología local. Así, en el caso de la RIF, al ser las mutaciones S531L, H526D/Y y D516V del gen *rpoB* las responsables de más del 95% de las resistencias a éste fármaco, con las técnicas MTBDR*plus* y/o Xpert® MTB/RIF, quedarían menos del 5% de cepas resistentes por detectar. En el caso de EMB, este porcentaje se eleva hasta el 40%, ya que sólo el 60% de los aislados resistentes presentan la mutación M36V/I/L incluida en la tira MTBDR*sl*. Para INH, la mutación S315T del gen *katG* está presente en el 70% de las cepas resistentes y otro 25% presentan el cambio de nucleótidos -8/-15 de la región promotora *inhA*, con lo que cubrirían prácticamente el 90% de las mismas.

Para los fármacos de segunda línea, estos porcentajes de no detección están entre el 10 y el 30%.

Aunque el método de referencia para determinar la sensibilidad antibiótica *in vitro* (DST) es el cultivo, las técnicas moleculares aportan información acerca de mutaciones en el genoma de MTBC asociadas a resistencia (DR) a los fármacos antituberculosos en menos tiempo. Así pues, mutaciones en los genes *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB*, *rrs*, *rpsL* y *gyrA* de *M. tuberculosis*, repercuten en el manejo de los enfermos con TB, a la espera de la DST. El control de la TB depende en gran medida de la detección temprana de nuevos casos e inicio de tratamiento antituberculoso correcto, algo que no pueden facilitar los métodos de DST fenotípicos convencionales (92).

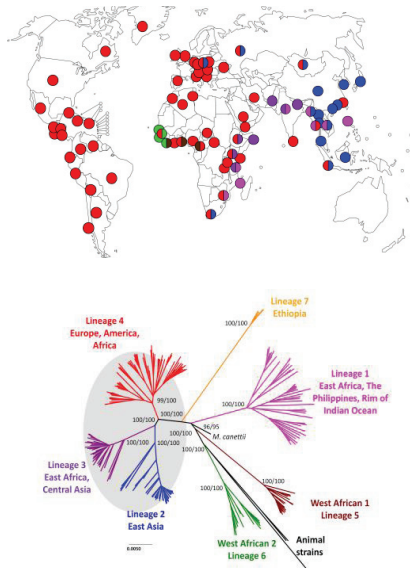
En el Servicio de Microbiología del HUP La Fe se han ido incorporando algunos de estos métodos diagnósticos comercializados en los últimos años, que pueden haber disminuido los tiempos de diagnóstico y mejorado el tipo de información aportada. El sistema de lectura para cultivo en medio líquido BD BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson and Company), ha sustituido al anterior método radiométrico. El cultivo en medio líquido se sigue complementando con el cultivo en medio sólido de LJ, de lectura manual cuando la colonia es visible al ojo humano, pero no lo ha sustituido puesto que se han descrito casos de ausencia de crecimiento en el primero (93). Por otro lado, se han incorporado técnicas moleculares de detección de MTBC, en concreto, las de RT-PCR y las de hibridación por sondas. Las RT-PCR comerciales incluidas han sido el sistema GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA) y el Anyplex™ en sus dos versiones

MTB/NTM y MTB/MDR/XDR (Seegene), y la tecnología de hibridación por sondas empleada actualmente es la de Genotype (HAIN Lifescience GmbH, Nehren, Germany).

## 7. Secuenciación genómica

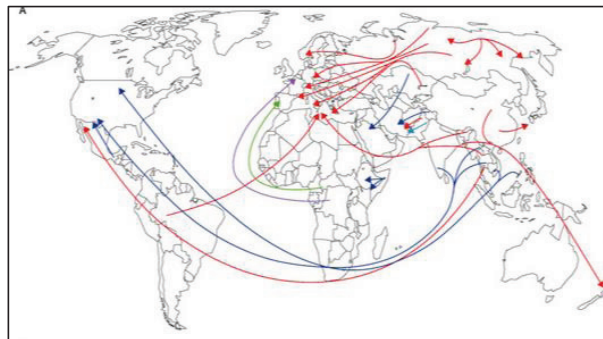
El análisis del genoma de *M. tuberculosis* ha evolucionado de forma exponencial desde 1998, cuando Cole y sus cols. publicaron la primera secuencia completa de H37Rv (94), cepa patrón que había sido aislada en 1905 por Edward R. Baldwin (95). Se describió entonces su genoma circular, de aproximadamente 4,5 millones de pares de bases y unos 4000 genes, siendo grandes las expectativas ante este hallazgo. No ha sido, sin embargo, hasta unos años después, con los avances tecnológicos que han permitido la secuenciación de muchas cepas en menos tiempo, cuando se han podido realizar estudios de evolución, de transmisión y de mutaciones relacionadas con resistencias a fármacos antituberculosos. La publicación del genoma de *M. tuberculosis* ha servido para conocer mejor este microorganismo y ha sido útil en el desarrollo de nuevos fármacos, vacunas y técnicas diagnósticas. Los métodos bioinformáticos necesarios para interpretar el significado de las variaciones del genoma también han mejorado gracias al trabajo continuo de investigadores básicos, y se están desarrollando nuevas plataformas informáticas, accesibles de forma gratuita a través de internet, que recogen y comparan secuencias de MTBC con la cepa original H37Rv (96). Varios autores comentan que, mientras la capacidad de generar datos a partir de la SCG ha crecido sustancialmente, la capacidad de manejar estos datos y optimizarlos al máximo aún es limitada (97).

El empleo de la SCG de MTBC en epidemiología molecular ha sido descrito en distintas publicaciones (98,99) y ha sustituido a otros métodos de genotipado menos discriminativos empleados hasta hace pocos años, como es el caso de los RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*) y MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive units - variable number tandem repeat*) (100). Ante un caso de TB, es importante conocer tanto la cadena de transmisión para prevenir nuevas infecciones, como las características particulares de cada cepa, para poder anticipar, en la medida de lo posible, la evolución de cada paciente y su respuesta al tratamiento. En este aspecto, varios estudios han intentado relacionar la forma de presentación de la enfermedad y la evolución del enfermo, con el subtipo o linaje de MTBC aislado, dato que la SCG puede aportar de forma más precisa que los antiguos métodos de genotipado. El complejo MTBC se ha dividido en 7 linajes (L): L1 o Índico; L2 o *Beijing*, predominante en el sudeste asiático; L3 o *Central Asian* (CAS), en la India; L4 o *EuroAmerican*, común en Europa, Oriente Medio, América y parte de África y que incluye los subtipos *Latin American-Mediterranean* (LAM), Haarlem, *X type*, T y el más reciente PGG3; L5 y L6, ambos en África Occidental; y L7, aislado en inmigrantes etíopes en Djibouti (101). Su distribución en el mundo se intentó plasmar en el mapa publicado por Gagneaux y Comas (102) (Figura I.11).



**Figura I.11:** Distribución de los linajes dominantes de MTBC en el mundo.

Sin embargo, las migraciones poblacionales podrían estar modificando esta distribución, como refleja el mapa más actual de Dheda y cols. (103) (Figura I.12).



En: Dheda. The epidemiology, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and incurable tuberculosis. The Lancet Resp Med Com. 2017; 4:291-360

**Figura I.12:** Distribución de los linajes de MTBC siguiendo las migraciones poblacionales.

Más recientemente se ha introducido la distinción entre generalistas y especialistas dentro del linaje 4, el más ampliamente distribuido en el mundo,

sugiriendo que los distintos sublinajes adoptan distintas estrategias de adaptación ante estas migraciones poblacionales (104).

El genoma de *M. tuberculosis* es muy constante (105), pero contiene distintas inserciones y deleciones, conocidas como polimorfismos de secuencia (*Large Sequence Polymorphisms*, LSPs). El papel de estos LSPs ha sido estudiado y discutido (106), sugiriendo en algunos casos que se tratan de cambios neutrales que permiten su uso como marcadores filogenéticos de población y de evolución, mientras que en otros casos se considera que tienen un papel relevante en la patogenicidad de cada cepa, como en el caso de *deleciones* en el gen *plcD*, que supondría dos veces más de riesgo de desarrollo de formas de TBEP (107).

La caracterización genómica de aislados de TB ha demostrado ser útil para entender la epidemiología de esta enfermedad, pero también está siendo estudiada su utilidad en el campo de la microbiología clínica (108). En este terreno, el análisis del comportamiento de cada cepa y su evolución están siendo analizados, buscando mutaciones y *deleciones* implicadas en el desarrollo de resistencias a fármacos y diferenciándolas de aquellos polimorfismos determinantes de linaje, no asociados por tanto a resistencia fenotípica, a excepción de las mutaciones *pncA* H57D y *rpsA* A440T, que están presentes en *M. bovis*, intrínsecamente resistente a PZA (109).

Es importante entender que la resistencia a los fármacos empleados en el tratamiento de la TB no es un fenómeno binario, sino que la repercusión de la aparición de mutaciones individuales es variable sobre la CMI de cada fármaco. En un artículo publicado en 2015, se describe cómo, con la SCG se detectaron 120 mutaciones



## Introducción

relacionadas con resistencia fenotípica (MRR) y otras 772 benignas (mutaciones que no confieren resistencia a fármacos); los autores concluyen que, con las MRR, se pueden predecir el 89,2% de los fenotipos con una sensibilidad del 92,3% y una especificidad del 98,4%. El 10,8% restante, no podrían predecirse por tratarse de mutaciones aún no relacionadas con cambios fenotípicos (110). En la Tabla I.4 se detallan los genes implicados con mayor frecuencia en la resistencia a fármacos antituberculosos.

**Tabla I.4:** Principales genes de MTBC asociados a resistencia a fármacos.

Fármaco	Gen asociado a resistencia
Isoniacida	<i>katG</i> <i>inhA, fabG1</i>
Rifampicina	<i>rpoB</i>
Etambutol	<i>embCAB</i>
Piracinamida	<i>pncA</i> <i>rpsA</i>
Quinolonas	<i>gyrA</i>
Amikacina, Capreomicina	<i>rrs</i> <i>tlyA</i>
Kanamicina	<i>eis</i>
Estreptomicina	<i>rpsL</i> <i>rrs</i> <i>gidB</i>
Etionamida	<i>ethA</i> <i>inhA</i>

En el caso de INH y RIF, los fármacos de primera línea más importantes en el tratamiento de la TB, varios estudios han demostrado que más del 95% de las cepas resistentes a RIF presentan mutación en la región de 81pb localizada entre los codones 507 y 533 del gen *rpoB*, denominada RRDR (*RIF resistance-determining region*) (111) mientras que, en el caso de la INH, el mecanismo es más complejo y en él interviene un mayor número de genes. En la revisión sistemática realizada por Seifert y cols. con los

estudios publicados entre los años 2000 y 2013, se llegó a la conclusión de que en el 64% de las resistencias fenotípicas a INH estaba involucrada alguna mutación en el codón 315 del gen *katG* (112), siendo la segunda mutación en frecuencia la localizada en la posición -15 del gen *inhA* (19%), y seguida de otras 10 localizadas en el promotor del *inhA* y la región intergénica *ahpC-oxyR* (113). Papaventis y cols., tras realizar una revisión sistemática de 20 publicaciones para determinar la eficacia de la SCG en la detección de resistencia a antituberculosos de primera y segunda línea, empleando el método fenotípico como referencia, demostraron, recientemente, la relación con resistencia fenotípica en polimorfismos de 53 genes. La sensibilidad y especificidad en conjunto de la SCG fue 0,98 (95% IC 0,93-0,98) y 0,98 (95% IC 0,98-1,00) para RIF y 0,97 (95% IC 0,94-0,99) y 0,93 (95% IC 0,91-0,96) para INH, respectivamente (114).

Las revisiones más recientes afirman que, según la localización de la mutación dentro de cada gen, el fenotipo podría o no ser resistente. En la región RRDR del gen *rpoB*, las mutaciones de los codones 516, 526 y 531 son las responsables del 90% de las resistencias a RIF (115), pero conocer la mutación exacta y el consecuente cambio de aminoácido es crucial, como por ejemplo en el caso del cambio en el codón 526, que origina variables de CMI entre 0,5-256 µg/mL (116). Existen, además, mutaciones controvertidas o disputadas (*disputed mutations*), como es el caso de H526N, que se ha relacionado con resistencia a RIF pero que en un estudio reciente se asocia a CMI de RIF 0,125 µg/mL, siendo, por lo tanto, sensible (117). En este mismo estudio se expone que la mutación en el alelo H526L se asocia a cepa resistente a RIF pero sensible a rifabutina, enfatizando en la importancia de conocer la mutación exacta. Además, hay que tener en cuenta que con los métodos moleculares se obtienen falsas resistencias en el caso de

## Introducción

mutaciones silentes, es decir, aquellos cambios de nucleótido que no contribuyen a cambio de aminoácido, no siendo por tanto mutaciones relevantes para determinar resistencia a fármacos. Las mutaciones silentes descritas son: F506, T508, Q510, L511, Q513, F514, T525, A532, L533, P535 (118-121). A parte de estos falsos positivos para resistencia a RIF, existe el problema de falsos negativos por ser mutaciones fuera de la región RRDR las causantes de la resistencia (cambio V146F o I572F) (122-124) o tratarse de otro mecanismo, como las bombas de expulsión. En un estudio llevado a cabo por Pang y cols., tras analizar las cepas resistentes a RIF que no presentaban mutaciones, se observó que las bombas de expulsión Rv0783, Rv2936 y Rv0933 podían estar involucradas en el transporte del fármaco fuera de la célula (116).

En cuanto a la INH, también se ha descrito que, según la localización de la mutación, la cepa de MTBC debería ser considerada con resistencia de bajo o alto nivel, pudiendo emplearse INH a dosis más elevadas de lo habitual en el primer caso. Así, se ha observado que las mutaciones en el gen *inhA*, región promotora, producen cepas de baja resistencia (CMI 0,2-0,5 µg/mL) y ocurren en 6-43% de las resistencias a INH (113). Si se detectara resistencia por mutación en el gen *inhA* podría usarse INH a altas dosis, no pudiendo emplearse la ETH, ya que ésta tiene la misma diana que INH (*inhA*) pero se activa a partir del profármaco a través de otra enzima (*ethA*). En el caso de pérdida de la actividad catalasa-peroxidasa por mutaciones en el gen *katG*, se induciría la aparición de cepas con resistencia de alto nivel a INH (CMI 2-8 µg/mL) (125). Por lo tanto, si se detecta una resistencia de alto nivel (*katG*) no debería iniciarse tratamiento con INH, pero podría sustituirse por etionamida/proteonamida, a no ser que hubiera mutación en

*ethA*. La sustitución del codón S315T del gen *katG*, se da en 42-95% de las resistencias a INH.

El EMB actúa frente a MTBC al inhibir las arabinosiltransferasas asociadas a la membrana, codificadas por el operón *embCAB* (*embC*, *embA*, *embB*). En un estudio realizado sobre un total de 139 cepas MDR-TB, se analizó el porcentaje de resistencia a EMB ligado a mutaciones en este operón. Los autores llegaron a las siguientes conclusiones: en su región, 56,8% de las MDR-TB estaban relacionadas con resistencia a EMB; el 82,2% de las cepas resistentes a EMB eran del linaje Beijing; y las mutaciones más frecuentes se localizaban en los codones 306 de *embB* (*embB306*), *embB406*, *embA* (-16) y *embB497* (126).

Con respecto a la PZA, el estudio multicéntrico llevado a cabo por Miotto y cols. identificó 280 variaciones genéticas en el gen *pncA* que les permitió clasificar las mutaciones en muy alto grado de confianza de desarrollo de resistencia, alto grado, aquellas sin un papel claro y mutaciones no asociadas a resistencia fenotípica. Con este estudio llegaron a la conclusión que cualquier técnica molecular con la que se quisiera predecir la resistencia a PZA debería incluir al menos las mutaciones de muy alto y alto grado de confianza, consiguiendo de este modo una precisión diagnóstica variable entre un 89,5% y un 98,8% (127).

Respecto a fármacos de segunda línea empleados en casos de MDR-TB, como las FQ, mutaciones en el gen *gyrA* confieren resistencia a las mismas; sin embargo, distintas mutaciones en este gen tienen distinta repercusión en los valores de CMI, según la FQ

## *Introducción*

empleada (128). Algunos autores han demostrado que una sustitución en A90V de *gyrA* podría tratarse con mayores dosis de moxifloxacino (400-600 mg) en lugar de darse como resistente (esta sustitución origina valores de CMI 1 µg/mL, considerándose resistencia a partir de > 0,5 µg/mL) (129).

La existencia de poblaciones heterogéneas genéticamente dentro de un mismo individuo también se ha relacionado con diferencias entre el resultado fenotípico y molecular de sensibilidad a los fármacos antituberculosos. Los posibles mecanismos por los que puede existir esta variedad de cepas en un mismo individuo son: la infección simultánea por cepas distintas; la sobreinfección o infección posterior por otra variante; o la aparición espontánea de una cepa heterorresistente tras la infección. Se cree que las lesiones generadas por las micobacterias son independientes dentro de un mismo órgano, por lo que una única muestra de esputo podría no ser representativa de la población real de micobacterias dentro del enfermo (130). Estudios recientes indican que la heterogeneidad genética de las cepas de MTBC es mayor de lo que se pensaba y que puede influir en la interacción con el hospedador, su transmisibilidad, el desarrollo de resistencia a antituberculosos y el resultado de las pruebas diagnósticas.

La variación regional de las mutaciones individuales puede limitar la sensibilidad de los métodos de diagnóstico molecular comercializados. La SCG es por tanto necesaria para identificar la frecuencia de las mutaciones en cada región y saber así si las técnicas rápidas son útiles.

Los recientes avances en el diagnóstico de la TB, con la incorporación de la SCG al análisis de las resistencias a los fármacos antituberculosos, conlleva la necesidad, por parte de los microbiólogos y micobacteriólogos, de conocer y en ocasiones incluso manejar programas bioinformáticos de interpretación. Se han desarrollado bases de datos accesibles de forma gratuita que recogen todas las variables descritas en la bibliografía (131) y hay programas bioinformáticos disponibles *online* que permiten analizar las secuencias de forma rápida. Un trabajo reciente presenta una guía sencilla y resume las características de cuatro de los programas disponibles gratuitamente en internet: *Mykrobe predictor* (132), *TB Profiler* (133), *Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis* o *TGS-TB* (134) y *Phylo-Resistance Search Engine* o *PhyReSE* (135,136).

Estas nuevas orientaciones indican la importancia de conocer la mutación exacta a través de la SCG. Aunque la tecnología de SCG está aún al alcance de pocos laboratorios de investigación no asistenciales, con este trabajo se ha intentado relacionar y comparar los resultados de sensibilidad fenotípica a los fármacos de primera línea de cada caso, con los aportados tras la SCG de las cepas aisladas en los dos últimos años del estudio y la interpretación obtenida con una de estas herramientas bioinformáticas, en concreto *PhyReSE*.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## **II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El presente trabajo se ha basado en los siguientes supuestos:

1. Los enfermos con TB en el DS La Fe tienen factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad distintos a la coinfección por VIH.
2. El número de casos confirmados en población inmigrante en nuestro Departamento es superior al reflejado en los informes anuales de la Conselleria de Sanidad de la Comunidad Valenciana.
3. La forma de presentación clínica y la tasa de resistencia a fármacos antituberculosos en el grupo de inmigrantes son distintas a las del resto de la población autóctona de la CV.
4. Las nuevas técnicas moleculares introducidas en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe reducen el tiempo del diagnóstico de enfermedad y aportan datos correctos sobre sensibilidad a los antituberculosos.
5. La secuenciación completa del genoma de MTBC es una técnica útil tanto para el estudio de contactos como para la detección de resistencias antituberculosas de alto y bajo nivel de expresión.

### **Objetivo principal**

Conocer las características epidemiológicas y clínicas de los enfermos con TB confirmada por microbiología en el HUP La Fe de Valencia entre enero de 2011 y diciembre de 2015, así como la repercusión de la secuenciación del genoma completo de los aislados de MTBC en la gestión de los pacientes.

### **Objetivos secundarios**

1. Realizar un mapeo epidemiológico de la situación de la TB e identificar poblaciones de riesgo y vínculos entre los atendidos en el DS La Fe.
2. Comparar los resultados totales obtenidos con los notificados a los sistemas de control epidemiológicos en el ámbito de la CV (Servicio de Epidemiología del Hospital y de la red de vigilancia de la CV, RedMIVA)
3. Mostrar las formas de presentación clínica según las características epidemiológicas de los enfermos.
4. Analizar la utilidad de los métodos de diagnóstico disponibles en el Servicio de Microbiología del HUP Fe, comparando los tiempos hasta el diagnóstico e identificación con las técnicas habituales y las moleculares.
5. Analizar el patrón de sensibilidad de las cepas según características del enfermo.
6. Valorar la aportación de la secuenciación genómica, comparando los resultados obtenidos por este método con los epidemiológicos del enfermo y los resultados fenotípicos de sensibilidad.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



### **III MATERIAL Y MÉTODOS**

Este estudio se ha realizado con la autorización del Comité de Ética e Investigación Sanitaria del HUP La Fe (Anexo 1).

Estudio descriptivo retrospectivo de los casos de TB confirmada en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe entre enero 2011 y diciembre 2015.

La población estudiada fue toda la atendida en el DS La Fe, que incluyó el HUP La Fe, 12 Centros de Salud y el centro de especialidades Ricardo Trénor ubicado en la calle Alboraya, en este periodo de tiempo. En este punto se asumió que el médico que atiende al enfermo habría enviado muestras para procesar en microbiología ante cualquier caso de sospecha de enfermedad tuberculosa en sus distintas formas de presentación clínica.

Desde enero de 2013, las muestras de los enfermos atendidos en el Hospital Doctor Moliner con diagnóstico de TB también se envían y procesan en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe. Los datos recogidos de este grupo de enfermos se analizaron de forma independiente y no se computaron para determinar las tasas de incidencia del DS La Fe.

Se consideró caso confirmado de TB todo aquel que reunía una de las siguientes condiciones:

- a) aislamiento en cultivo de una micobacteria del MTBC en cualquier muestra clínica de enfermo con síntomas compatibles con TB,
- b) demostración de bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) por microscopía y confirmación por método molecular de micobacterias del MTBC, aunque no se obtuviera crecimiento por los medios de cultivo habituales, o bien,
- c) demostración por un método de biología molecular de la presencia de micobacterias del MTBC y signos o síntomas compatibles con enfermedad tuberculosa, cuando no hubiera pruebas de otra enfermedad que los explicara y el enfermo hubiera recibido tratamiento antituberculoso con mejoría.

Todos los episodios de un mismo enfermo se consideraron como uno solo mientras no hubieran pasado más de 12 meses desde haber completado un tratamiento correctamente, excepto cuando se hubiera perdido su seguimiento durante más de 12 meses y hubiera pruebas de nueva enfermedad tuberculosa.

## **1. Recogida de datos epidemiológicos y de presentación clínica**

La historia clínica de cada caso fue revisada a través de la base de datos informatizada del hospital (MIZAR) o, en su defecto, en el Servicio de Documentación, recogiendo los siguientes datos:

- a) epidemiológicos (edad, sexo, país de procedencia, tiempo desde llegada a España, tiempo desde última visita a un país endémico, residencia habitual en la CV, número de convivientes, empleo habitual);

- b) consumo de alcohol, tabaco o drogas ilegales;
- c) existencia de enfermedad de base (DM, hepatitis víricas, VIH, recepción de trasplante o cualquier otra afección que requiera tratamiento inmunosupresor prolongado, y estado de salud mental alterado);
- d) historia de enfermedad tuberculosa tratada o de contacto con enfermo bacilífero y tiempo desde el mismo, recogiendo la fecha y el resultado de la última prueba de ITL realizada (Mantoux o prueba de IFN- $\gamma$ );
- e) manifestaciones clínicas de interés en los 12 meses previos al diagnóstico de confirmación (tos, expectoración, hemoptisis, astenia, anorexia, fiebre, escalofríos, sudoración nocturna) y en el caso de formas extrapulmonares, otros síntomas y signos como dolor local, tumefacción, supuración, signos meníngeos, urinarios, dependiendo de la forma de presentación, y el valor de la adenosindeaminasa en líquido orgánico;
- f) hallazgos radiográficos relevantes o compatibles con TB;
- g) hallazgos anatomopatológicos compatibles con TB;
- h) evolución clínica registrada hasta julio de 2016.

Se revisaron los informes de TB emitidos durante cada uno de estos años por el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) de la CV, recogiendo el número total de casos y características de los enfermos notificados en el DS La Fe y se compararon con el número de casos confirmado en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe. Se calcularon tasas por 100.000 habitantes en el DS La Fe empleando el número total de población adscrita al mismo para cada año del estudio, según los

datos suministrados por el Servicio de Documentación del hospital, reflejados en la

Tabla III.1.

**Tabla III.1:** Población asignada al DS La Fe por año de estudio (habitantes).

Año	Población DS La Fe
2011	206.878
2012	200.599
2013	200.350
2014	196.815
2015	281.506

Para la realización de los mapas de localización de la vivienda de cada enfermo se empleó el programa de acceso gratuito en internet *Mapcustomizer*, disponible en la página web [www.mapcustomizer.com](http://www.mapcustomizer.com).

Se consideró inmigrante a todo aquel no nacido en España o que no ostentaba la nacionalidad española en el momento de ser admitido al centro y diagnosticado. Los niños menores de 5 años, hijos de no nacionalizados, a pesar de haber nacido en nuestro país, se incluyeron como inmigrantes, considerando que las características de convivencia y de viajes a su país (VFR: *visiting friends and relatives*) eran las mismas que las de sus progenitores. Se emplearon los códigos de países como abreviaturas en las tablas según la norma ISO 3166-1 alfa-3.

Se consideró forma de presentación pulmonar aquella en la que el pulmón era el único órgano afectado. El resto de formas clínicas se consideraron extrapulmonares, incluyendo la forma pleural cuando no hubiera afectación del pulmón o la ganglionar mediastínica si se afectaban exclusivamente los ganglios linfáticos mediastínicos.



Se consideró que había prueba complementaria sugerente de TB si así lo expresaban los radiólogos o anatomopatólogos en su informe, así como en los casos en que se mencionaba la presencia de granulomas.

Con respecto a la evolución del enfermo, se consideraron las siguientes posibilidades: buena evolución (si los cultivos al final del tratamiento eran negativos), abandono de tratamiento o pérdida de seguimiento, recaída o fallecimiento (éxitus).

## **2. Procesamiento microbiológico de las muestras**

Todas las muestras recibidas en el Servicio de Microbiología para estudio de presencia de micobacterias se procesaron siguiendo las normas de las sociedades española y americana de microbiología (SEIMC y ASM).

Las muestras normalmente estériles se sembraron directamente en un tubo de medio sólido de LJ y un tubo de medio líquido de Middlebrook (MGIT) para lectura en el sistema BD BACTEC™ MGIT™ 960. En el caso de muestras no estériles, se realizó una homogenización con sosa (NaOH) y antibiótico (colistimetato de sodio) previa a su siembra en ambos medios. El volumen de muestra inoculado en el medio líquido fue 500µL. Las muestras de sangre, médula ósea o, en ocasiones, líquidos orgánicos macroscópicamente hemáticos se inocularon en frascos de "Myco/F *lytic medium*" para su lectura en BACTEC™ 9060.

A todas las muestras recibidas se les realizó tinción, bien de fluorescencia con auramina-rodamina (AU) o de Ziehl-Neelsen (ZN) o ambas, para determinar la presencia de BAAR. En ambos casos, las muestras se fijaron al portaobjetos empleando plancha de calor a 50°C durante 10 minutos. La AU se dejó actuar 30 min en oscuridad, posteriormente se limpió con alcohol-ácido y agua durante 2 min y se empleó como contracolorante el permanganato potásico durante 10 min. Para la tinción de ZN se fijó la muestra, además, con metanol (1 min), se cubrió el porta con fucsina fenicada tensoactiva (10 min), se lavó con agua y ácido clorhídrico y se contracoloró con azul de metileno (5 min).

Todas las muestras inoculadas se incubaron a 37°C. En el caso de crecimiento de colonias sospechosas de micobacterias en cualquier medio de cultivo, se realizó una nueva tinción de ZN para confirmar su ácido-alcohol resistencia y un subcultivo en LJ y placa de agar sangre para determinar la morfología macro y microscópica de la misma y su velocidad de crecimiento. Una de las características microscópicas de las micobacterias del MTBC es la observación de cordones ácido-alcohol resistentes (*cord factor*) en los cultivos líquidos, aunque no es patognomónico de especie puesto que hay otras micobacterias que también tienen esta propiedad, como *M. abscessus*.

Para la identificación de la especie aislada se realizaron pruebas bioquímicas (niacina y reducción de nitratos) y moleculares, en concreto, la técnica de hibridación de sondas Gentoype MTBC (HAIN Lifescience, Germany) que diferencia 4 especies dentro del complejo *M. tuberculosis*, además de la cepa de la vacuna del BCG (*M. tuberculosis*, *M. microtti*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. bovis BCG*). Para poder realizar

### *Material y métodos*

esta última técnica, se extrajo el ADN de la micobacteria por calor en termobloque a 96°C a partir de medio de cultivo crecido, bien 1 mL de medio líquido de MGIT™ centrifugado o un asa de colonias de medio sólido de LJ diluidas en 200µL de agua libre de nucleasas. Tras la amplificación del ADN con los *primers* suministrados por la casa comercial y siguiendo el programa de ciclos recomendado por el fabricante, se procedió al revelado por hibridación de las cadenas amplificadas en las tiras de papel provistas y a su interpretación según la planilla aportada en la caja de reactivos.

La detección de MTBC por técnicas moleculares a partir de muestra directa se realizó a demanda del facultativo responsable del enfermo cuando la solicitud estuviera justificada o ante una alta sospecha de enfermedad por parte de los facultativos de microbiología tras la revisión de la historia o de las tinciones directas. Para el diagnóstico molecular, disponíamos de las técnicas GeneXpert® (Cepheid), Genotype (HAIN Lifescience) y Anyplex™ MTB/NTM y MTB/MDR/XDR (Seegene), anteriormente descritas, además de una técnica de PCR casera anidada (*double-nested*). El ADN de las muestras se extrajo por calor en termobloque a 96°C durante 40 minutos tras concentración y mezcla con solución de extracción (DES) en el caso de muestras de origen respiratorio o, si se trataba de líquidos orgánicos, biopsias, sangre o médula ósea, mediante el método automático para extracción de ADN de micobacterias (Maxwell™ 16, Promega, USA o MagPurix TB DNA Extraction Kit, Zinexts, Taiwan).

Ante un primer diagnóstico en nuestra área y con el primer aislamiento se realizó, además, un estudio de sensibilidad *in vitro* a los fármacos de primera línea INH

y RIF, mediante técnicas moleculares: PCR a tiempo real Anyplex™ MTB/MDR/XDR (Seegene) o la hibridación de sondas Genotype™ MTBDRplus (HAIN Lifescience, Germany), indistintamente.

En este trabajo, consideramos el tiempo hasta el diagnóstico (TD), aquel transcurrido desde la recepción de la muestra en el Servicio de Microbiología hasta la obtención de un resultado positivo por cualquiera de los métodos microbiológicos disponibles. Además del TD, se registró el método por el que se había llegado a este primer diagnóstico: tinción positiva en el caso de que se observaran BAAR bien en la tinción de ZN o bien en la de AU; cultivo positivo si creció la micobacteria en LJ, MGIT™ o Myco/F, especificando el tiempo de crecimiento en cada uno de ellos; o técnica molecular positiva, en cuyo caso se consideró cualquiera de las técnicas disponibles, puesto que éstas han variado durante el periodo de estudio.

En el caso de confirmarse la identificación de MTBC, el estudio de sensibilidad *in vitro* a los antituberculosos de primera línea, se realizó en medio líquido de MGIT con concentraciones fijas de INH (0,1µg/mL), RIF (1µg/mL), STR (1µg/mL), EMB (5µg/mL) y PZA (100µg/mL). En caso de detectarse cualquier resistencia a los fármacos de primera línea, el estudio se amplió a AGi (amikacina, kanamicina), FQ (levofloxacino, moxifloxacino) y otros fármacos menos habituales (rifabutina, capreomicina, ácido paraminosalicílico, cicloserina, etionamida, linezolid) considerados como segunda, tercera, cuarta y quinta línea, mediante técnica de microdilución (Sensititre™ MYCOTB MIC o RAPMYCO, Trek Diagnostics).

La sensibilidad fenotípica de cada aislamiento se expresó como sensible o resistente según el resultado obtenido en la primera aproximación y, en el caso de cepas resistentes, se incluyó la CMI observada en la placa de microdilución.

### **3. Secuenciación e interpretación del genoma completo**

La SCG de las micobacterias se realizó en el laboratorio del FISABIO bajo la supervisión del equipo de trabajo del Dr. Comas. Para ello, las cepas de MTBC en medio de LJ o MGIT o sus ADN extraídos en el caso de cepas resistentes, se llevaron al CSISP, donde está localizado el laboratorio de bioseguridad P3. Allí se procesaron para su posterior secuenciación con la tecnología Illumina®. Esta parte del trabajo fue posible gracias al Proyecto MINECO SAF2013-43521-R para la SCG de todas las cepas de MTBC aisladas en la CV a partir de 2014. Por esta razón, las secuencias analizadas en este estudio corresponden a las cepas aisladas en 2014 y principios del año 2015. Se seleccionaron aleatoriamente, además, algunas cepas de entre las resistentes de 2013, para poder ampliar la búsqueda de las mutaciones asociadas a resistencia fenotípica.

Para el proceso de secuenciación, en primer lugar, se extrajo el ADN de la micobacteria, bien tras suspensión de un asa de colonias en TE (Tris con EDTA) o en agua libre de nucleasas y calor en termobloque a 96°C durante 1 hora o, en algunos casos, empleando extractores semiautomáticos (*Magpurix®DNA Extraction Kit*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Puesto que la concentración de ADN inicial es crucial para una correcta secuenciación, se ajustó mediante dilución en agua hasta 0,2ng, para así poder emplear 5µL y tener una concentración de partida de 1ng. Para

su medición se empleó el sistema fluorométrico Qubit®3.0 (puede usarse una concentración de 0,5ng/μL en un volumen final de 20μL)

Con el kit de preparación de librerías Nextera®XT DNA se procesaron los extraídos de las muestras para su posterior secuenciación en grupo (*pool* de secuencias). Esta tecnología permite fragmentar el ADN y a su vez ir añadiendo adaptadores, proceso conocido como *tagmentación*. Tras la amplificación y purificación de estos fragmentos de ADN señalizados con adaptadores, se pueden secuenciar varias cadenas cortas y posteriormente unirlos para recuperar largas secuencias de genoma completo. La calidad de las librerías se comprobó mediante Bioanalyzer (Agilent) y posteriormente se cargaron en la plataforma MiSeq de Illumina® para su completa secuenciación.

Estas secuencias las delineamos y comparamos con la cepa tipo H37RV y los datos de mutaciones conocidas, empleando el programa bioinformático *PhyResSE* de acceso gratuito en internet, para obtener datos de resistencia a fármacos antituberculosos y linaje (135). Los criterios del programa *PhyResSE* para valorar la calidad de las secuencias y la fiabilidad de las mutaciones son: al menos 5 lecturas correctas, buena concordancia tras lectura en ambas direcciones y al menos 12pb de distancia entre los SNPs.

Se recogió la información referida al linaje de MTBC y al patrón de resistencias que, posteriormente, se comparó con la procedencia del paciente o vínculo de contagio y con las resistencias fenotípicas obtenidas para cada cepa. Se registraron las

concordancias y discrepancias y se profundizó en estas últimas, incluyendo medidas de sensibilidad y especificidad de la técnica comparada con otras aproximaciones moleculares implantadas en el laboratorio y el estudio de sensibilidad en cultivo.

En la Tabla III.2 se recogen las mutaciones asociadas a resistencia detectadas por el programa *PhyResSE*.

**Tabla III.2:** Resistencias conocidas detectadas por *PhyResSE*:

ID Gen/ nombre	Inicio Gen	Fin Gen	antiTB
Rv0005/ <i>gyrB</i>	5240	7267	FQ
Rv0006/ <i>gyrA</i>	7302	9818	FQ
Rv0486/ <i>mshA</i>	575348	576790	ETH
Rv0667/ <i>rpoB</i>	759807	763325	RIF
Rv0682/ <i>rpsL</i>	781560	781934	STR
Rv0701/ <i>rplC</i>	800809	801462	LZD
MTB000019/ <i>rrs</i>	1471846	1473382	AGis
MTB000020/ <i>rrl</i>	1473658	1476795	LZD
Rv1483/ <i>fabG1</i>	1673440	1674183	INH
Rv1484/ <i>inhA</i>	1674202	1675011	INH,ETH
Rv1630/ <i>rpsA</i>	1833542	1834987	PZA
Rv1694/ <i>tlyA</i>	1917940	1918746	CPR
Rv1854c/ <i>ndh</i>	2103042	2101651	INH,ETH
Rv1908c/ <i>katG</i>	2156111	2153889	INH
Rv2043c/ <i>pncA</i>	2289241	2288681	PZA
Rv2416c/ <i>eis</i>	2715332	2714124	KAN
Rv2428/ <i>ahpC</i>	2726193	2726780	INH
Rv2764c/ <i>thyA</i>	3074471	3073680	PAS
Rv3793/ <i>embC</i>	4239863	4243147	EMB
Rv3794/ <i>embA</i>	4243233	4246517	EMB
Rv3795/ <i>embB</i>	4246514	4249810	EMB
Rv3854c/ <i>ethA</i>	4327473	4326004	ETH
Rv3919c/ <i>gidB</i>	4408202	4407528	STR

**ID:** identificación; **antiTB:** fármaco antituberculoso; **INH:** isoniácida; **FQ:** fluorquinolonas; **ETH:** etionamida; **RIF:** rifampicina; **STR:** estreptomina; **LZD:** linezolid; **AGis:** aminoglucósidos inyectables (incluye STR,AK,KAN,CPR); **PZA:** piracinamida; **CPR:** capreomicina; **KAN:** kanamicina; **PAS:** ácido para-aminosalicílico; **EMB:** etambutol

Para definir las relaciones filogenéticas entre las cepas inferimos una filogenia a partir del alineamiento entre todas las posiciones variables entre ellas. La inferencia se

realizó mediante el método de distancias *Neighbour-joining* implementado en MEGA (137) y sin corrección de distancias debido a que la mayoría de posiciones son bialélicas. Un total de 1.000 pseudo-réplicas del alineamiento original se usaron para la inferencia.

#### **4. Método estadístico**

Las variables y resultados, tanto descriptivos como microbiológicos y de secuenciación, se recogieron en una base de datos Excel (Excel 2011) a partir de la que se efectuó el análisis estadístico, con la ayuda de la Unidad de Bioestadística del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, empleando el *Software R* (versión 3.3.2), una aplicación gratuita para cálculos estadísticos y gráficos (R Project Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>).

Las variables descriptivas se resumieron mediante la media, desviación estándar, rango y mediana en el caso de variables continuas y en frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas. Para el análisis bivariante se empleó el test Chi cuadrado de asociación, que mide el grado de dependencia entre dos variables categóricas, y el test T-student en el caso de muestras independientes. No todas las variables de estudio estaban registradas en el total de la muestra, por lo que cada cruce específico se evaluó en el subconjunto de casos válidos. El grado de significatividad empleado fue el 5%, por lo que cualquier p-valor menor a 0.05 fue indicativo de relación estadísticamente significativa.



### *Material y métodos*

En el análisis del acuerdo entre los resultados de sensibilidad proporcionados por el método fenotípico frente al genotípico o a la SCG, se estimó el índice Kappa de concordancia.

Para facilitar la comprensión de los resultados, se utilizaron gráficos de coordenadas *effect plot*, realizando previamente correcciones en los casos necesarios.

Además, se empleó el programa SPSS para la realización de tablas de contingencia y el cálculo de los intervalos de confianza.



## **RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**



## IV RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

### 1. Datos epidemiológicos y de presentación clínica

Entre enero de 2011 y diciembre de 2015, en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe se procesaron 18683 muestras para cultivo de micobacterias, aislándose MTBC en 826 (4,4%) muestras de 254 enfermos, lo que supuso una media de 50,8 casos diagnosticados por año y 3,3 muestras positivas por enfermo. Del total de enfermos diagnosticados, 60 (23,6%) fueron atendidos en el Hospital Dr. Moliner (H Moliner) y seguidos en el Centro de Atención a Sin Techo (CAST) y no se incluyeron en el análisis de resultados epidemiológicos de este trabajo. La distribución de casos diagnosticados por año según hospital de procedencia se muestra en la Figura IV.1.

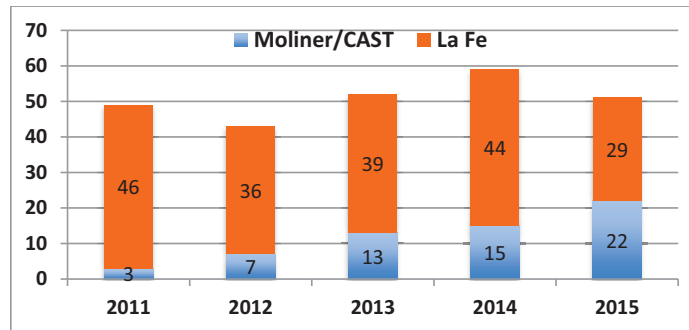


Figura IV.1: Casos de TB diagnosticados por año.

El número de enfermos ingresados en el H Moliner ha ido en aumento desde el año 2011, tras convertirse en el destino de los enfermos con TB de toda la CV que requieren ingreso más prolongado de lo habitual, ya sea por problemas sociales, de cumplimiento del tratamiento o por resistencia a fármacos de primera línea. Este

aumento se refleja en el porcentaje de casos pertenecientes a este hospital confirmados en nuestro Servicio, que aumentó un 37% entre el año 2011 y el 2015, suponiendo un 43,1% de las TB confirmadas microbiológicamente en el último año del estudio.

De los 194 (76,4%) enfermos diagnosticados en el HUP La Fe, 93 (48%) pertenecían a Departamentos de Salud distintos al DS La Fe. En la Tabla IV.1 se resumen los datos del Informe de TB emitido durante cada uno de estos años por el CSISP de la CV referentes al DS La Fe y se comparan con los datos confirmados en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe. Para el cálculo de las tasas se emplearon los datos de población adscrita al DS La Fe aportados por el Servicio de Documentación del HUP La Fe, resumidos en el apartado de material y métodos.

**Tabla IV.1:** Comparación entre los resultados del DS La Fe emitidos en los Informes de TB de la CV (resaltados en gris) y los obtenidos en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe.

Año	Tasa (100.000 h)	Casos declarados	Edad media	Varones (%)	Inmigrantes (%)	VIH + (%)	Estudio de sensibilidad	Resistencia global
2011	16,6	30	39,8	40	13,3	16,7	20	3 (15%)
	22,2 (10,2*)	46 (21*)	40,3	59	60,9	19,6	46 (21*)	11 (8*)
2012	13,9	25	37,5	56	8	8	14	2 (14,3%)
	17,9 (7,5*)	36 (15*)	39	72,2	63,9	2,8	36 (15*)	5 (3*)
2013	18,1	32	39,4	65,6	21,9	3,1	27	5 (18,5%)
	19,5 (11*)	39 (22*)	38,6	64,1	46,2	2,6	39 (22*)	5 (3*)
2014	15,3	27	46,8	55,6	7,4	7,4	24	4 (16,7%)
	22,4 (11,7*)	44 (23*)	39,8	65,9	29,5	9,1	44 (23*)	3 (3*)
2015	9,7	27	41,2	63	37	18,5	19	4 (21,1%)
	9,9 (7,1*)	29 (20*)	40,5	71,4	55,2	17,2	28 (20*)	1 (1*)

(\*): enfermos pertenecientes al DS La Fe.

La tasa estimada por los Informes de Salud de la CV es menor a la confirmada por cultivo en el Servicio de Microbiología del HUP La Fe, debido probablemente a que

### *Resultados y discusión*

no todos los pacientes diagnosticados pertenecen al DS La Fe y son asignados por el CSISP como casos a otros DS; sin embargo, la tasa estimada es mayor si se tienen en cuenta sólo a los enfermos pertenecientes al DS La Fe. Esto puede deberse a que no todos los casos de TB declarados se confirman por microbiología. Sí que coinciden, a excepción del año 2013, el número de casos en que se realizó estudio de sensibilidad según el Informe de TB de la CV con el número de enfermos con TB confirmada por cultivo pertenecientes al DS La Fe; no obstante, el dato de la resistencia global no coincide, por lo que sería interesante profundizar en cómo se realiza el proceso de transmisión de esta información para tratar de mejorarlo.

La información epidemiológica y clínica de 193 casos se resume y analiza a continuación. Los datos epidemiológicos de uno de los enfermos se han excluido ya que usurpó una tarjeta sanitaria y los datos reflejados en nuestro sistema de admisión son incorrectos; sin embargo, los datos microbiológicos de este caso sí que se han incluido en la estadística general ya que coinciden con el momento del diagnóstico.

En la Tabla IV.2 se resumen los datos epidemiológicos según la forma de presentación clínica de TB.

**Tabla IV.2:** Resumen de las características epidemiológicas de los pacientes según su forma de presentación clínica.

	TB pulmonar	TB extrapulmonar
	(121)	(72)
	n (%)	
<b>Intervalo edad (años)</b>		
0-5	5 (4,1)	6 (8,3)
6-19	11 (9,1)	2 (2,8)
20-29	22 (18,2)	16 (22,2)
30-39	26 (21,5)	18 (25,0)
40-49	24 (19,8)	12 (16,7)
50-59	18 (14,9)	3 (4,2)
60-69	8 (6,6)	5 (6,9)
70-79	6 (5,0)	3 (4,2)
>80	1 (0,8)	7 (9,7)
<b>Varones</b>	88 (72,7)	39 (54,2)
<b>Nacionalidad española</b>	61 (50,4)	33 (45,8)
<b>Enfermedad de base</b>	47 (39,5)	44 (61,1)
<b>Hábitos Tóxicos</b>	67 (59,8)	23 (33,3)

### 1.1 Generalidades, mapas de localización y estudio de contactos

La edad media de los individuos enfermos fue 39,6 años (5 meses-90 años) y 127 (65,4%) eran varones.

La mayoría de los enfermos (61,1%) tenían edades comprendidas entre 20 y 50 años (Figura IV.2), dato que coincide con lo recogido en la literatura, que muestra que los adultos en edad fértil son los más afectados (19). En nuestra serie, el 7,3% (14/193) de los enfermos eran menores de 15 años y, en concreto, un 5,7% (11/193) tenían menos de 5 años, lo que se correlaciona con la prevalencia estimada en los países de baja incidencia (*"low burden"*), donde los casos de TB declarados en edad infantil corresponden al 2-7% del total (17).



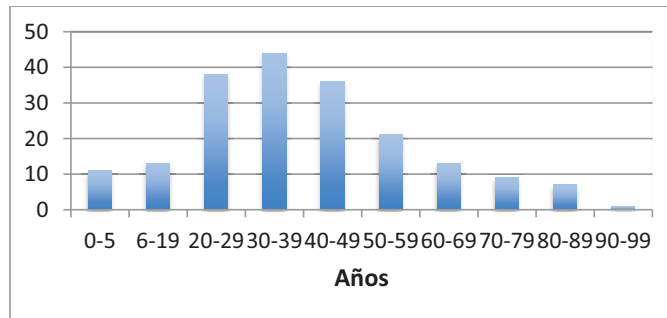


Figura IV.2: Distribución de los enfermos según intervalo de edad.

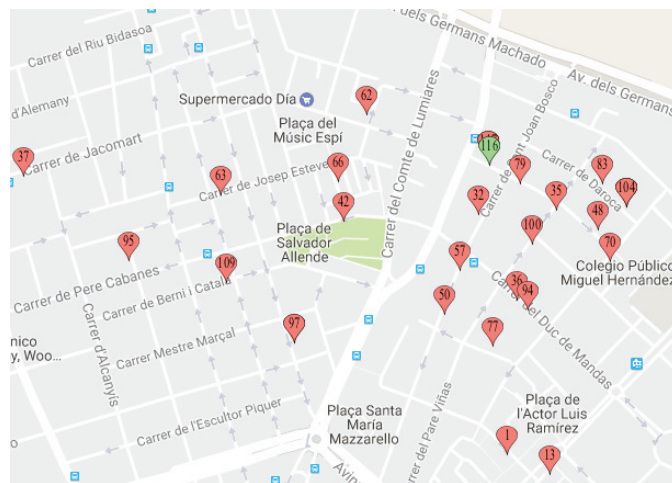
La localización de la residencia habitual de los enfermos con vivienda en el área metropolitana de Valencia se resalta en las Figuras IV.3, IV.4 y IV.5. Doce pacientes vivían en la calle y dormían en albergues temporalmente.



Figura IV.3: Localización de la residencia habitual de los enfermos con TB confirmada en el HUP La Fe (enero 2011-diciembre 2015)



**Figura IV.4:** Ampliación de la Figura IV.3.



**Figura IV.5:** Ampliación de la zona Torrefiel-Rascaña. En verde el Centro Municipal de Servicios Sociales.

Como se aprecia en estas imágenes, los casos se concentraron en la zona de Torrefiel-Rascaña y, en concreto, en calles consideradas de alta vulnerabilidad por el Departamento de Estadística del ayuntamiento de Valencia, donde desde el año 2016 analizan el equipamiento, la demografía y la socioeconomía de cada una de las Secciones Censales del municipio de Valencia para poder detectar aquellas que puedan

requerir atención especial por parte de la administración (138). Sería, por lo tanto, interesante realizar cribado de enfermedad tuberculosa en estas secciones.

En 39 casos se desconocía el número de convivientes, 17 enfermos (10,9%) vivían solos y 22 (14,1%) con al menos 4 personas más en una misma vivienda. Hubo un posible caso de contagio entre tres convivientes cuyo vínculo demostramos en un trabajo previo en el que empleamos el método de epidemiología molecular MIRU-VNTR (139). En la Figura IV.6 se resume el resultado de ese brote analizado por dicha técnica, en el que el número de repeticiones de secuencias conocidas del genoma de *M. tuberculosis* coincidió en los tres enfermos y fue distinto al de otros casos contemporáneos que no vivían en el mismo domicilio.

Genome position number	580	2996	802	960	1644	3192	424	577	2165	2401	3690	4156	2163b	1955	4052
Locus name	MIRU 04	MIRU 26	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	VNTR 42	VNTR 43	VNTR ETR-A	VNTR 47	VNTR 52	VNTR 53	VNTR QUB11b	VNTR 1955	VNTR QUB-26
DNA sample															
159*	2	4	1	3	2	3	1	4	2	1	2	2	4	3	4
162*	2	4	1	3	2	3	1	4	2	1	2	2	4	3	4
163*	2	4	1	3	2	3	1	4	2	1	2	2	4	3	4
170	2	7	3	6	4	4	4	2	4	4	4	4	2	4	7
112	2	3	3	3	1	3	4	4	1	2	1	2	4	3	4
113	2	7	3	3	3	4	2	4	4	4	2	3	6	4	7

\*Las cepas coloreadas en gris tienen el mismo patrón molecular.

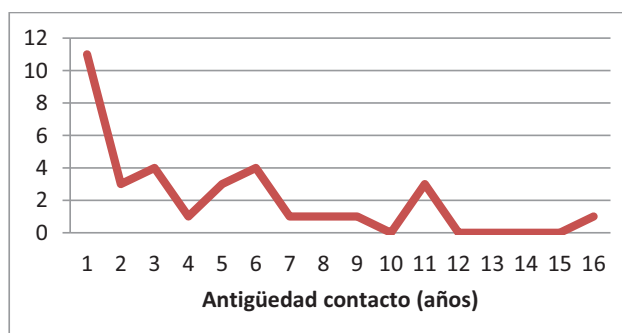
Figura IV.6: Resumen de los resultados obtenidos tras realizar análisis MIRU-VNTR.

La técnica MIRU-VNTR fue sustituida en el año 2014 por la SCG para el análisis epidemiológico de brotes en la CV, debido a que esta última permite, además de

vincular contactos, saber en qué orden se ha producido el contagio para poder identificar los casos índice.

En el presente estudio, a pesar de este caso de contagio directo por aglomeración en la misma vivienda, el hacinamiento no fue un factor determinante para padecer TB, al ser similar el porcentaje de enfermos que vivían solos al de los que tenían más de cuatro convivientes, lo que podría aumentar la posibilidad de haber adquirido la infección fuera de la vivienda habitual. Sería interesante, por lo tanto, recoger otros datos en las encuestas epidemiológicas, tales como los hábitos diarios y el nombre de los locales comerciales, centros sociales o de ocio frecuentados, para intentar identificar focos de contagio distintos a los convivientes, al igual que se ha sugerido en otro estudio (140).

El origen de la infección fue recogido en 182 (94,3%) historias clínicas. El 22,7% de los pacientes recordaba haber tenido un contacto próximo con otro enfermo bacilífero. En 7 pacientes no constaba en la historia clínica el tiempo desde el contacto. El resto de tiempos desde el contacto se resumen en la Figura IV.7.



**Figura IV.7:** Número de casos según años de antigüedad de contacto.

El tiempo desde el contacto fue de menos de un año en 11 casos y de entre uno y dos años en otros 7, por lo que la mitad de los enfermos en los que aparecía recogida esta información recordaban haber tenido un contacto próximo en los dos años previos al momento del diagnóstico, dato que coincide con lo estimado por el *Centers for Disease Control – CDC* (141).

De los 141 enfermos restantes, 4 tenían vías de infección distinta a la respiratoria (3 becegeitis y 1 *M. bovis*), 6 eran indigentes o dormían en albergues, 4 referían posible infección en su trabajo y 2 sospechaban haber padecido TB en su infancia. En 125 (68,7%) casos no se reconocía ninguna posible fuente de contagio, y la mayoría de ellos se concentraban de nuevo en la zona Torrefiel-Rascaña, lo que apoya la sugerencia de buscar focos de contagio en zonas próximas a la vivienda y frecuentadas diariamente a través de nuevos datos en las encuestas epidemiológicas.



**Figura IV.8:** Residencia habitual de los enfermos que desconocían contacto previo con otro caso de tuberculosis.

En 84 historias clínicas aparecía recogido el resultado de alguna de las dos pruebas de ITL, siendo positiva al menos una de ellas en 70 (83,3%) enfermos. El Mantoux o PT aparecía registrado en 65 casos, siendo la induración mayor de 5 mm de diámetro en 50 (76,9%) enfermos, 44 con induración >10 mm. La prueba IGRA (Quantiferon®, QTF) se había realizado en 37 ocasiones, siendo positiva en 26 (70,3%), y en 5 (13,5%) indeterminado. En las Tablas IV.3 y IV.4 se resumen las características clínicas y epidemiológicas de los enfermos con PT o QTF negativo, respectivamente.

**Tabla IV.3:** Características de los enfermos con prueba de tuberculina negativa.

Caso	Edad/ Sexo	País de origen	Enf de base	Contacto conocido	QTF	Forma clínica	Evolución
5	38/M	GNQ	VIH	No	NR	TBEP (miliar)	Buena
17	4m/M	MAR	No	Sí	NR	TBP	Buena
30	35/V	NGA	VIH	ND	POS	TBEP (ganglionar)	Buena
52	66/V	ESP	ROS	No	NR	TBEP (miliar)	Éxito
57	28/V	ESP	EII	No	IND	TBEP (miliar)	Buena
58	51/V	BOL	No	Sí	NR	TBP	Buena
114	89/M	ESP	DM, HTA	ND	NR	TBEP (meníngea)	ND
115	22/V	GHA	VIH	ND	POS	TBEP (miliar)	Buena
124	44/V	ESP	EII	No	NR	TBEP (miliar)	Buena
130	37/V	ECU	No	No	POS	TBEP (pleural)	Buena
134	20/V	ESP	IS	No	NEG	TBEP (ganglionar)	Buena
145	30/M	ESP	ROS	No	NEG	TBEP (pleural)	Buena
152	50/V	ESP	EII	ND	POS	TBP	Buena
160	46/M	ECU	No	Sí	NR	TBP	Buena
172	48/V	ESP	No	Sí	NEG	TBEP (meníngea)	Buena

**QTF:** Quantiferon®; **m:** meses; **M:** mujer; **V:** varón; **GNQ:** Guinea Ecuatorial; **MAR:** Marruecos; **NGA:** Nigeria; **ESP:** España; **BOL:** Bolivia; **GHA:** Ghana; **ECU:** Ecuador; **NR:** no realizado; **ROS:** receptor de órgano sólido; **ND:** no disponible; **IS:** tratamiento inmunosupresor; **EII:** enfermedad inflamatoria intestinal; **TBEP:** tuberculosis extrapulmonar; **TBP:** tuberculosis pulmonar.

**Tabla IV.4:** Características de los enfermos con Quantiferon® negativo.

Caso	Edad/ Sexo	País de origen	Enf de base	Contacto conocido	PT	Forma clínica	Evolución
134	20/V	ESP	IS	No	NEG	TBEP (ganglionar)	Buena
139	39/V	ROU	VIH	No	NR	TBEP (miliar)	Pérdida de seguimiento
145	30/M	ESP	ROS	No	NEG	TBEP (pleural)	Buena
146	48/V	ESP	DM, neoplasia	ND	NR	TBP	Buena
172	48/V	ESP	No	Sí	NEG	TBEP (meníngea)	Buena
184	86/V	ESP	DM	No	POS	TBEP (pleural)	Buena

PT: tuberculina; V: varón; M: mujer; ESP: España; ROU: Rumania; DM: Diabetes mellitus; NR: no realizado; ROS; receptor de órgano sólido; ND: no disponible; IS: tratamiento inmunosupresor; TBP: tuberculosis pulmonar; TBEP: tuberculosis extrapulmonar.

En 18 casos aparecía el resultado de ambas pruebas, con una concordancia muy baja entre ellas, aunque es un número de resultados insuficiente para extraer conclusiones estadísticamente significativas (Figura IV.9).

	QTF +	QTF IND	QTF -
PT +	6	3	1
PT -	4	1	3

**Figura IV.9:** Resultados de detección de ITL en los enfermos con ambas pruebas.

Estas pruebas no están indicadas para el diagnóstico de enfermedad activa, pero a menudo se solicitan como prueba complementaria ante la ausencia de otras pruebas que confirmen la sospecha clínica de TB. En este estudio, a pesar de que la mayoría de los pacientes tenían al menos una prueba de ITL positiva, una prueba negativa no permitió descartar la enfermedad (15/65 PT negativas y 6/37 QTF negativos), siendo similar el porcentaje de QTF negativo de este grupo (16,2%) al encontrado en el metanálisis de Sester y cols (142). La mayoría de resultados

negativos se dieron en formas extrapulmonares, lo que coincide con lo observado previamente en otra revisión (143).

Un 6% de los enfermos (11/193) refería haber padecido TB al menos una vez antes (Tabla IV.5). Aunque el número de casos es también pequeño para extraer conclusiones estadísticamente significativas, podemos observar que no hubo diferencias por país de origen ni por enfermedad de base. La mayoría presentaron forma clínica pulmonar y las cepas eran sensibles a los fármacos antituberculosos de primera línea. No se pudo establecer si se trataba de recidivas o reinfecciones. En la mitad de los casos el intervalo de tiempo desde el episodio anterior fue mayor de 6 años (media 8,6 años; intervalo, 2-30). Se observó diferente sensibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea en 4 casos, aunque esta información no estuvo disponible en todos ellos.

La recidiva de TB ha sido descrita en pacientes coinfectados con el VIH a pesar de haber cumplido correctamente el tratamiento, especialmente en aquellos con recuentos bajos de linfocitos CD4 (144). Otros factores de riesgo descritos en la literatura para recurrencia de TB, además del VIH, son el alcoholismo, el tabaquismo, el compromiso extrapulmonar, la DM, la insuficiencia renal crónica y la silicosis (145). En nuestro trabajo, 3 de los 4 pacientes coinfectados por el VIH que presentaron recaída de TB tenían menos de 50 linfocitos CD4 en el momento del diagnóstico, aunque uno de ellos no había completado el tratamiento en el primer episodio. Otro presentaba asociación de silicosis y DM, ambos factores de riesgo también asociados a recaídas. De los 3 pacientes que no tenían enfermedad de base, 2 tuvieron TB



### *Resultados y discusión*

resistente en el primer episodio, lo que podría explicar la recaída. El otro paciente sin enfermedad de base, procedía de un país endémico (Guinea Ecuatorial), por lo que podría haberse reinfectado, aunque para esclarecer esta posibilidad habría que analizar y comparar ambas cepas.

**Tabla IV.5:** Resumen de los casos con antecedentes de TB.

Caso	Edad / Sexo	País de origen	Enf de base	Episodio previo	TDEP	Episodio actual /IREP	Tratamiento	Evolución
10	45/M	ESP	VIH (CD4: 198)	TB diseminada pansensible	ND	TB ganglionar / SRS-	HEZ+LEV	Buena
11	45/V	ROU	No	TBP R PZA y EMB	2	TBP / SSSS	HRiE+AK+MXF	Buena
20	25/M	ESP	VIH (CD4: 25)	TB ganglionar pansensible	2	TB diseminada / SSSS	HRiZE	Pérdida de seguimiento
37	45/V	ROU	Asma	TBP; tratamiento 6 m	8	TBP / SSSS	HRiZE	Recidiva
44	74/V	ESP	Silicosis, DM	TBP pansensible	10	TBP / RRSR	NO	Éxito
69	26/M	GNO	No	TBP; tratamiento completo	8	TBP / SSSS	HRiZE	Buena
105	55/V	ESP	Demencia	TBP; tratamiento completo	30	TBP / SRRS-	HRZE	Buena
109	53/M	ESP	ROS (pulmón)	TB diseminada	ND	TB diseminada / SSSS	HRiZE	Buena
131	42/V	ESP	VIH (CD4: 8)	TBP; tratamiento incompleto	16	TBP / SSSS	HRiZE	Pérdida de seguimiento
139	39/V	ROU	VIH (CD4: 4)	TB ganglionar; tratamiento 8m	2	TB diseminada / SSSS	NO	Pérdida de seguimiento
181	39/V	ESP	No	TBP R INH; tratamiento completo	8	TBP / SSSS	HRiZE	Buena

**M:** mujer; **V:** varón; **ESP:** España; **ROU:** Rumania; **GNO:** Guinea Ecuatorial; **DM:** Diabetes mellitus; **ROS:** receptor de órgano sólido; **TB:** tuberculosis; **TBP:** tuberculosis pulmonar; **m:** meses; **IREP:** isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida (se muestra su sensibilidad fenotípica (S) o resistencia (R) fenotípica por ese orden); **TDEP:** tiempo desde episodio previo (expresado en años); **ND:** no disponible; **HRiEZ:** isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida; **INH:** isoniazida; **PZA:** pirazinamida; **EMB:** etambutol; **LEV:** levofloxacino; **AK:** amikacina; **MXF:** moxifloxacino; **tto:** tratamiento

## *Resultados y discusión*

De los 194 enfermos diagnosticados tras ser atendidos directamente en el HUP La Fe, en 5 se aisló MTBC en muestras recogidas con más de un año de separación entre ellas, pero no se consideraron casos nuevos por no haber recibido tratamiento completo durante más de 12 meses entre los episodios.

En 11 enfermos no se pudo realizar seguimiento por traslado a otro Centro o por no presentarse a los controles ambulatorios posteriores al episodio.

Del total de pacientes, 17 (8,8%) fallecieron (Tabla IV.6), todos ellos en menos de 10 meses tras el diagnóstico de la enfermedad y 10 (58,8%) en los primeros 10 días. Todos los fallecidos eran adultos, la mayoría españoles, con forma de presentación clínica predominante pulmonar y cepas polisensibles, a excepción de 3 MDR-TB. En total, 9 de las 17 muertes podrían haber sido consecuencia de la propia TB por tratarse de formas diseminadas o resistentes. El porcentaje de fallecidos es, por lo tanto, similar al descrito en otros estudios (146,147). En ellos se resalta que la mortalidad se debe mayoritariamente a causas ajenas a la propia enfermedad tuberculosa, pero que, cuando la muerte deriva directamente de la TB, el tiempo entre el diagnóstico y el fallecimiento es de menos de un mes, dato que coincide con lo hallado en nuestro trabajo.

**Tabla IV.6:** Características de los pacientes que fallecieron tras el diagnóstico de TB.

Caso	Edad/ Sexo	Origen	Enf de base	Forma clínica	IREP
3	41/V	ESP	VIH, VHC	TBP	SSSS
33	76/M	ESP	AntiTNF	TBEP (miliar)	SSSS
35	38/V	MAR	No	TBP	SSSS
36	25/M	ESP	Otra	TBEP (pleural)	SSSS
44	74/V	ESP	Pulmonar, DM, IS	TBP	RRSR
52	66/V	ESP	ROS, VHC	TBEP (miliar)	SSSS
59	52/V	LTU	No	TBP	RRSS
81	58/V	ESP	No	TBP	SSSS
89	29/V	ESP	EII, hematológica	TBP	SSSS
90	40/V	ESP	Psicosocial	TBP	SSSS
122	51/V	ESP	ROS, HTA, DM	TBP	SSSS
132	65/V	ESP	Psicosocial	TBEP (miliar)	SSSS
136	43/M	ARG	Hematológica	TBP	SSSS
142	56/V	ESP	Desconocido	TBP	SSSS
143	25/M	IND	No (embarazo)	TBEP (meníngea)	SSSS
155	90/M	ESP	IS, DM	TBEP (meníngea)	SSSS
190	36/M	UKR	VIH	TBP	RRSS

**V:** varón; **M:** mujer; **ESP:** España; **MAR:** Marruecos; **LTU:** Lituania; **ARG:** Argentina; **IND:** India; **UKR:** Ucrania; **DM:** Diabetes mellitus; **ROS:** receptor órgano sólido; **HTA:** hipertensión arterial; **EII:** enfermedad inflamatoria intestinal; **IS:** inmunosupresión; **TBP:** tuberculosis pulmonar; **TBEP:** tuberculosis extrapulmonar; **IREP:** isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida (se muestra su sensibilidad (**S**) o resistencia (**R**) fenotípica por ese orden)

## 1.2 Factores de riesgo

Cincuenta y ocho enfermos referían tener un trabajo estable en el momento del diagnóstico de la enfermedad, 50 eran menores de edad, estudiantes o jubilados y 70 estaban en paro o realizando trabajos temporales (Figura IV.10).

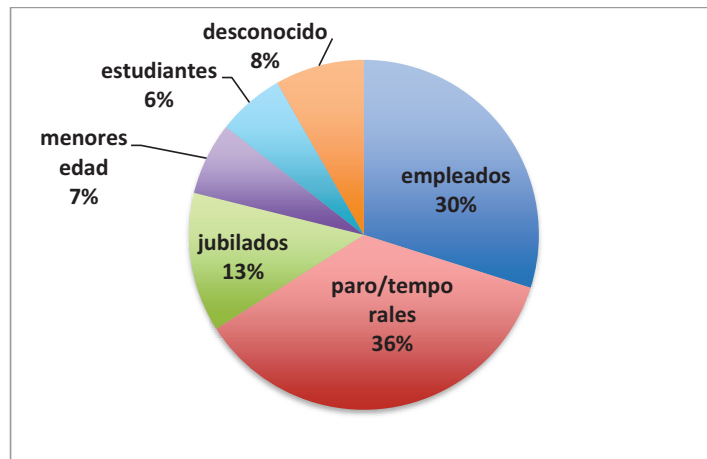


Figura IV.10: Porcentaje de empleo/desempleo de los enfermos con TB.

La mitad de los enfermos tenían una o más enfermedades de base (Tabla IV.7).

Tabla IV.7: Enfermos con TB y enfermedad subyacente o situación predisponente por año.

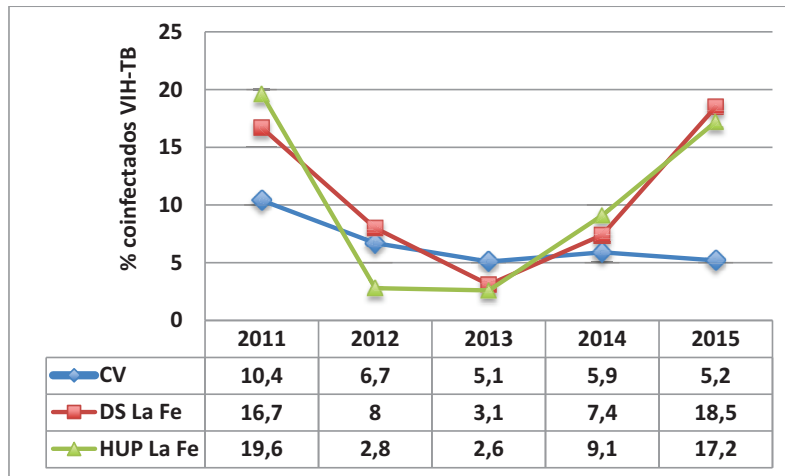
	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL
	(n)					
VIH	9	1	1	4	5	20
Hepatitis vírica (VHC/VHB)	2 (1/1)	3 (3/0)	1 (1/0)	6 (4/2)	1 (0/1)	13
DM	3	3	4	6	2	18
EII	1	1	1	2	0	5
Neoplasia	2	1	2	3	1	9
Psiquiátrico/Social	1	0	1	3	2	6
Gestación	0	2	0	2	1	5
ROS	0	4	1	3	0	8
Hematológico	1	1	1	2	2	7
Silicosis	2	0	0	0	0	2
Enfermedad pulmonar/asma	3	1	1	0	0	5
HTA	4	1	4	4	3	16

DM: Diabetes mellitus; EII: enfermedad inflamatoria intestinal; ROS: receptor de órgano sólido; HTA: hipertensión arterial.

Más de un tercio de los enfermos (36%) estaban desempleados o tenían trabajos temporales en el momento del diagnóstico, condición que podría influir en el nivel socioeconómico, aspecto clásicamente asociado a TB, aunque un estudio reciente demostró que esa asociación era válida para pacientes nativos en EEUU, pero no para los inmigrantes a ese mismo país (148).

Las enfermedades de base presentes con mayor frecuencia en este estudio fueron la coinfección con el VIH, la DM, la hipertensión arterial (HTA) y la coinfección por virus de la hepatitis.

El número de enfermos coinfectados con el VIH ha ido variando en estos 5 años de estudio, suponiendo en total un 10,4% de los casos en todo el periodo, cifra similar a la mencionada por la OMS para el año 2007 (149) y superior a la recogida en la revisión europea del año 2014 (150). En los informes anuales de TB de la CV, este valor se ha reducido a la mitad, aunque en nuestro Departamento, a pesar de haberse observado un descenso en los primeros años, el porcentaje de casos en coinfectados fue casi igual al final que al principio del período de estudio (Figura IV.11).



CV: Dato reflejado en el Informe de Salud anual del CSISP; DS La Fe: Dato reflejado en el Informe de Salud del CSISP; HUP La Fe: Dato calculado en este estudio.

Figura IV.11: Evolución del porcentaje de enfermos con TB coinfectados con VIH.

Otro 10% de los enfermos con TB eran diabéticos, porcentaje prácticamente constante a lo largo del periodo de estudio e igual al estimado en el mundo según el proyecto TANDEM (151). Esta información no se recoge en el Informe anual de TB de la CV, por lo que no se ha podido comparar con el del resto de la región. La OMS ha relacionado la DM con triple riesgo de desarrollar esta enfermedad infecciosa y por ello incluye a los enfermos con DM como diana en sus intervenciones de búsqueda activa de ITL (152).

Otras situaciones de base que se encontraron y que hay que tener en cuenta a la hora del diagnóstico diferencial fueron el tratamiento prolongado con inmunosupresores, condición mencionada clásicamente y repetida en la literatura (153), y el embarazo. Hasta finales del siglo XIX se creía que el embarazo era beneficioso para la luchar contra la enfermedad, al favorecer el colapso de las

cavitaciones pulmonares, mientras que a principios del siglo XX se cambió de actitud y la recomendación era abortar (154). Los estudios más recientes apuntan a que la incidencia en embarazadas es la misma que en la población general (155), aunque la pérdida de anticuerpos maternos durante la lactancia y la situación añadida de estrés por la condición de embarazo, podrían favorecer la reactivación de la ITL, siendo necesarios más estudios para respaldar esta hipótesis.

Casi la mitad de los enfermos (46,4%) asumían hábitos tóxicos, es decir, eran fumadores o bebedores activos (más de 2 cigarrillos y/o más de 1 litro de alcohol al día) o consumían otro tipo de drogas. En 13 casos se desconocía esta información. A pesar de que la OMS ha demostrado que fumar aumenta el riesgo de desarrollar TB (156), el número de pacientes fumadores con TB en nuestro estudio es inferior al de no fumadores. Casi un tercio de nuestros enfermos (26,4%) no tenían hábitos tóxicos ni presentaba enfermedad de base; sin embargo, un 74,5% (38/51) de los pacientes eran inmigrantes. Por lo tanto, estaría justificado el considerar la TB en el diagnóstico diferencial en cualquier enfermo con clínica sugerente, independientemente de su estado de salud basal, hábitos tóxicos y nivel socioeconómico, sobre todo si es inmigrante y de país con mayor incidencia que España.

Un total de 99 (51,3 %) enfermos eran extranjeros, 1 de ellos de Francia, y el resto procedentes casi a partes iguales de 4 de las Regiones de la OMS (Figura IV.12). Los niños menores de 5 años hijos de inmigrantes, aunque hubieran nacido en España, se consideraron dentro de este grupo, siendo 8 los casos. En las Figuras IV.13 y IV.14 se resumen las características de los enfermos de origen extranjero.



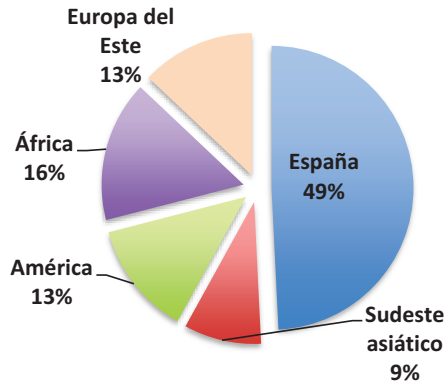


Figura IV.12: Porcentaje de enfermos por región de origen.

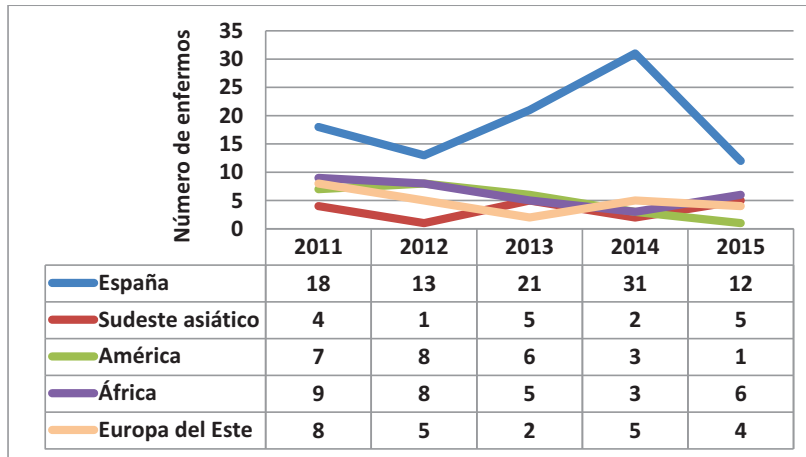


Figura IV.13: Número total de enfermos por región de origen y año.

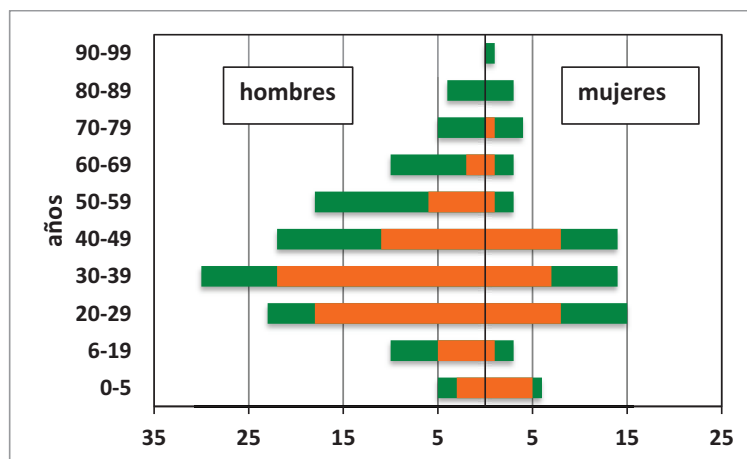


Figura IV.14: Distribución por edad, sexo y procedencia (en naranja los inmigrantes).

En cuanto al tiempo desde su llegada a nuestro país, 11 llevaban un año o menos en España y 51 residían en la CV desde hacía más de 5 años. En total 35 extranjeros (35,3%) reconocían haber visitado su país en el último año o llevar menos de 1 año residiendo en España antes del diagnóstico de su enfermedad.

Un poco más de la mitad de los enfermos eran, por lo tanto, inmigrantes, cifra mayor a la calculada en los Informes de Salud emitidos por el CSISP, y algo superior a la del resto de España (20) donde, desde que la infección por el VIH se ha convertido en una enfermedad crónica controlada y los casos de SIDA son esporádicos y bien tratados, son los inmigrantes los que elevan la incidencia (157). La edad media en este grupo fue 32,8 años, un 17,2% menor que la media global del estudio, debido probablemente a que el 73,7% de los menores de 5 años con TB eran hijos de inmigrantes, incluidos en este grupo. Un tercio de ellos fueron diagnosticados en su primer año de estancia en nuestro país, dato importante a la hora de considerarla importada. En el último año de estudio, además, un tercio de los enfermos extranjeros con TB provenían del sudeste asiático y un cuarto de países de Europa del Este, zonas de alta prevalencia de MDR-TB (19), por lo que hay que estar atentos y mejorar las medidas de control de transmisión y diagnóstico precoz ante la posibilidad de aumento de cepas resistentes.

### 1.3 Manifestaciones clínicas en global y en grupos de riesgo

En cuanto a la sintomatología, 98 (50,5%) referían pérdida de peso, 127 (65,4%) describían distermia de predominio vespertino, sudoración nocturna o febrícula, puntualizando solamente 19 de ellos temperatura objetivada de más de 38,5°C. En 31 ocasiones se relataba hemoptisis y en 3 hematoquecia. La triada de fiebre, sudoración y pérdida de peso, considerada típica en la TB, se presentó, por lo tanto, en porcentajes similares a los descritos en la literatura (28).

En 122 (62,9%) enfermos la forma de presentación clínica fue pulmonar y en 72 (37,1%) extrapulmonar, en concreto, 14 TB pleurales, 15 ganglionares, 6 musculoesqueléticas, 5 del, 5 intestinales, 2 genitourinarias (una de ellas por instilación de BCG), 1 pericarditis, 22 formas diseminadas y 2 exclusivamente cutáneas post-inoculación de la vacuna BCG. La distribución de formas de presentación por año se resume en la Figura IV.15 y la Tabla IV.8.

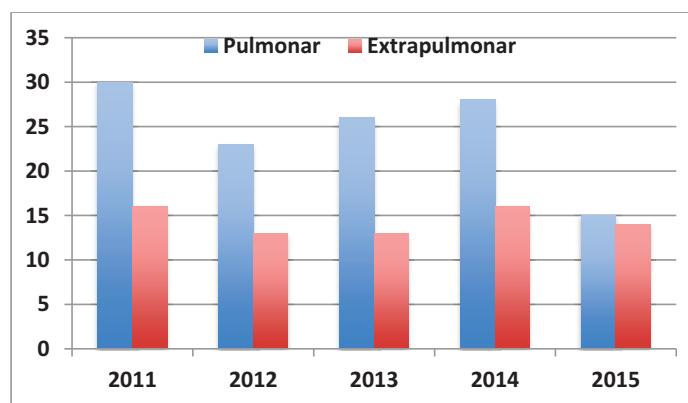


Figura IV.15: Presentación clínica de tuberculosis. Número de casos por año.

**Tabla IV.8:** Número y tipo de formas extrapulmonares por año.

	2011	2012	2013	2014	2015	Total
	n					n (%)
Pleural	5	0	1	6	2	14 (19,4)
Ganglionar	3	2	3	3	4	15 (20,8)
Musculoesquelética	2	1	1	0	2	6 (8,3)
Meníngea	0	0	1	2	2	5 (6,9)
Abdominal	0	1	1	0	3	5 (6,9)
Genitourinaria	0	0	1	0	0	1 (1,4)
Pericarditis	0	0	1	0	0	1 (1,4)
Diseminada	6	8	2	5	1	22 (30,6)
Becegeitis	0	1	2	0	0	3 (4,2)

La forma de presentación clínica principal fue la pulmonar. A pesar de ello, se observó un descenso de los casos de TBP con mantenimiento del número de formas extrapulmonares, correspondiendo las primeras al 65,22% de las formas de presentación clínica en 2011 y al 51,72% en 2015, diferencia, sin embargo, no estadísticamente significativa ( $p=0,2454$ ). Habrá que comprobar este descenso en años venideros.

La existencia de enfermedad de base se asoció de forma significativa con la forma TBEP ( $p=0,004$ ). Al analizar las enfermedades de base más frecuentes por separado, la forma de TBEP se asoció con el grupo de coinfectados con el VIH ( $p=0,007$ ), siendo ésta su forma clínica predominante (Figura IV.16), al igual que se ha descrito en la literatura, donde las formas extrapulmonares, en especial las diseminadas, se han asociado en mayor porcentaje a pacientes inmunodeprimidos (44,45)

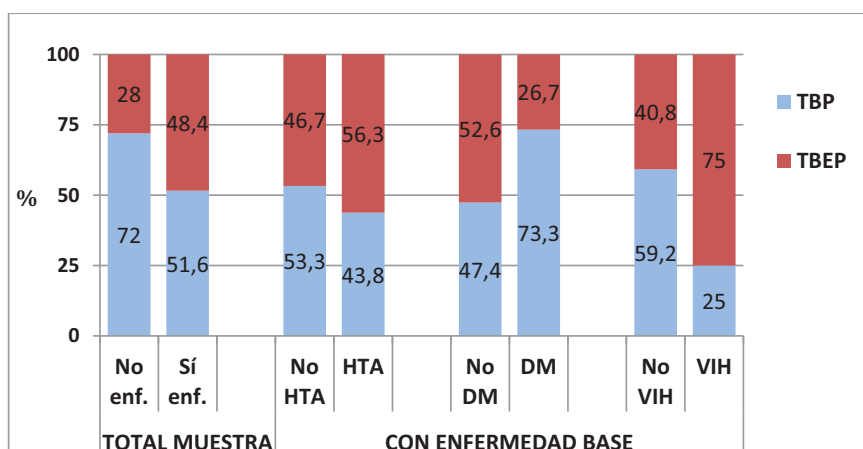


Figura IV.16: Forma de presentación clínica de TB según enfermedades de base.

Ser inmigrante no fue un factor estadísticamente significativo ( $p=0,538$ ) para desarrollar TBEP. La forma ganglionar, la más frecuente de las TBEP según la literatura en enfermos con TB en EEUU (33,34), fue una de las predominantes pero no la mayoritaria en este estudio, y se presentó a partes iguales en enfermos nacionales y en procedentes de la región Índica.

Tabla IV.9: Tabla de contingencia país de procedencia-forma de presentación clínica.

	Inmigrante		Nacional	
	N	%	N	%
TBP	60	60,6%	61	64,9%
TBEP	39	39,4%	33	35,1%

Considerando la utilidad de las pruebas complementarias en el diagnóstico de la enfermedad, en 95 casos (49%) hubo hallazgos radiográficos que obligaban a descartar TB como una posible causa, 24 de ellos tras la realización de una tomografía

computerizada (TC), por lo que una prueba de imagen normal no descartaría TB. De los 60 casos en que se dispone de un resultado de anatomía patológica, en 46 (76,7%) mencionaban la presencia de granulomas, en 7 sólo reacción linfocitaria y en los otros 7 no hubo hallazgos sugerentes de infección micobacteriana, por lo que la existencia de granulomas se puede considerar frecuente pero no esencial en las biopsias de lesiones por TB.

## 2. Resultados microbiológicos

Hubo un total de 552 muestras positivas (Tabla IV.10) durante los 5 años de estudio, lo que supuso una media de 2,85 muestras por enfermo, siendo la mayoría de ellas de origen pulmonar.

**Tabla IV.10:** Distribución de las muestras positivas según origen y año de aislamiento.

	2011	2012	2013	2014	2015	Total
	n					
<b>Pulmonares</b>	<b>109</b>	<b>68</b>	<b>89</b>	<b>87</b>	<b>104</b>	<b>457</b>
Esputo	91	51	73	66	95	376
BAS	4	4	1	4	1	14
LBA	10	11	8	11	3	43
Biopsia pulmonar	0	0	4	2	1	7
Jugo gástrico	4	2	3	2	4	15
Frotis faríngeo	0	0	0	2	0	2
<b>Extrapulmonares</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>95</b>
Adenopatía mediastínica	0	1	0	1	2	4
Líquido pleural	3	0	1	1	1	6
Biopsia pleural	2	0	1	4	2	9
Adenopatía cervical	2	2	2	3	2	11
Adenopatía supraclavicular	2	0	1	0	0	3
LCR	0	1	1	3	1	6
Biopsia intracerebral	0	0	0	1	2	3
Masa paravertebral	4	1	1	1	1	8
Sangre	1	2	0	2	2	7
Orina	0	2	1	0	0	3
Heces	0	1	1	4	2	8
PPB	2	3	5	2	2	14
Biopsia hepática	1	1	0	0	0	2
Biopsia peritoneal	0	1	0	0	0	1
Líquido ascítico	0	1	0	0	0	1
Biopsia esplénica	0	1	0	0	0	1
Adenopatía inguinal	0	1	0	0	0	1
Biopsia intestinal	0	0	3	1	0	4
Líquido pericárdico	0	0	2	0	0	2
Escrotal	0	0	1	0	0	1

BAS: broncoaspirado; LBA: lavado broncoalveolar; LCR: líquido cefalorraquídeo; PPB: piel y partes blandas.

La tinción fue positiva en 247 (44,7%) muestras clínicas. En la Tabla IV.11 se resume el resultado de la tinción y los tiempos de crecimiento en medio de cultivo líquido (MGIT) y sólido (LJ) para la mayoría de las muestras.

**Tabla IV.11:** Tinción y días de crecimiento según medio de cultivo por tipo de muestra.

Muestra	N	Tinción +		Rango <sup>o</sup>	Media <sup>o</sup>
Esputo	376	202 (53,7 %)	LJ	7-98	21
			MGIT	5-54	15
LBA	43	11 (25,6 %)	LJ	7-43	22
			MGIT	4-30	13
BAS	14	9 (64,3 %)	LJ	12-38	21
			MGIT	4-26	12
Jugo gástrico	15	1 (6,7 %)	LJ	19-26	22
			MGIT	11-52	19
Biopsia/ PAAF	40	8 (20 %)	LJ	14-73	30
			MGIT	6-42	17
PPB	14	6 (42,9 %)	LJ	10-100	28
			MGIT	5-25	13

**N:** número total; **LBA:** lavado broncoalveolar; **BAS:** broncoaspirado; **PAAF:** punción aspiración con aguja fina; **PPB:** piel y partes blandas; <sup>o</sup>medición en días de crecimiento

La tinción fue, por lo tanto, rentable aunque no concluyente, diagnosticándose con ella la mitad de los casos en el momento o en los primeros días del ingreso del enfermo, siendo el esputo y el BAS las muestras con mayor porcentaje de tinciones positivas y el jugo gástrico la que menor rendimiento diagnóstico tuvo con la tinción, al igual que se describe en la literatura (158,159).

En cuanto al tiempo de crecimiento en medio de cultivo sólido de LJ, el rango fue de 7 a 100 días con una media de 21,4 días (IC 95: 19,86-22,93), teniendo en cuenta que se desecharon los cultivos no crecidos a partir del día 100 de incubación. En 18 ocasiones el crecimiento fue en más de 45 días (11 esputos, 1 biopsia cerebral, 1 líquido pleural, 1 biopsia esplénica, 1 cutánea, 1 heces, 1 orina, 1 frotis faríngeo). En 12



### *Resultados y discusión*

casos se obtuvo crecimiento en este medio y no en el medio líquido de MGIT (4 esputos, 4 LBA, 1 orina, 1 líquido pleural, 1 PAAF, 1 exudado hombro) siendo el LBA una de las muestras con mayor discordancia, dato que habrá que analizar en mayor profundidad, para ver si fue debido a algún factor de manipulación en el laboratorio o a algún componente del medio que pueda interferir en el crecimiento.

Con respecto al tiempo de crecimiento en medio líquido de MGIT, el rango fue de 5 a 54 días con una media de 14,87 días (IC 95:14,00-15,73) siendo positivos un único esputo y un jugo gástrico más allá del día 45 de incubación en BD BACTEC™ MGIT™ 960. En 38 de estos casos no hubo crecimiento en el medio sólido de LJ tras 100 días de incubación, la mayoría de ellos muestras de esputo, y en otros 5 casos el método de detección automática BD BACTEC™ MGIT™ 960 dio el cultivo líquido como negativo pero se hizo subcultivo al observar macroscópicamente posible crecimiento y se recuperó la micobacteria.

El tiempo de crecimiento de las muestras de esputo en las que se dispone de esta información, se resume en la Figura IV.17. Se pudo observar un pico máximo de crecimiento en medio líquido a los 11 días de incubación (media 15 días) y en medio sólido a los 20 días (media 21 días), siendo muy pocos los cultivos con crecimiento más allá del día 45 de incubación. El medio líquido de MGIT permitió detectar un 14,4% más de crecimientos, aunque hubo casos positivos por LJ con ausencia de crecimiento en medio MGIT.

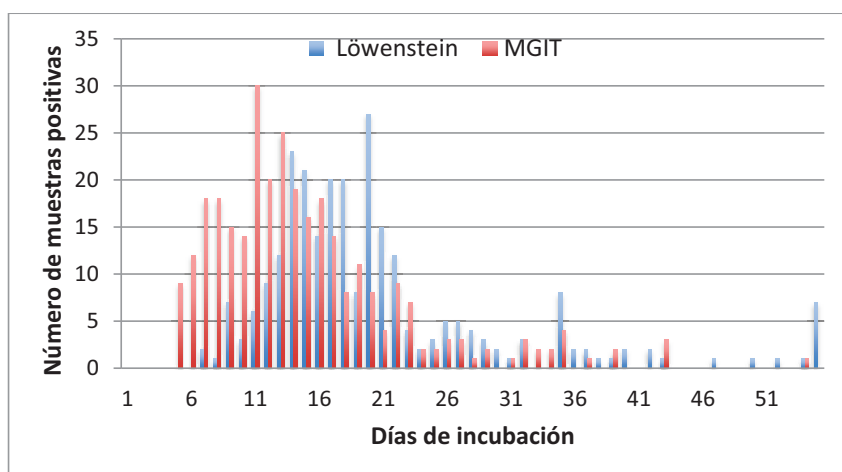


Figura IV.17: Tiempos de crecimiento según medio de cultivo para muestras de esputo.

De los 194 enfermos estudiados, el diagnóstico microbiológico inicial fue por observación de BAAR en la tinción de muestras clínicas en 98 casos (50,5%), por detección de ácidos nucleicos de MTBC en 24 y por crecimiento en cultivo en los restantes. Las técnicas moleculares aportaron, por lo tanto, un 12,4% más de diagnósticos iniciales que la tinción, teniendo en cuenta sólo los casos en los que la tinción fue negativa y la PCR positiva, a pesar de que esta prueba no se realizó a todas las muestras, sino sólo a aquellas en que el clínico encargado del enfermo lo solicitó o hubo alguna duda de BAAR tras la observación de la tinción. Para determinar este porcentaje con mayor precisión habría que realizar un estudio prospectivo procesando la PCR a todas las muestras en paralelo al cultivo.

En cuanto al estudio de sensibilidad a los fármacos de primera línea, 34 (17,5%) enfermos tenían cepas resistentes: 22 monorresistentes (9 a INH, 3 a RIF, 5 a STR y 5 a PZA), 8 polirresistentes y 4 MDR-TB, una de ellas pre-XDR. En total 20 (10,3 %)

enfermos tenían cepas resistentes a INH (dos de ellos con becegetis), 7 a RIF, 13 a STR, 3 a EMB y 10 a PZA incluyendo las 3 cepas de *M. bovis* BCG (Tabla IV.13).

**Tabla IV.12:** Características de los enfermos con cepas resistentes, sin incluir las becegetis.

Caso	Edad/ sexo	País de origen	Enfermedad de base	Forma clínica	IRSEP	Evolución
8	28/V	ROU	Psicosocial	TBP	RSSSS	Buena
18	86/V	ESP	Silicosis	TBEP	RSSS-	Buena
38	67/M	ESP	Asma (corticoides)	TBEP	RSSSS	Buena
40	66/M	ROU	LMA	TBP	RSSSS	Éxito
62	46/V	MAR	No	TBP	RSSSS	Buena
66	74/V	ESP	Linfocitopenia CD4	TBEP	RSSSS	Buena
67	38/M	GNQ	No	TBP	RSSSS	Buena
129	62/V	ESP	HTA, DM	TBEP	RSSSS	Buena
151	29/M	IND	No (embarazo)	TBEP	RSSSS	Buena
10	45/M	ESP	VIH	TBEP	SRSS-	Buena
126	46/M	ESP	No	TBP	SRSSS	Buena
161	41/V	ROU	VIH,VHB	TBEP	SRSSS	Recidiva
4	52/V	COL	No	TBP	SSRSS	Buena
95	28/M	ROU	No	TBP	SSRSS	Buena
98	49/M	BOL	DM	TBP	SSRSS	Buena
105	55/V	ESP	Psicosocial	TBP	SSRS-	Buena
191	37/V	PAK	VHB	TBEP	SSRSS	Buena
12	21/V	BOL	No	TBP	SSSSR	Buena
101	35/V	ESP	No	TBP	SSSSR	Buena
111	29/V	BOL	No	TBP	SSSSR	Buena
186	31/M	MAR	VIH	TBEP	SSSSR	Buena
11	43/V	ROU	No	TBP	SSSRR	Recidiva
24	22/V	ROU	No	TBP	RSRSS	Buena
29	45/M	NGA	VIH	TBEP	RSRSS	Buena
55	25/V	MAR	No	TBP	RSRSS	Buena
59	52/V	LTU	No	TBP	RSRSS	Éxito
63	21/V	BOL	No	TBP	RSRRS	Buena
85	28/M	ESP	No	TBP	RRSSS	Buena
190	36/M	UKR	VIH, asplenia	TBP	RRRSS	Recidiva
31	37/V	PRK	No	TBP	RRRRR	Buena
44	74/V	ESP	Silicosis, DM	TBP	RRRSR	Éxito

V: varón; M: mujer; ROU: Rumania; ESP: España; MAR: Marruecos; GNQ: Guinea Ecuatorial; IND: India; COL: Colombia; BOL: Bolivia; PAK: Pakistán; NGA: Nigeria; LTU: Lituania; UKR: Ucrania; PRK: Corea del Norte; TBP: pulmonar; TBEP: extrapulmonar; IRSEP: isoniácida, rifampicina, estreptomycin, etambutol, pirazinamida (se muestra su sensibilidad (S) o resistencia (R) fenotípica o sensibilidad intermedia (I) por ese orden)

En global, hubo un 16% de resistencias en las cepas de MTBC aisladas en nuestra área excluyendo las becegeitis, dato algo inferior a la media reflejada en los Informes de TB de la CV para el DS La Fe en este mismo periodo, que fue 19,4%. Los casos de resistencia a INH sin resistencia a RIF supusieron un 7,2%, los resistentes a RIF sin resistencia a INH un 1,5% y los MDR-TB un 2,1%, mientras que en España para el año 2014 se estimó un porcentaje similar de MDR-TB pero porcentajes inferiores de resistencia a INH y RIF de forma individual, siendo del 5% y 0,2%, respectivamente (160). De las 7 cepas resistentes a RIF, prácticamente la mitad tenían también resistencia a INH, siendo este porcentaje mucho menor al estimado por otros autores (161), que consideran que la resistencia a RIF detectada por Xpert® MTB/RIF podría servir de marcador de MDR-TB, no siendo este supuesto aplicable por lo tanto en nuestra área, donde existe mayor número de monorresistencia a RIF.

A pesar de que la mayoría de las resistencias se presentaron en inmigrantes, no hubo asociación estadísticamente significativa entre las formas resistentes y la procedencia extranjera ( $p=0,279$ ; IC 95%:0,65-4,90) (Tabla IV.12).

**Tabla IV.13** Tabla de contingencia país de procedencia-sensibilidad de la cepa.

	Inmigrante		Nacional	
	N	%	N	%
<b>poliS</b>	78	78,8%	81	89%
<b>Resis</b>	21	21,2%	10	11%

Tampoco se encontró relación estadísticamente significativa de las formas resistentes con la edad ( $p=0,111$ ; IC95%:0,995-1,055), sexo ( $p=0,071$ ; IC95%:0,923-

6,36), coinfección con el VIH ( $p=0,43$ ; IC95%:0,405-6,217) ni con la forma TBEP ( $p=0,389$ ; IC95%:0,216-1,738).

Hubo dos casos de TB confirmados exclusivamente por técnicas de biología molecular, sin crecimiento de *M. tuberculosis* posterior, uno con forma de presentación meníngea y otra musculoesquelética. En los otros 103 enfermos en los que se empleó alguna técnica de biología molecular para el diagnóstico complementario, 84 (81,6%) tuvieron resultado positivo. De las 57 formas pulmonares a las que se les hizo PCR, 54 (94,7%) fueron positivas, mientras que de las 46 extrapulmonares, 30 (65,2%) fueron positivas. Las técnicas de biología molecular ayudaron de forma notable en el diagnóstico, siendo las formas pulmonares las más favorecidas por estos métodos, al igual que se describe en la literatura, donde se hace hincapié en que las formas de TBEP son más difíciles de diagnosticar por técnicas moleculares, aunque estudios recientes confirman la mejora en la sensibilidad de las nuevas técnicas ante las formas de TBEP (162). De nuevo, para determinar este porcentaje con mayor precisión, habría que realizar un estudio prospectivo procesando la PCR a todas las muestras en paralelo al cultivo.

En cuanto a la sensibilidad genotípica a INH y RIF detectada a partir de muestra directa, se realizó en 73 ocasiones. En 3 de estos casos hubo resistencia fenotípica a RIF y 6 cepas eran resistentes a INH. Los métodos moleculares habían detectado precozmente la resistencia a RIF en las 3 ocasiones, mientras que para la INH, sólo un tercio de las resistencias pudieron ser informadas previamente al cultivo. En dos ocasiones fue debido a que se empleó la técnica Xpert® MTB/RIF, que sólo detecta

resistencias a RIF, por lo que el porcentaje real de fallo de detección precoz a INH fue del 50%.

Se analizó la concordancia entre el análisis molecular de resistencias a INH y RIF realizado con las técnicas disponibles en el laboratorio y la sensibilidad fenotípica (DST), siendo el índice kappa global 0,73 (IC95%:0,38-0,999), es decir, concordancia entre ambas técnicas moderada. Esto demuestra que las técnicas moleculares comercializadas disponibles actualmente son adecuadas para una primera orientación y pueden aportar información importante en el caso de detectar una mutación asociada a resistencia, pero que el estudio definitivo de sensibilidad por cultivo es necesario y será el que determine el resultado final, especialmente en el caso de INH.

### **3. Resultados de secuenciación completa del genoma**

Se secuenciaron un total de 64 cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a 62 enfermos tanto del DS La Fe como del H Moliner. De uno de ellos no disponemos de información de edad, sexo ni país de origen, por haber facilitado un número de SIP falso. De otro paciente se secuenciaron tres cepas con distinto patrón de sensibilidad. Las cepas secuenciadas fueron las del año 2014 y principios de 2015, y se seleccionaron aleatoriamente algunas cepas de entre las resistentes de 2013, para poder ampliar el estudio de las mutaciones asociadas a resistencia.

Las cepas correspondieron a 40 (65,6 %) varones y 21 mujeres, con una edad media de 43 años (rango 3-90).

Según región de origen, se agruparon en procedentes de Europa (34 de España y 1 de Francia), de Europa del Este (2 de Rusia, 6 de Rumania, 1 de Bulgaria, 1 de Ucrania), de África del Norte (1 de Argelia y 1 de Marruecos), de África Subsahariana occidental (3 de Guinea Ecuatorial, 1 de Costa de Marfil), de Sudamérica (1 de Argentina, 1 de Ecuador y 2 de Bolivia), del sudeste asiático (2 de China) o de región Índica (2 de Pakistán y 2 de la India) (Figura IV.18). Los datos demográficos de los enfermos de esta parte del estudio fueron, por lo tanto, similares a los del trabajo global.

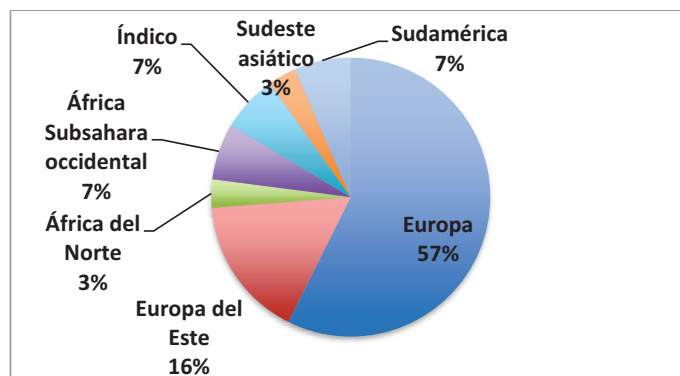


Figura IV.18: Distribución de enfermos por región de procedencia.

Tras la secuenciación e interpretación con el programa bioinformático *PhyResSE*, se obtuvo la siguiente relación de linajes: 1 EastAfrican Indian (EAI), 5 L2/Beijing, 2 DelhiCAS, 51 L4/EuroAmerican (15 L4.1.2/Haarlem, 16 L4.3/LAM y en los 20 restantes no se pudo determinar el sublinaje), 1 L4.6.2/Cameroon, 1 L4.1.3/Ghana y 1 S-type (Figura IV.19).

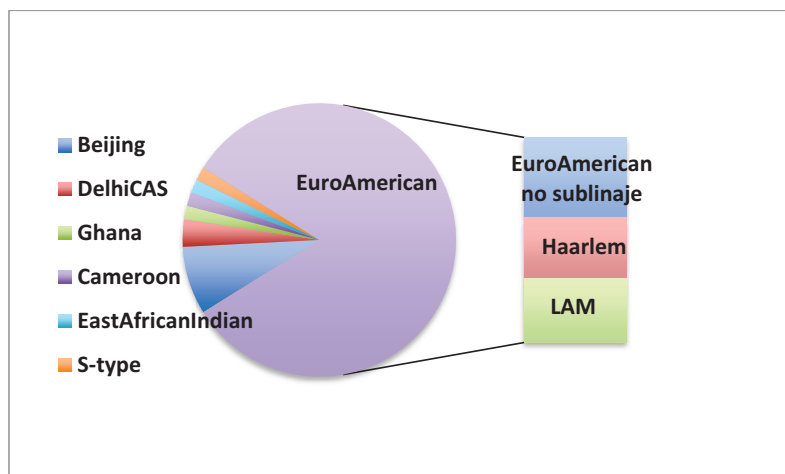


Figura IV.19: Distribución de linajes de las cepas secuenciadas según *PhyResSE*.



## Resultados y discusión

Tras el análisis de linajes empleando una base de datos *in-house* se obtuvo la siguiente clasificación de las secuencias: 1 L1 que correspondía al EAI, 5 L2/Beijing, 2 L3/DelhiCAS, 1 L4.1/tipo X, 15 L4.1.2/Haarlem, 1 L4.1.3/Ghana, 18 L4.10/PGG3, 16 L4.3/LAM, 1 L4.4/Vietnam, 1 L4.5/Iran y 1 L4.6.2/Cameroon.

Al analizar los datos de secuenciación, se observa que la herramienta bioinformática *casera* permitió profundizar en los subtipos incluidos en el linaje 4, aportando mayor información que la herramienta *PhyResSE*, que no identificó el sublinaje en el 39,2% (20/51) de las cepas EuroAmerican incluidas en el linaje 4.

En los enfermos españoles, las cepas aisladas se distribuyeron de la siguiente forma: 10 L4.1.2/Haarlem, 12 L4.10/PGG3, 11 L4.3/LAM y 1 L2/Beijing. La distribución en extranjeros se muestra en la Figura IV.20.

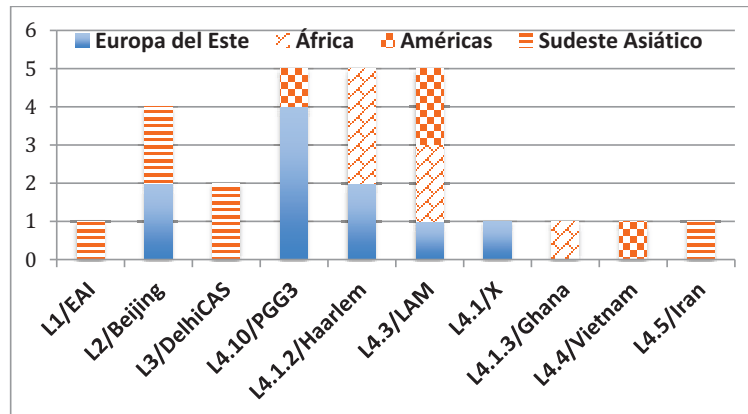


Figura IV.20: Distribución de linajes en cepas aisladas en enfermos extranjeros.

El linaje predominante fue el L4, considerado el más ampliamente distribuido en el mundo (104). El único caso español con linaje distinto de éste, tenía pareja rusa,

dato que podría explicar la infección por un linaje no autóctono. En los enfermos de origen extranjero, la distribución de los linajes fue más variada. En los procedentes de África y América, las cepas pertenecían al L4, que también es el más común en esas regiones; sin embargo, en los enfermos procedentes del sudeste asiático, los linajes predominantes fueron distintos al L4, lo que sugiere que la infección fue en su país de origen, donde los linajes no L4 se presentan con mayor frecuencia (163,164). El análisis estadístico, no obstante, concluyó que, para los linajes con un valor mayor a 2, no había datos suficientes para sacar conclusiones respecto a la relación con la región de origen del enfermo; sin embargo, cualitativamente todos los linajes y sub-linajes concuerdan con lo publicado. Así pues, L2/Beijing es común en el este de Asia pero también en Europa del Este y el linaje 1/EAI es muy común en la India y el sudeste asiático. No hubo diferencia entre el número de cepas pertenecientes a sublinajes *generalistas* del L4 (L4.1.2/Haarlem, L4.3/LAM y L4.10/PGG3), hallándose una sola cepa de los sublinajes *especialistas* L4.5 y L4.6.2/Cameroon.

En cuanto a la forma de presentación clínica, de los 64 casos en los que se secuenció la cepa, 49 (79%) tenían manifestaciones pulmonares, 3 pleurales, 6 diseminadas (con afectación de dos o más órganos), 4 exclusivamente ganglionares y 2 meníngeas.

En el análisis comparativo del linaje frente a la forma clínica de presentación, hubo que realizar una regresión logística, al ser sólo dos categorías, pulmonar y extrapulmonar, las comparadas, además de una corrección de Firth para evitar los

problemas de separación perfecta ocasionados por el linaje Beijing, en el que todas las formas de presentación fueron pulmonares (Figura IV.21).

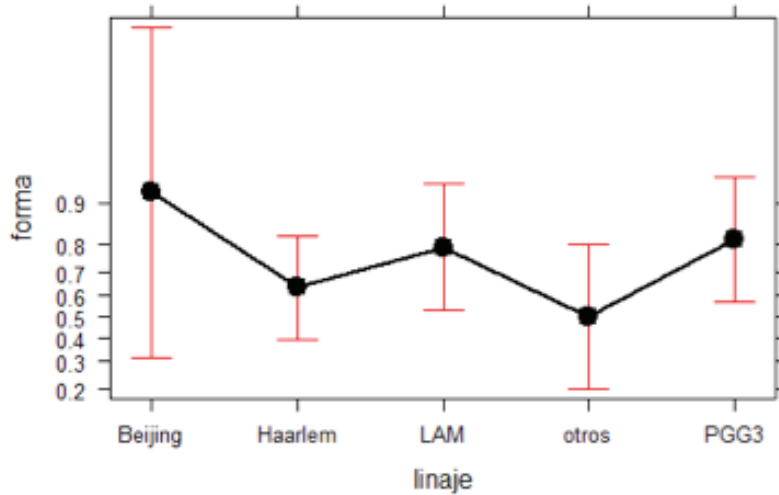


Figura IV.21: Comparación del linaje con forma de presentación clínica.

Al analizar la asociación entre el linaje y la forma de presentación, la conclusión fue que no hay prueba de asociación estadísticamente significativa entre la forma de presentación y el linaje, al igual que se muestra en otro estudio (165), aunque sí se observa una tendencia del linaje Haarlem a la forma extrapulmonar ( $p=0,09$ ; OR: 4,2; IC: 0,9-37,8), al igual que el resto de linajes agrupados en “otros”, dato que coincidiría con otro estudio publicado en el que las formas de TBEP estaban significativamente asociadas a los linajes CAS y BOV (166). Asimismo, se observó una separación perfecta en el linaje Beijing, en el que sólo se daba una de las dos condiciones (todas eran formas pulmonares), dato distinto al observado por otros autores, que encontraron asociación significativa entre el linaje Beijing/W en aislados del sudeste asiático y la forma TBEP (164). El escaso número de cepas Beijing de nuestro estudio, hizo que su

asociación con la forma pulmonar no pudiera ser demostrada. Habría que considerar, además, el distinto origen de nuestras cepas Beijing, que son de pacientes que provienen de Europa del Este.

El estudio fenotípico de sensibilidad de las cepas a los fármacos de primera línea realizado por cultivo en medio líquido de MGIT determinó que 46 cepas eran sensibles a todos ellos (poliS), 9 eran monorresistentes (cuatro a INH, dos a RIF, dos a STR y una a PZA), 1 polirresistente (a INH, STR y EMB) y 8 multirresistentes (MDR) con distintos patrones asociados a la resistencia a INH y RIF. De las 18 cepas que presentaban alguna resistencia, 4 habían sido aisladas de muestras de enfermos de origen español (2 eran MDR, 1 resistente a INH y otra resistente a RIF) y 14 de extranjeros.

Con respecto al empleo de la secuenciación para la detección de mutaciones relacionadas con resistencia a los fármacos antituberculosos (WGS-DR), tras la comparación de las secuencias con la cepa patrón H37Rv, se detectó la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a INH en 12 cepas, a RIF en 10, a STR en 15, a EMB en 6 y a PZA en 1, existiendo en ocasiones más de una mutación para el mismo fármaco antituberculoso en una misma cepa (Tabla IV.14).

**Tabla IV.14:** Número de mutaciones detectadas con el programa *PhyResSE*.

ID Gen/ nombre/antiTB	Número de casos con mutaciones y cambios que generan
Rv0006/ <i>gyrA</i> /FQ	2 (Asp94Gly)
Rv0667/ <i>rpoB</i> /RIF	10 (8 Ser450Leu; 1 His445Asp; 1 Leu452Pro)
Rv0682/ <i>rpsL</i> /STR	3 (2 Lys43Arg; 1 Lys88Arg)
MTB000019/ <i>rrs</i> /AGis	12
Rv1483/ <i>fabG1</i> /INH	7 (-15nt/1673425)
Rv1484/ <i>inhA</i> /INH	1 (Ser94Ala)
Rv1908c/ <i>katG</i> /INH	7 (Ser315Thr)
Rv2043c/ <i>pncA</i> /PZA	1 (Ala146Val)
Rv2416c/ <i>eis</i> /KAN	1
Rv3794/ <i>embA</i> /EMB	2
Rv3795/ <i>embB</i> /EMB	5 (Met306Val, Met306Ile, Gly406Ser, Tyr334His, Tyr319Ser)
Rv3854c/ <i>ethA</i> /ETH	1 (Ile338Ser)

**ID:** identificación; **antiTB:** fármaco antituberculoso; **INH:** isoniácida; **FQ:** fluorquinolonas; **ETH:** etionamida; **RIF:** rifampicina; **STR:** estreptomina; **AGis:** aminoglucósidos inyectables (incluye STR,AK,KAN,CPR); **PZA:** piracinamida; **KAN:** kanamicina; **EMB:** etambutol

En la Tabla IV.15 se resumen los detalles de procedencia y linaje de las cepas con resistencia fenotípica a los fármacos antituberculosos de primera línea y las discordancias entre las sensibilidades fenotípicas y las WGS-DR que han sido relacionadas en la bibliografía con resistencia fenotípica. Se incluye una columna con la CMI de INH en aquellas cepas consideradas resistentes por el método BD BACTEC™ MGIT™ 960, que tiene un punto de corte único en 0,10 µg/mL.

**Tabla IV.15:** Lista de las cepas secuenciadas que presentaban resistencia fenotípica a alguno de los fármacos antituberculosos de primera línea.

País de origen	Linaje	WGS-DR	IRSEP	CMI INH
GNQ	L4.1.2	<i>fabG1</i>	RSSSS	0,5 µg/mL
RUS	L2	<i>katG,rpsL,embB</i>	RSRRS	>4 µg/mL
BOL	L4.3	none	SSSSR <sup>o</sup>	
CHN	L2	<i>katG,rpoB,rrs,eis,embA,embB</i>	RRRRR	>4 µg/mL
BOL	L4.3	none	SSRSS	
ESP	L4.10	<i>fabG1,rpoB</i>	RRSSS	0,12 µg/mL
ROU	L4.1.2	<i>rpoB</i>	SRSSS	
ROU	L4.1.2	<i>fabG1,inhA,rpoB</i>	RRSSS	1 µg/mL
ROU	L4.10	<i>fabG1,katG,rpoB,embB,pncA</i>	RRRRR	>4 µg/mL
IND	L3	<i>katG</i>	RSSSS	4 µg/mL
ESP	L4.10	<i>rpoB</i>	SRSSS	
ESP	L4.10	<i>katG(Leu48Pro)*</i>	RSSSS	
GNQ	L4.1.2	<i>fabG1,rpoB,embB</i>	RRSRS	2 µg/mL
RUS	L4.3	<i>fabG1,katG,rpoB,rrs,embB</i>	RRRRR	>4 µg/mL
ESP	L2	<i>katG,rpoB,rpsL,rpsA</i>	RRRSS	
PAK	L4.5	none	SSRSS	
ROU	L4.10	<i>fabG1</i>	RSSSS	0,25 µg/mL
UKR	L2	<i>katG,rpoB,rpsL,rrs,embA</i>	RRRSS	1 µg/mL

**WGS-DR:** genes con mutaciones asociados a resistencia; **IRSEP:** isoniácida, rifampicina, estreptomycin, etambutol, pirazinamida (se muestra su sensibilidad (**S**) o resistencia (**R**) fenotípica por ese orden); **GNQ:** Guinea Ecuatorial; **RUS:** Rusia; **BOL:** Bolivia; **CHN:** China; **ESP:** España; **ROU:** Rumania; **IND:** India; **PAK:** Pakistán; **UKR:** Ucrania; **CMI INH:** concentración mínima inhibitoria de isoniácida.

\* esta mutación no ha sido asociada a resistencia fenotípica

<sup>o</sup> se resaltan en negrita y subrayadas las discordancias entre WGS-DR e IRSEP

En el caso de las mutaciones que conferían resistencia a INH, 8 estaban localizadas en el gen *inhA*, considerando las mutaciones en la región promotora de *inhA* (*fabG1-inhA*, -15) como parte de esta región y otras 7 en el gen *katG* (codón 315). Las mutaciones en el primer gen se han asociado a CMIs bajas, mientras que las de *katG* se han visto relacionadas con CMIs altas que no permitirían emplear INH de alta carga en el tratamiento (167). Esta característica también se aprecia en las cepas analizadas en este trabajo. Una de las mutaciones del gen *inhA* no había sido detectada por el programa *PhyResSE*, por lo que no está recogida en la Tabla IV.14. Se

trata de una mutación silente en la región Rv1483 (región promotora *fabG1*, concretamente en el operón *mabA-inhA*, posición 1674048 G/A) en el codón 203, que ha sido asociada por Ando y cols. a sobreexpresión de *InhA*, dando resistencia de bajo nivel a INH (168). Por otro lado, una de las cepas con DST resistente a INH no se consideró resistente por WGS-DR al no presentar una mutación conocida. Al revisar la secuencia, se observó una mutación en el codón 48 del gen *katG*, que habrá que analizar en profundidad para demostrar su asociación. Además, la SCG permitió esclarecer el origen de la otra mutación que no había sido detectada por métodos moleculares. Se trata de la mutación en el codón 94 del gen *inhA*, que no está incluida en las técnicas moleculares comerciales Genotype MTBDRplus ni Seegene MTB-MDR-XDR. Esta mutación ha sido detectada en el año 2016 en cepas de nuevos pacientes en nuestra área, por lo que hay que considerar que pueda aparecer en un futuro próximo y siga sin poder detectarse de forma precoz por los métodos moleculares que empleamos actualmente.

Para la RIF, las 10 mutaciones detectadas estaban localizadas en el gen *rpoB*, la mayoría de ellas (80%) en el codón 450 ó 531 si seguimos la nomenclatura del *E.coli*. La mutación descrita por la herramienta bioinformática *PhyResSE* en el codón 450 del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* corresponde al codón 531 de *E.coli* y, como describen algunos autores (169), es importante tener en cuenta las distintas nomenclaturas a la hora de valorar las posiciones dentro de este gen, ya que se emplean de forma aleatoria en la literatura y también en los *kits* de PCR comerciales. En un artículo recientemente publicado, se aconseja llegar a un consenso para que se emplee la numeración del genoma de referencia de la especie interrogada en cada caso (170).

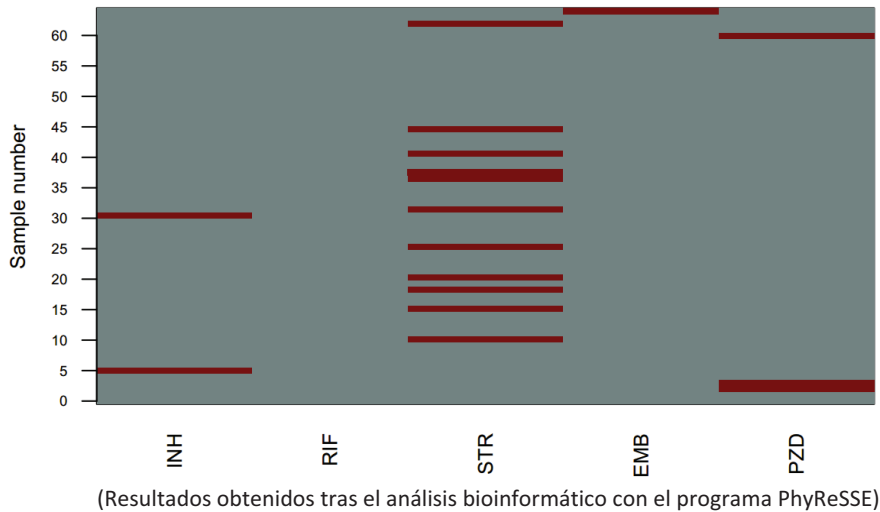
En el caso de STR se detectaron mutaciones en 15 cepas, todas menos 3 de ellas por cambio de citosina por timina en el gen MT000019. La mutación en el gen MT000019 asociada a resistencia a STR según la herramienta de análisis bioinformático *PhyResSE*, detectada en 12 cepas, fue cuestionada al no relacionarse con el hallazgo fenotípico en 9 casos y encontrarse presente otra mutación que podría estar relacionada con la resistencia a STR en otras tres cepas. Con este estudio se sugiere que esta mutación asociada a resistencia de baja confianza (*low-confidence resistance*) se trata de un marcador filogenético común en nuestra región, quedando por tanto excluidas y rectificadas dichas resistencias.

En cuanto a la PZA, la poca correlación puede deberse tanto a la dificultad en el estudio de resistencias fenotípicas debido al pH necesario para su crecimiento, como a lo que ya han sugerido otros autores, que es que deben existir mecanismos complementarios a las mutaciones en el gen *pncA* que intervienen en la resistencia a este fármaco (171).

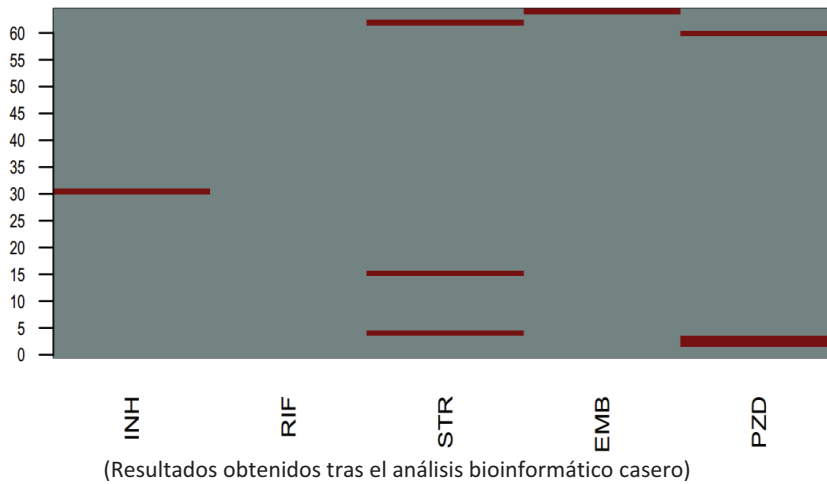
Para el estudio de la concordancia entre las mutaciones encontradas en genes asociados a resistencia por secuenciación completa del genoma (WGS-DR) con la DST, se realizó un primer análisis antes de considerar la mutación en *rrs* como marcador filogenético, con un valor de correlación kappa global moderado (0,469) (IC95%: 0,27-0,63). En este primer análisis, los valores de índice kappa por fármacos independientes fueron: para INH 0,95 (IC: 0,83-0,999); para RIF 0,999; para STR 0,43 (IC: 0,13-0,67); para EMB 0,90 (IC: 0,64-0,999); y para PZA 0,39 (IC: 0,01-0,999)(Figura IV.22a). Éste



último resultado se debe a que sólo hubo una cepa que fuera resistente a PZA tanto por DST como por WGS-DR.



(Resultados obtenidos tras el análisis bioinformático con el programa PhyReSSE)



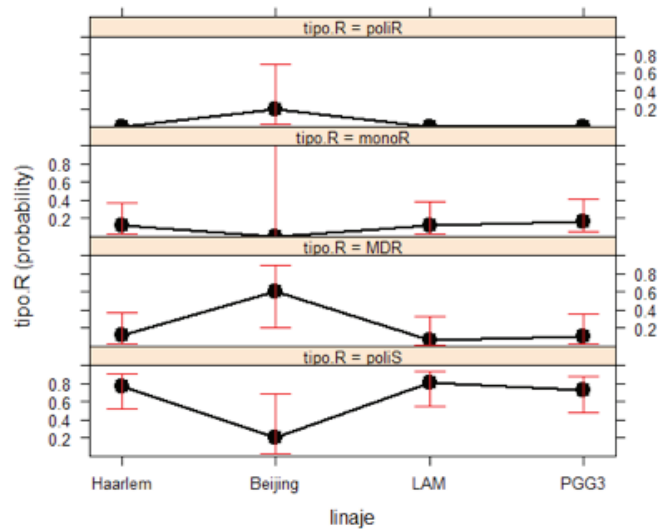
(Resultados obtenidos tras el análisis bioinformático casero)

**Figura IV.22:** Comparación entre la sensibilidad fenotípica y de secuenciación de cada cepa (marcadas en rojo las discordancias por antituberculoso)

Tras un segundo análisis estadístico en el que se excluyó la mutación *rrs* tras haberse considerado como marcador filogenético común en nuestra área, el índice de correlación kappa global fue sustancial (0,72) (IC95%:0,51-0,999), siendo por fármacos

independientes el mismo excepto en el caso de la STR, que pasó a ser de 0,75 (IC: 0,38-0,999) (Figura IV.22b).

Para el análisis de la asociación entre el linaje y la resistencia a antituberculosos de primera línea, empleando como patrón de referencia el fenotípico sensible (poliS), hubo que realizar una regresión multinomial, siendo la conclusión que no se encontraba relación estadísticamente significativa entre el linaje y las resistencias ( $p=0,11$ ). Sí se encontró, no obstante, una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,031$ ) del linaje Beijing con el patrón de resistencia MDR-TB, hallazgo mencionado anteriormente por otros autores (172) (Figura IV.23).



**Figura IV.23:** Comparación del linaje con el patrón de sensibilidad de las cepas.

La existencia de poblaciones heterogéneas intrapaciente también se pudo demostrar con la SCG. A continuación se muestran las variaciones en el porcentaje de

micobacterias resistentes halladas en las 3 cepas secuenciadas del mismo paciente, en las que el porcentaje de resistencias a INH y RIF aumentó con el tiempo (Figura IV.24).

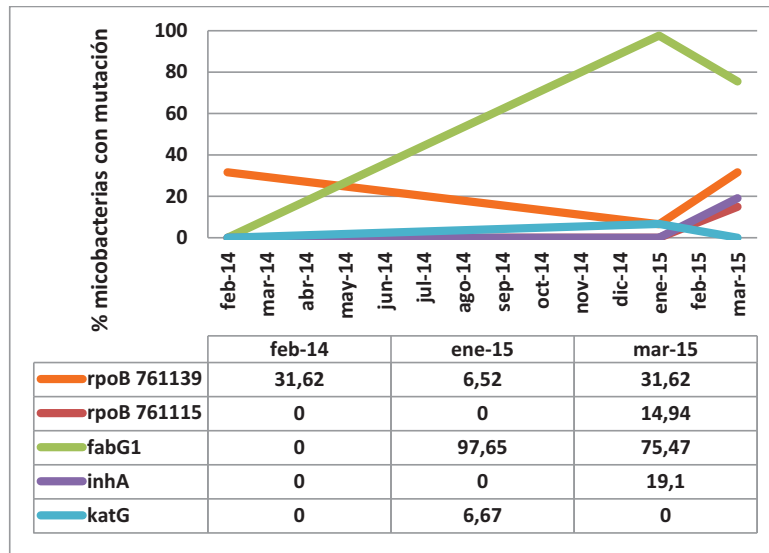
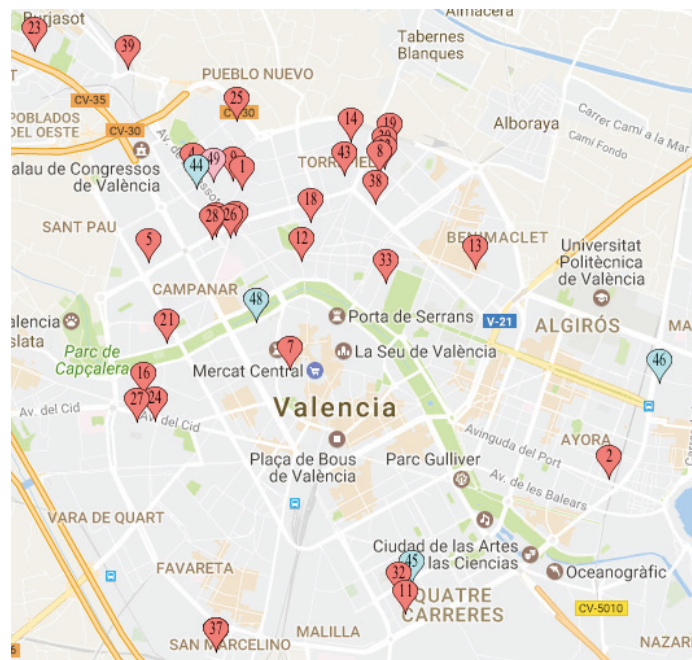


Figura IV.24: Evolución de mutaciones en muestras de un mismo paciente.

Otro de los usos de la SCG es el estudio epidemiológico de contactos (108). En este trabajo, además, entre las 64 cepas secuenciadas, se detectaron 4 *clusters*, considerando la existencia de relación entre las cepas cuando el número de SNPs de diferencia entre ellas era menor de 5 (muy probable) o de 10 (probable) y excluyendo las 3 cepas del mismo paciente, en las que el número de SNPs de diferencia fue 0 y 1. Uno de los *clusters* incluía dos hermanas que compartían vivienda, pero los otros tres estaban compuestos por personas no relacionadas entre sí según lo reflejado en su historia clínica. En estos casos habría que profundizar para hallar el momento del contacto que llevó al contagio. En la Figura IV.25 se puede observar que los linajes no L4 están intercalados entre los L4, por lo que, los casos que por estudio epidemiológico

de contactos se podrían haber considerado contagios por ser casos próximos tanto en el tiempo como en el espacio, en realidad no lo serían al tratarse de linajes distintos.



**Figura IV.25:** Residencia habitual de los enfermos cuyas cepas se han secuenciado, marcando en azul los linajes distintos al L4

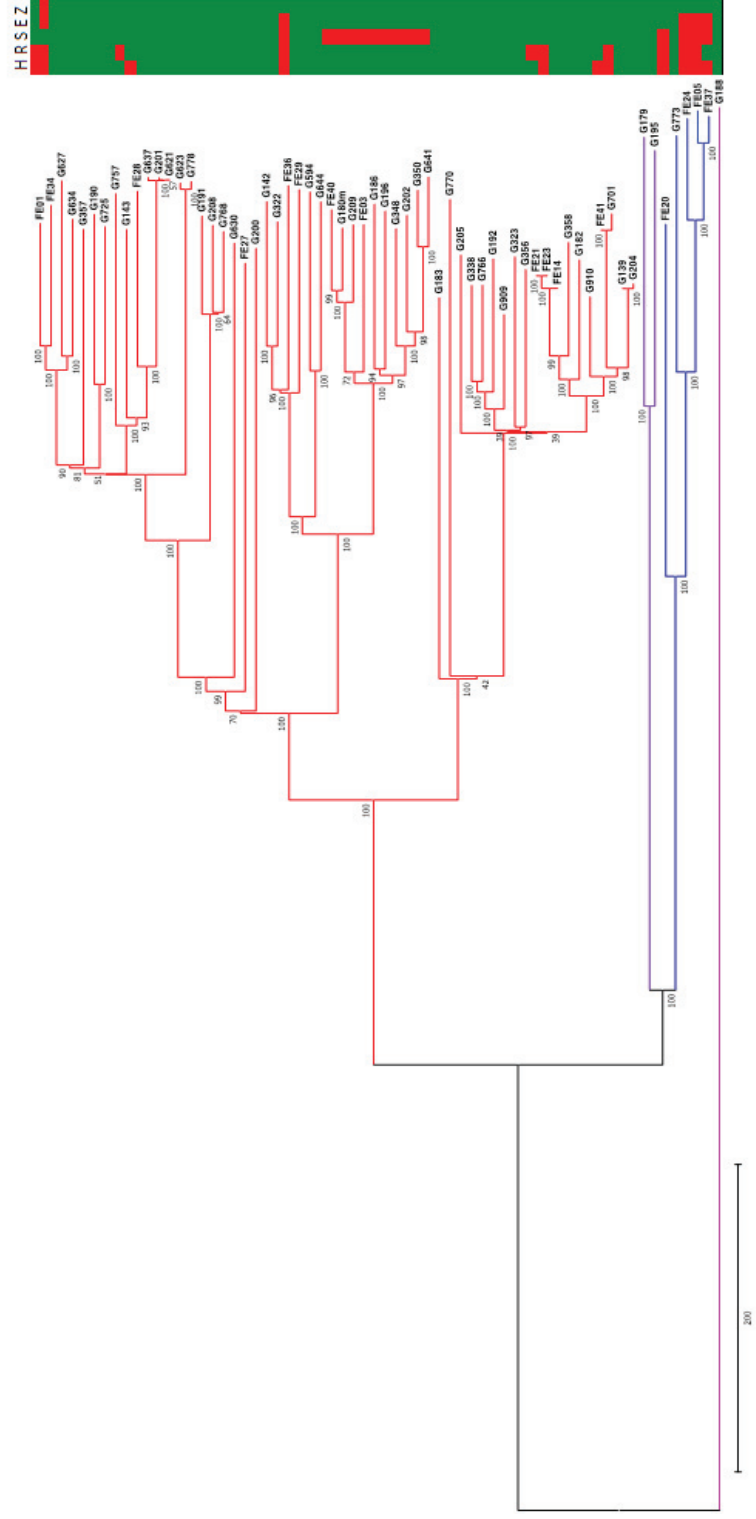
En la Figura IV.26 presentamos el árbol filogenético de las cepas secuenciadas (9994 SNPs), donde se resume por colores la agrupación de los distintos linajes encontrados y aparece asociada en la columna de la derecha el resultado de la WGS-DR, permitiendo ver la relación de las cepas con mutaciones similares.

El conocimiento de la epidemiología de los enfermos con TB y su patrón de resistencia es importante para seleccionar las técnicas de diagnóstico adecuadas en un Servicio de Microbiología. Las limitaciones que supone el manejo de los datos

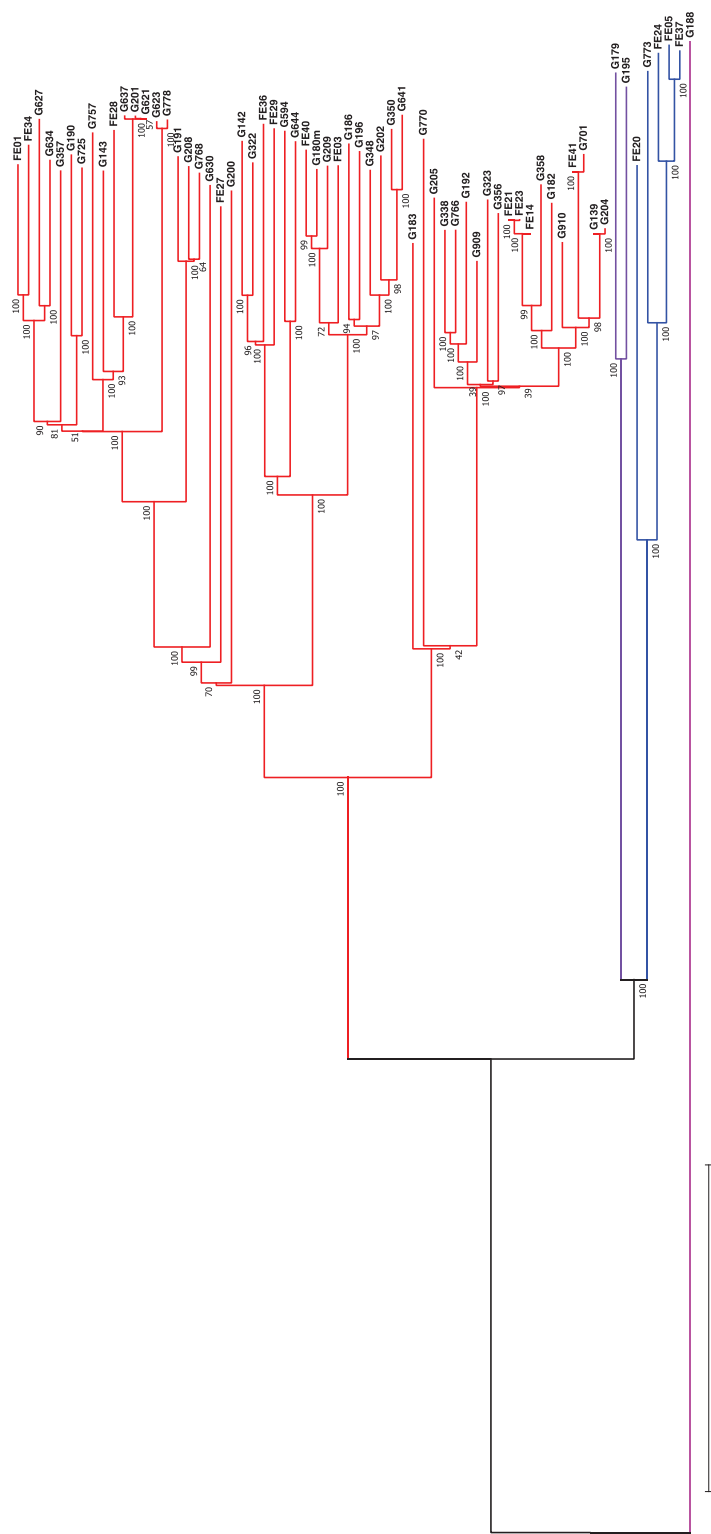
### *Resultados y discusión*

generados a partir de la SCG y su comparación con los clínicos y epidemiológicos, junto a la dificultad de implantar la genómica en los Sistemas Sanitarios de Salud, probablemente retrasarán la implantación de la herramienta de SCG en los Servicios de Microbiología de nuestro país. A pesar de ello, con este trabajo se confirma que la SCG es una buena herramienta para el estudio epidemiológico de la TB y resistencias a fármacos antituberculosos de primera línea, que ayuda a anticipar el perfil de resistencia y el tratamiento adecuado, facilitando así la interrupción de la cadena de contagio de esta enfermedad.

**Figura IV.26.** Árbol filogenético, estudio de sensibilidad (en verde sensible, en rojo resistente) según WGS y linaje (por colores de las ramas: L4 en rojo, L3 en morado, L2 en azul y L1 en rosa fucsia) de las cepas secuenciadas.\*



*Resultados y discusión*



\* La escala se muestra en número absoluto de cambios nucleotídicos. Los valores de soporte para cada uno de los clados están basados en 1.000 pseudo-réplicas del alineamiento original.





## **CONCLUSIONES**



## V CONCLUSIONES

1. En el periodo de estudio se diagnosticaron 194 episodios de TB en el HUP La Fe, lo que supone una tasa media de 9,7 casos/100.000 habitantes en el DS La Fe, tasa menor a la estimada en España y en la Comunidad Valenciana.
2. La mayoría de los pacientes con TB viven en la zona Torrefiel/Rascaña, en calles clasificadas como de “alta vulnerabilidad” por el Ayuntamiento de Valencia, y no recuerdan contacto previo con enfermos tuberculosos.
3. Existen incongruencias entre el número de casos diagnosticados y las resistencias a fármacos antituberculosos detectadas en el HUP La Fe y los datos oficiales de la Conselleria de Sanitat.
4. En nuestra serie, la presencia de las enfermedades de base o los factores de riesgo previamente descritos en la literatura no es determinante para el desarrollo de enfermedad tuberculosa.
5. La forma de presentación clínica más frecuente es la TB pulmonar. Esta forma de presentación ha disminuido en el periodo de estudio, manteniéndose estable el número de formas extrapulmonares.
6. La existencia de enfermedad de base, en concreto la presencia de coinfección por el VIH, se asocia a mayor riesgo de desarrollo de TB extrapulmonar.
7. La mayoría de los enfermos diagnosticados de TB en nuestro Servicio son inmigrantes y en una proporción mayor a la estimada en los Informes de Salud de la CV y del Ministerio de Sanidad.

8. La forma de presentación clínica de la TB en la población inmigrante y su tasa de resistencia a los fármacos antituberculosos son similares a las observadas en la población autóctona.
9. Las técnicas de biología molecular ayudan al diagnóstico de la enfermedad TB, siendo más útiles en las formas pulmonares, y a la detección precoz de resistencias a fármacos antituberculosos de primera línea, en concreto rifampicina.
10. El linaje 4 es el más frecuente en el DS La Fe y las mutaciones detectadas con mayor frecuencia son las localizadas en la región promotora del gen *inhA*, en el codón 315 del gen *katG* y en el codón 450 del gen *rpoB*.
11. La SCG es una herramienta más precisa que las técnicas comercializadas de biología molecular para detectar resistencias a isoniacida en nuestra área, así como para el estudio epidemiológico de contactos.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## VI BIBLIOGRAFÍA

- (1) Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, et al. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis* 2004 Sep;4(9):584-592.
- (2) Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect* 2014 Mar;20(3):196-201.
- (3) Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO, et al. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Apr;151(4):1267-1268.
- (4) Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Evol Microbiol* 1997;47(4):1236-1245.
- (5) Luna JC. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología* 2001;37(1):35-42.
- (6) Niemann S, Kubica T, Bange FC, Adjei O, Browne EN, Chinbuah MA, et al. The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. *J Clin Microbiol* 2004 Sep;42(9):3958-3962.
- (7) Kremer K, van Soolingen D, van Embden J, Hughes S, Inwald J, Hewinson G. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J Clin Microbiol* 1998 Sep;36(9):2793-2794.
- (8) Loudon RG, Spohn SK. Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis 1. *Am Rev Respir Dis* 1969;99(1):109-111.
- (9) Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA, Sebek MM, Verver S, Boeree MJ, et al. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin Infect Dis* 2008 Nov 1;47(9):1135-1142.
- (10) Bloom BR, McKinney JD. The death and resurrection of tuberculosis. *Nat Med* 1999;5(8):872-874.
- (11) Hu Y, Mangan JA, Dhillon J, Sole KM, Mitchison DA, Butcher PD, et al. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. *J Bacteriol* 2000 Nov;182(22):6358-6365.
- (12) Walter ND, Painter J, Parker M, Lowenthal P, Flood J, Fu Y, et al. Persistent latent tuberculosis reactivation risk in United States immigrants. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2014;189(1):88-95.
- (13) Ai J, Ruan Q, Liu Q, Zhang W. Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging microbes & infections* 2016;5(2):e10.
- (14) Kochi A. Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality. *Immunobiology* 1994;191(4-5):325-336.
- (15) World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. : World Health Organization; 2013.
- (16) Zumla A, George A, Sharma V, Herbert RHN, of Ilton BM, Oxley A, et al. The WHO 2014 global tuberculosis report—further to go. *The Lancet Global Health* 2015;3(1):e10-e12.

- (17) Kanabus A. Information about Tuberculosis. Tersedia dari: [www.tbfacts.org](http://www.tbfacts.org)-See more at: <http://www.tbfacts.org/tb-treatment-children/#sthash.RnMevfRm.dpuf><http://www.tbfacts.org/tb-treatment-children> 2016.
- (18) World Health Organization. WHO | The top 10 causes of death 2017; Available at: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/). Accessed April, 2017.
- (19) World Health Organization. Global tuberculosis report, 2015. WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva, Switzerland: WHO, 2015; Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1). Accessed octubre, 2016.
- (20) Rodriguez E, Villarubia S, Diaz O. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2013. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de salud Carlos III. Madrid 2014.
- (21) Informe Tuberculosis Comunidad Valenciana. Vigilancia Epidemiológica Año 2015. 2016; Available at: <http://www.sp.san.gva/>. Accessed April, 2017.
- (22) Isidro Antuñano. La inmigración extranjera en la Comunidad Valenciana en síntesis. 2010; Available at: [http://www.ivie.es/downloads/migraciones/2010/documentos/radiografia\\_migracion\\_cv\\_2010.pdf](http://www.ivie.es/downloads/migraciones/2010/documentos/radiografia_migracion_cv_2010.pdf). Accessed April, 2017.
- (23) Dye C, Garnett GP, Sleeman K, Williams BG. Prospects for worldwide tuberculosis control under the WHO DOTS strategy. *The Lancet* 1998;352(9144):1886-1891.
- (24) Stop T. Partnership. The global plan to stop TB 2006;2015:2006.
- (25) Stop T. Partnership. The Global Plan to End TB: The Paradigm Shift 2016–2020. 2015 2016.
- (26) Dirección General de Salud Pública. 2017; Available at: <http://www.sp.san.gva.es/sscc/puntosMenu.jsp?CodPor=121&Opcion=SANMS51100&Pag=punto.jsp?CodPunto=766&MenuSup=SANMS51000&Seccion=SANPS51300&Nivel=2>. Accessed marzo, 2017.
- (27) Heemskerk D, Caws M, Marais B, Farrar J. Tuberculosis in Adults and Children. : Springer; 2015.
- (28) Davies PD, Gordon SB, Davies G. Clinical tuberculosis. : CRC Press; 2014.
- (29) Tuberculosis in the normal host: radiological findings. *Seminars in roentgenology*: Elsevier; 1993.
- (30) Harisinghani MG, McLoud TC, Shepard JO, Ko JP, Shroff MM, Mueller PR. Tuberculosis from Head to Toe 1: (CME available in print version and on RSNA Link). *Radiographics* 2000;20(2):449-470.
- (31) Aisenberg GM, Jacobson K, Chemaly RF, Rolston KV, Raad II, Safdar A. Extrapulmonary tuberculosis active infection misdiagnosed as cancer. *Cancer* 2005;104(12):2882-2887.
- (32) Liang Q, Shi H, Wang K, Qin S, Qin X. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respir Med* 2008;102(5):744-754.
- (33) Ahmed I, Hashmi S, Tanwir F, Ahmed S, Khan MS. Tuberculosis--frequency and differential diagnosis--analysis of cases in Pakistan. *Oral Health Dent Manag* 2014 Sep;13(3):768-771.
- (34) Fazal-i-Wahid H, Ahmed I. Extrapulmonary tuberculosis in patients with cervical lymphadenopathy. *J Pak Med Assoc* 2013;63(9):1094-1097.
- (35) Rieder HL, Snider Jr DE, Cauthen GM. Extrapulmonary tuberculosis in the united states 1–3. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:347-351.



## Bibliografía

- (36) Cheng S, Wang H, Yang P. Paradoxical response during anti-tuberculosis treatment in HIV-negative patients with pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2007;11(12):1290-1295.
- (37) Valdazo JP, Perez-Ruiz F, Albarracin A, Sanchez-Nievas G, Perez-Benegas J, Gonzalez-Lanza M, et al. Tuberculous arthritis. Report of a case with multiple joint involvement and periarticular tuberculous abscesses. *J Rheumatol* 1990 Mar;17(3):399-401.
- (38) Cherian A, Thomas S. Central nervous system tuberculosis. *African health sciences* 2011;11(1).
- (39) Yurt S, Küçükergin C, Yigitbas BA, Seçkin Ş, Tigin HC, Koşar AF. Diagnostic utility of serum and pleural levels of adenosine deaminase 1-2, and interferon- $\gamma$  in the diagnosis of pleural tuberculosis. *Multidisciplinary respiratory medicine* 2014;9(1):12.
- (40) Merchant S, Bharati A, Merchant N. Tuberculosis of the genitourinary system-Urinary tract tuberculosis: Renal tuberculosis-Part I. *Indian J Radiol Imaging* 2013 Jan;23(1):46-63.
- (41) Caskurlu T, Resim S, Bayraktar Z, Taşçı A, Sevin G. Urinary tuberculosis in a two-year-old boy. *Int Urol Nephrol* 1998;30(5):525-528.
- (42) Udani PM, Bhat US, Bhawe SK, Ezuthachan SG, Shetty VV. Problem of tuberculosis in children in India epidemiology, morbidity, mortality and control programme. *Indian Pediatr* 1976 Dec;13(12):881-890.
- (43) Sharma SK, Mohan A, Sharma A. Challenges in the diagnosis & treatment of miliary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2012;135(5):703.
- (44) Ramírez-Lapausa M, Menéndez-Saldaña A, Noguerado-Asensio A. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Rev Esp Sanid Penit* 2015;17:3-11.
- (45) Sharma SK, Mohan A, Sharma A, Mitra DK. Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *The Lancet infectious diseases* 2005;5(7):415-430.
- (46) Uthman I, Kanj N, El-Sayad J, Bizri A. Miliary tuberculosis after infliximab therapy in Lebanon. *Clin Rheumatol* 2004;23(3):279-280.
- (47) Dixon WG, Hyrich KL, Watson KD, Lunt M, Galloway J, Ustianowski A, et al. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann Rheum Dis* 2010 Mar;69(3):522-528.
- (48) Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* 1768;72(9):1761.
- (49) Dela Cruz CS, Lyons PG, Pasnick S, Weinstock T, Nahid P, Wilson KC, et al. Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Annals of the American Thoracic Society* 2016;13(11):2060-2063.
- (50) Kadiravan T, Deepanjali S. Role of corticosteroids in the treatment of tuberculosis: an evidence-based update. 2010.
- (51) Liu J, Barry CE, Besra GS, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* 1996;271(47):29545-29551.
- (52) Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory research* 2001;2(3):164.
- (53) Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Nov;39(11):2484-2489.

- (54) Steele MA, Des Prez RM. The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest* 1988;94(4):845-850.
- (55) Kim TC, Blackman RS, Heatwole KM, Kim T, Rochester DF. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. *Am Rev Respir Dis* 1984 Feb;129(2):264-268.
- (56) World Health Organization, Stop TB Initiative (World Health Organization). *Treatment of tuberculosis: guidelines.* : World Health Organization; 2010.
- (57) World Health Organization. *WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis 2016 update.* 2016.
- (58) Horsburgh Jr CR, Barry III CE, Lange C. Treatment of tuberculosis. *N Engl J Med* 2015;373(22):2149-2160.
- (59) Van Deun A, Maug AKJ, Salim MAH, Das PK, Sarker MR, Daru P, et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;182(5):684-692.
- (60) Ziganshina LE, Titarenko AF, Davies GR. Fluoroquinolones for treating tuberculosis (presumed drug-sensitive). *Cochrane Database Syst Rev* 2013 Jun 6;(6):CD004795. doi(6):CD004795.
- (61) Global Alliance for TB Drug Development. A Phase 2 Open Label Partially Randomized Trial to Evaluate the Efficacy, Safety and Tolerability of Combinations of Bedaquiline, Moxifloxacin, PA-824 and Pyrazinamide in Adult Subjects With Drug-Sensitive or Multi Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. (NC-005). 2016; Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02193776>. Accessed april, 2017.
- (62) Goel D. Bedaquiline: A novel drug to combat multiple drug-resistant tuberculosis. *J Pharmacol Pharmacother* 2014 Jan;5(1):76-78.
- (63) Dheda K, Chang KC, Guglielmetti L, Furin J, Schaaf HS, Chesov D, et al. Clinical management of adults and children with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 2017 Mar;23(3):131-140.
- (64) Blair HA, Scott LJ. Delamanid: a review of its use in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Drugs* 2015 Jan;75(1):91-100.
- (65) Bloemberg GV, Keller PM, Stucki D, Trauner A, Borrell S, Latshang T, et al. Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis. *N Engl J Med* 2015;373(20):1986-1988.
- (66) Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann B. Paediatric tuberculosis. *The Lancet infectious diseases* 2008;8(8):498-510.
- (67) Poyntz HC, Stylianou E, Griffiths KL, Marsay L, Checkley AM, McShane H. Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*(*Tuberculosis (Edinb)*) 2014 May;94(3):226-237.
- (68) Minhinnick A, Satti I, Harris S, Wilkie M, Sheehan S, Stockdale L, et al. A first-in-human phase 1 trial to evaluate the safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A-IMX313, administered to BCG-vaccinated adults. *Vaccine* 2016 Mar 8;34(11):1412-1421.
- (69) Getahun H, Kittikraisak W, Heilig CM, Corbett EL, Ayles H, Cain KP, et al. Development of a standardized screening rule for tuberculosis in people living with HIV in resource-constrained settings: individual participant data meta-analysis of observational studies. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000391.

## Bibliografía

- (70) De La Iglesia A, Morbidoni YH. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniazida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Revista argentina de microbiología* 2006;38(2):97-109.
- (71) Essa SA, Abdel-Samea SA, Ismaeil YM, Mohammad AA. Comparative study between using Lowenstein Jensen and Bio-FM media in identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis* 2013;62(2):249-255.
- (72) Naveen G, Peerapur BV. Comparison of the Lowenstein-Jensen Medium, the Middlebrook 7H10 Medium and MB/BacT for the Isolation of *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) from Clinical Specimens. *J Clin Diagn Res* 2012 Dec;6(10):1704-1709.
- (73) Snider Jr DE. The Tuberculin Skin Test 1. *Am Rev Respir Dis* 1982;125(3P2):108-118.
- (74) Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004;170(1):65-69.
- (75) Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *The Lancet* 2000;356(9235):1099-1104.
- (76) de Jong BC, Hill PC, Brookes RH, Gagneux S, Jeffries DJ, Otu JK, et al. *Mycobacterium africanum* elicits an attenuated T cell response to early secreted antigenic target, 6 kDa, in patients with tuberculosis and their household contacts. *J Infect Dis* 2006 May 1;193(9):1279-1286.
- (77) Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Cuzzi G, Navarra A, Gualano G, et al. Assessment of CD27 expression as a tool for active and latent tuberculosis diagnosis. *J Infect* 2015;71(5):526-533.
- (78) Ruhwald M, Cayla J, Aggerbaek H, Dheda K, Andersen PL. Diagnostic accuracy of the novel C-Tb skin test for LTBI, results from two phase III trials 2016.
- (79) Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011 Apr;49(4):1621-1623.
- (80) Tevere VJ, Hewitt PL, Dare A, Hocknell P, Keen A, Spadoro JP, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification with pan-*Mycobacterium* primers and hybridization to an *M. tuberculosis*-specific probe. *J Clin Microbiol* 1996 Apr;34(4):918-923.
- (81) Yang YC, Lu PL, Huang SC, Jenh YS, Jou R, Chang TC. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011 Mar;49(3):797-801.
- (82) Tortoli E, Urbano P, Marcelli F, Simonetti TM, Cirillo DM. Is real-time PCR better than conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in clinical samples? *J Clin Microbiol* 2012 Aug;50(8):2810-2813.
- (83) Garcia LS. *Clinical microbiology procedures handbook*. : American Society for Microbiology Press; 2010.
- (84) Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: 9 a Micobacterias. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2005.
- (85) Wayne P. *Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved standard*. 2008.

- (86) Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2000 Sep;38(9):3231-3234.
- (87) Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *The Lancet infectious diseases* 2013;13(4):349-361.
- (88) Rufai SB, Kumar P, Singh A, Prajapati S, Balooni V, Singh S. Comparison of Xpert MTB/RIF with line probe assay for detection of rifampin-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2014 Jun;52(6):1846-1852.
- (89) Brossier F, Guindo D, Pham A, Reibel F, Sougakoff W, Veziris N, et al. Performance of the New Version (v2.0) of the GenoType MTBDRsl Test for Detection of Resistance to Second-Line Drugs in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *J Clin Microbiol* 2016 Jun;54(6):1573-1580.
- (90) Causse M, Ruiz P, Gutierrez J, Vaquero M, Casal M. New Anyplex™ II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in *M. tuberculosis* cultures. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2015;19(12):1542-1546.
- (91) Pang Y, Dong H, Tan Y, Deng Y, Cai X, Jing H, et al. Rapid diagnosis of MDR and XDR tuberculosis with the MeltPro TB assay in China. *Sci Rep* 2016 May 6;6:25330.
- (92) Dominguez J, Boettger E, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach K, Gagneux S, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2016;20(1):24-42.
- (93) Bunger R, Singh V, Avneet MS, Pathania D. Evaluation of BACTEC Micro MGIT with Lowenstein Jensen Media for Detection of *Mycobacteria* in Clinically Suspected Patients of Extra Pulmonary Tuberculosis in a Tertiary Care Hospital at Mullana (Ambala). *J Med MicrobDiagn* 2013;2:123.
- (94) Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Erratum: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;396(6707):190.
- (95) KUBICA GP, KIM TH, DUNBAR FP. Designation of strain H37Rv as the neotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 1972;22(2):99-106.
- (96) Coll F, McNerney R, Preston MD, Guerra-Assunção JA, Warry A, Hill-Cawthorne G, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome medicine* 2015;7(1):51.
- (97) Hatherell H, Colijn C, Stagg HR, Jackson C, Winter JR, Abubakar I. Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: a systematic review. *BMC medicine* 2016;14(1):21.
- (98) Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *The Lancet infectious diseases* 2013;13(2):137-146.
- (99) Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 2011;364(8):730-739.
- (100) Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, Blom J, et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med* 2013;10(2):e1001387.

## Bibliografía

- (101) Yimer SA, Norheim G, Namouchi A, Zegeye ED, Kinander W, TÄñjum T, et al. Mycobacterium tuberculosis Lineage 7 Strains Are Associated with Prolonged Patient Delay in Seeking Treatment for Pulmonary Tuberculosis in Amhara Region, Ethiopia. *J Clin Microbiol* 2015 Apr;53(4):1301-1309.
- (102) Fenner L, Egger M, Bodmer T, Furrer H, Ballif M, Battegay M, et al. HIV infection disrupts the sympatric host-pathogen relationship in human tuberculosis. *PLoS Genet* 2013;9(3):e1003318.
- (103) Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med* 2017 Mar 15.
- (104) Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet* 2016;48(12):1535-1543.
- (105) Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, et al. Human T cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet* 2010 Jun;42(6):498-503.
- (106) Alland D, Lacher DW, Hazbon MH, Motiwala AS, Qi W, Fleischmann RD, et al. Role of large sequence polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and the utility of LSPs in phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007 Jan;45(1):39-46.
- (107) Yang Z, Yang D, Kong Y, Zhang L, Marrs CF, Foxman B, et al. Clinical relevance of Mycobacterium tuberculosis plcD gene mutations. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;171(12):1436-1442.
- (108) Comas I, Gil A. Secuenciación masiva para el diagnóstico y la epidemiología de tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2016;34:32-39.
- (109) Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. : Molecular genetics of mycobacteria. ASM Press, Washington, DC; 2000.
- (110) Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Elias CDO, Bradley P, et al. Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases* 2015;15(10):1193-1202.
- (111) Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 2001;104(6):901-912.
- (112) Garcia de Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. 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* 2002 Mar;40(3):988-995.
- (113) Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *PLoS one* 2015;10(3):e0119628.
- (114) Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniewski F, Cirillo D, Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of drug resistance: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* 2016.
- (115) Kocagoz T, Saribas Z, Alp A. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005 Dec;43(12):6015-6019.
- (116) Pang Y, Lu J, Wang Y, Song Y, Wang S, Zhao Y. Study of the rifampin monoresistance mechanism in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Feb;57(2):893-900.

- (117) Jamieson FB, Guthrie JL, Neemuchwala A, Lastovetska O, Melano RG, Mehaffy C. Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2014 Jun;52(6):2157-2162.
- (118) Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menendez A, Bouza E, et al. Isolation of Mycobacterium tuberculosis strains with a silent mutation in rpoB leading to potential misassignment of resistance category. J Clin Microbiol 2011 Jul;49(7):2688-2690.
- (119) Van Deun A, Aung KJ, Bola V, Lebeke R, Hossain MA, de Rijk WB, et al. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. J Clin Microbiol 2013 Aug;51(8):2633-2640.
- (120) Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. J Clin Microbiol 2001 Aug;39(8):2987-2990.
- (121) Yuan X, Zhang T, Kawakami K, Zhu J, Li H, Lei J, et al. Molecular characterization of multidrug- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Jiangxi, China. J Clin Microbiol 2012 Jul;50(7):2404-2413.
- (122) Siu GK, Zhang Y, Lau TC, Lau RW, Ho PL, Yew WW, et al. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Antimicrob Chemother 2011 Apr;66(4):730-733.
- (123) Ahmad S, Mokaddas E. The occurrence of rare rpoB mutations in rifampicin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Kuwait. Int J Antimicrob Agents 2005;26(3):205-212.
- (124) Ahmad S, Al-Mutairi NM, Mokaddas E. Variations in the occurrence of specific rpoB mutations in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from patients of different ethnic groups in Kuwait. Indian J Med Res 2012;135(5):756.
- (125) Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, et al. Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 2010 May;54(5):1793-1799.
- (126) Zhao LL, Sun Q, Liu HC, Wu XC, Xiao TY, Zhao XQ, et al. Analysis of embCAB mutations associated with ethambutol resistance in multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates from China. Antimicrob Agents Chemother 2015 Apr;59(4):2045-2050.
- (127) Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniewski F, Rodionova Y, et al. Mycobacterium tuberculosis pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. MBio 2014 Oct 21;5(5):e01819-14.
- (128) Yin X, Yu Z. Mutation characterization of gyrA and gyrB genes in levofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Guangdong Province in China. J Infect 2010;61(2):150-154.
- (129) Willby M, Sikes RD, Malik S, Metchock B, Posey JE. Correlation between GyrA substitutions and ofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 2015 Sep;59(9):5427-5434.
- (130) Ford C, Yusim K, Ioerger T, Feng S, Chase M, Greene M, et al. Mycobacterium tuberculosis--heterogeneity revealed through whole genome sequencing. Tuberculosis (Edinb) 2012 May;92(3):194-201.
- (131) Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. PLoS Med 2009 Feb 10;6(2):e2.

## Bibliografia

- (132) Mykrobe predictor website Available at: <http://www.mykrobe.com>. Accessed February, 2017.
- (133) TB Profiler website. Available at: <http://tldr.lshtm.ac.uk>. Accessed February, 2017.
- (134) Sekizuka T, Yamashita A, Murase Y, Iwamoto T, Mitarai S, Kato S, et al. TGS-TB: total genotyping solution for Mycobacterium tuberculosis using short-read whole-genome sequencing. *PLoS one* 2015;10(11):e0142951.
- (135) Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, Kohl TA, Miotto P, Cirillo DM, et al. PhyResSE: a Web Tool Delineating Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol* 2015 Jun;53(6):1908-1914.
- (136) Satta G, Atzeni A, McHugh TD. Mycobacterium tuberculosis and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist. *Clinical Microbiology and Infection* 2016.
- (137) Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33(7):1870-1874.
- (138) Hidalgo Sanchez J, Martinez Ruiz F, Morales Lorente T, Moya Esquiza C, Rosriguez Ciria M. Arees Vulnerables a la ciutat de València. Seccions censals. 2016; Available at: <http://www.valencia.es/ayuntamiento/webs/estadistica/CatPub/files/Arees%20Vulnerables.pdf>. Accessed Septiembre, 2017.
- (139) Gil-Brusola A, Pintó Carbó M, Santos M, Comas I, González F, Córdoba J, et al. Revisión de los casos de tuberculosis de un hospital terciario y estudio de linajes". XVIII Congreso de la SVAMC. Octubre 2012.
- (140) Kline SE, Hedemark LL, Davies SF. Outbreak of tuberculosis among regular patrons of a neighborhood bar. *N Engl J Med* 1995;333(4):222-227.
- (141) CDC Fact Sheet. Tuberculosis: An Overview. March 2014; Available at: <https://www.cdc.gov/nchhstp/newsroom/docs/factsheets/tb-overview-factsheet.pdf>.
- (142) Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011 Jan;37(1):100-111.
- (143) de Visser V, Sotgiu G, Lange C, Aabye MG, Bakker M, Bartalesi F, et al. False-negative interferon-gamma release assay results in active tuberculosis: a TBNET study. *Eur Respir J* 2015 Jan;45(1):279-283.
- (144) Recidiva de tuberculosis en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Anales de Medicina Interna: SciELO Espana*; 2001.
- (145) Hidalgo P, Awad C, Pavía J. Factores de riesgo para recaída de tuberculosis pulmonar en pacientes del Hospital Santa Clara de Bogotá 1992/2000. *Rev Colomb Neumol* 2002;14(1).
- (146) Lin C, Lin C, Kuo Y, Wang J, Hsu C, Chen J, et al. Tuberculosis mortality: patient characteristics and causes. *BMC infectious diseases* 2014;14(1):5.
- (147) Sterling T, Zhao Z, Khan A, Chaisson R, Schluger N, Mangura B, et al. Mortality in a large tuberculosis treatment trial: modifiable and non-modifiable risk factors. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2006;10(5):542-549.



- (148) Olson NA, Davidow AL, Winston CA, Chen MP, Gazmararian JA, Katz DJ. A national study of socioeconomic status and tuberculosis rates by country of birth, United States, 1996–2005. *BMC Public Health* 2012;12(1):365.
- (149) World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, planning, financing: WHO report 2009. 2009.
- (150) van der Werf MJ, Kodmon C, Zucs P, Hollo V, Amato-Gauci AJ, Pharris A. Tuberculosis and HIV coinfection in Europe: looking at one reality from two angles. *AIDS* 2016 Nov 28;30(18):2845-2853.
- (151) TANDEM Report Summary. Periodic Report Summary 2 - TANDEM (Concurrent Tuberculosis and Diabetes Mellitus; unraveling the casual link, and improving care). 2017; Available at: <http://tandem-fp7.eu>, June.
- (152) Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS med* 2008;5(7):e152.
- (153) Millar J, Home NW. Tuberculosis in immunosuppressed patients. *Lancet* 1979;1:1176-1178.
- (154) Arora V, Gupta R. Tuberculosis and pregnancy. *Indian Journal of Tuberculosis* 2003;50(1):13-16.
- (155) Knight M, Kurinczuk J, Nelson- Piercy C, Spark P, Brocklehurst P. Tuberculosis in pregnancy in the UK. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2009;116(4):584-588.
- (156) The role of e/m Health in tuberculosis and tobacco control. Meeting report. : World Health Organization; 2015.
- (157) González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología* 2010;46(5):255-274.
- (158) Kalu EI, Ojide CK, Ugochukwu NV. Gastric aspirate smear microscopy as a diagnostic tool for childhood pulmonary tuberculosis. *Annals of Tropical Medicine and Public Health* 2013;6(6):608.
- (159) Cruz AT, Revell PA, Starke JR. Gastric aspirate yield for children with suspected pulmonary tuberculosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 2012;2(2):171-174.
- (160) Rodríguez Valín E, Villarrubia Enseñat S, Martínez Sánchez EV, Amillategui R, Sastre M, Díaz O, et al. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2014. Available at: [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf\\_2015/TB\\_Informe\\_2014.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2015/TB_Informe_2014.pdf). Accessed Sept 2017.
- (161) Guenaoui K, Harir N, Ouardi A, Zeggai S, Sellam F, Bekri F, et al. Use of GeneXpert Mycobacterium tuberculosis/rifampicin for rapid detection of rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis strains of clinically suspected multi-drug resistance tuberculosis cases. *Ann Transl Med* 2016 May;4(9):168.
- (162) Ajantha GS, Shetty PC, Kulkarni RD, Biradar U. PCR as a diagnostic tool for extra-pulmonary tuberculosis. *J Clin Diagn Res* 2013 Jun;7(6):1012-1015.
- (163) Aung HL, Tun T, Moradigaravand D, Köser CU, Nyunt WW, Aung ST, et al. Whole-genome sequencing of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Myanmar. *Journal of global antimicrobial resistance* 2016;6:113-117.
- (164) Kong Y, Cave MD, Zhang L, Foxman B, Marrs CF, Bates JH, et al. Association between Mycobacterium tuberculosis Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights



## Bibliografía

from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007 Feb;45(2):409-414.

(165) Firdessa R. Mycobacterial Lineages Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis, Ethiopia-Volume 19, Number 3—March 2013-Emerging Infectious Disease journal-CDC. 2013.

(166) Pichat C, Couvin D, Carret G, Frédénucci I, Jacomo V, Carricajo A, et al. Combined Genotypic, Phylogenetic, and Epidemiologic Analyses of *Mycobacterium tuberculosis* Genetic Diversity in the Rhône Alpes Region, France. *PLoS one* 2016;11(4):e0153580.

(167) Bollela V, Namburete E, Feliciano C, Macheque D, Harrison L, Caminero J. Detection of *katG* and *inhA* mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2016;20(8):1099-1104.

(168) Ando H, Miyoshi- Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T. A silent mutation in *mabA* confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2014;91(3):538-547.

(169) Kumar S, Jena L. Understanding rifampicin resistance in tuberculosis through a computational approach. *Genomics & informatics* 2014;12(4):276-282.

(170) Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, Beckert P, Mukadi BK, Mathys V, et al. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 2016.

(171) Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2009;89(2):109-113.

(172) Borrell S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2009;13(12):1456-1466.



**ANEXOS**



## VII ANEXOS

### ANEXO I: Informe científico y ético de Investigación.



Dr. Javier Peman Garcia  
D<sup>a</sup> Ana Gil Brusola  
Servicio de Microbiología

*Asunto: Autorización Inicio Estudio.*

Valencia, 13 de Julio de 2016

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente** a las modificaciones solicitadas sobre el Proyecto de Tesis titulado "CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA Y GENÓMICA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD LA FE DE VALENCIA" por usted presentado.

A la vista de los dictámenes emitidos, dicho Proyecto, puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,



Instituto de Investigación Sanitaria La Fe  
José María Millán Salvador  
Director General

Valencia a 13 de Julio de 2016

El Dr. **Rafael Botella Estrada**, Presidente de la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

**INFORMA:**

Que el Proyecto de Tesis titulado: "CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA Y GENÓMICA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD LA FE DE VALENCIA" que presenta como **Doctorando D<sup>a</sup> Ana Gil Brusola**, siendo Director de la Tesis el Dr. Iñaki Comas Espadas de la Universidad de Valencia y el Tutor del hospital el Dr. Javier Peman Garcia del Servicio / Unidad / Grupo Acreditado de Microbiología del Hospital U. I.P. La Fe, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse positivamente en cuanto a su viabilidad.



Rafael Botella Estrada  
Presidente de la Comisión de Investigación



Po



FPNT-CEIB-07 (A)

## DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **14 de junio de 2016**, el Proyecto de Tesis:

Título: **“CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA Y GENÓMICA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD LA FE DE VALENCIA.”**

Nº de registro **2016/0285**

Versión/fecha de la memoria del proyecto: **PROYECTO\_TESIS**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Tesis que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, siendo el Director de la Tesis el/la **Dr. / Dra. IÑAKI COMAS ESPADAS** de la **UNIVERSIDAD DE VALENCIA**, el Tutor del Hospital el/la **Dr./ Dra. JAVIER PEMAN GARCIA** del servicio/unidad/grupo de investigación de **MICROBIOLOGÍA**, y el **DOCTORANDO D./ Dña. ANA GIL BRUSOLA**.

Miembros del CEIB:

**Presidente:**

Dr. JOAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

**Vicepresidente:**

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

**Secretario:**

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Licenciado en derecho-Ajeno profesión sanitaria)

**Miembros:**

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Dr. LUIS ALMENAR BONET (Cardiología)

Dra. ESTHER ZORIO GRIMA (Cardiología)

Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)

Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)

Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Hepatología Experimental)

Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)

FPNT-CEIB-07 (A)

Dr. JOSE LOPEZ ALDEGUER (Enfermedades Infecciosas)  
Dr. JAVIER PEMAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)  
Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)  
Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)  
Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA ( )  
Dra. BEGOÑA POLO MIQUEL (Gastroenterología Pediátrica)  
Dr. ISIDRO VITORIA MIÑANA (Pediatria)  
Dra. EUGENIA PAREJA IBARS (Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático)  
Dr. JAIME SANZ CABALLER (Investigador del Grupo Acreditado en Hematología y Hemoterapia)  
Dra. PILAR SEPULVEDA SANCHIS (Cardiocirculatorio)  
Dra. MARIA LUISA MARTINEZ TRIGUERO (Análisis Clínicos)  
Dra. MARIA TORDERA BAVIERA (Farmacéutica del Hospital)  
Dr. ENRIQUE VIOSCA HERRERO (Jefe de Servicio - Medicina Física y Rehabilitación)  
Dr. EDUARDO GARCIA-GRANERO XIMENEZ (Cirugía General y Digestivo)  
Dr. RAFAEL BOTELLA ESTRADA (Dermatología)  
Dr. OSCAR DIAZ CAMBRONERO (Anestesia y Reanimación)

Lo que firmo en Valencia, a 14 de junio de 2016



Fdo.: Don Serafin Rodríguez Capellán  
Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica



## ANEXO II: Encuesta epidemiológica de tuberculosis de la CV.



Conselleria de Sanitat  
DIRECCIÓN GENERAL  
DE SALUD PÚBLICA

La información contenida en esta encuesta es  
confidencial y su uso es estrictamente sanitario  
(Ley 14/1986, General de Sanidad, art. 10.3)

ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA DE TUBERCULOSIS						
<b>DATOS DEL MÉDICO</b>						
Nombre y Apellidos: _____	Nº de Coleg: _____					
Localidad: _____	Centro de Trabajo _____	Teléfono: _____				
Servicio: _____	Fecha declaración _____	Semana _____				
Procedencia de la declaración: _____						
<b>IDENTIFICACIÓN DEL CASO</b>						
SIP: _____	Nº Hª CLÍNICA: _____	AREA _____				
Nombre: _____	Primer Apellido: _____	Segundo Apellido: _____				
Fecha Nacimiento: _____	Edad: _____ (años/meses)	Sexo: Hombre [ ]	Mujer [ ]			
Domicilio: _____		D.P.: _____				
Población: _____		Provincia: _____	Teléfonos: _____			
Ocupación: _____		Municipio donde trabaja _____				
Paciente extranjero: Sí [ ] Año llegada _____ Fecha llegada ___/___/___ País nacimiento _____						
No [ ]						
Observaciones: _____						
<b>DATOS CLINICO-EPIDEMIOLOGICOS</b>						
Nº convivientes en el hogar: _____		Nº de personas con riesgo alto _____				
Fechas: F. Inicio síntomas _____		F. Primera visita _____	F. Inicio Tto. _____	F. Diagnóstico _____		
<b>Clasificación:</b> Confirmado [ ] Probable [ ] Error Diagnostico [ ] Pendiente [ ] Desconocido [ ]						
<b>Caso:</b> Pertenece a brote [ ] Caso aislado [ ] Agregación [ ] Pendiente [ ]						
Desconocido [ ]		En caso de Brote o Agregación REFERENCIA: _____				
<b>Tipo caso:</b> Autóctono [ ] Importado [ ] Extracomunitario [ ] Pendiente [ ]						
Desconocido [ ]		País _____ Com. Autónoma _____				
<b>PRUEBAS DIAGNÓSTICAS:</b>						
	Positivo	Negativo	No realizado	Pendiente	Dudoso	Desconocido
Mantoux (____mm)	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Baciloscopia	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Cultivo	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Anat. Patológica	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Rx Torax	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Otra prueba	( _____ )					
<b>CONFIRMACIÓN BACTERIOLÓGICA:</b> Sí [ ] No [ ]						
<b>TIPO GERMEN:</b> M. Tuberculosis [ ] M. Bovis [ ] M. Africanum [ ] M. Atípica [ ]						
Sin especificar [ ]		Otro [ ]	Desconocido [ ]			
<b>LOCALIZACIÓN:</b> Pulmonar [ ] Pleural [ ] Laringea [ ] Meningea [ ] Genito-urinaria [ ]						
SNC [ ]		Digestiva [ ]	Diseminada [ ]	Miliar [ ]	Osteoarticular [ ]	
Linfática Intratorácica [ ]		Linfática Extratorácica [ ]	Otra localización [ ] Desconocido [ ]			
<b>LOCALIZACIÓN SECUNDARIA</b> (si la hubiera): _____						
<b>SÍNTOMAS:</b> Respiratorios [ ] Generales [ ] Ambos [ ] Asintomático [ ] Otros [ ]						
Citar: _____						
<b>SITUACIÓN EVOLUTIVA:</b> C.Inicial [ ] Tratado Previamente [ ] Desconocido [ ]						
Año inicio tratamiento (en el caso de Tratado Previamente) _____						

**PAUTA DE TRATAMIENTO:**

2RHZ+4RH [ ] 2RHE+4RH [ ] 2RHE+7RH [ ]  
 2ERH+10ER [ ] 2HZE+10ER [ ] 2RHZE+10RHE [ ]  
 2RHZE+7 a 10RHZ [ ] Otra [ ] Especificar otra \_\_\_\_\_ Desconocida [ ]

**RESISTENCIAS:**

[H] Sí [ ] No [ ] Desconocido [ ] [R] Sí [ ] No [ ] Desconocido [ ]  
 [Z] Sí [ ] No [ ] Desconocido [ ] [S] Sí [ ] No [ ] Desconocido [ ]  
 [E] Sí [ ] No [ ] Desconocido [ ] Otros fármacos: \_\_\_\_\_

**TIPO DE TRATAMIENTO:**

Ingreso hospitalario Sí [ ] No [ ] Desc. [ ] Fecha Ingreso \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Fecha alta hospitalaria \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Hospital \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES:**

Sin contacto con enfermo conocido [ ] Contacto, sin prescripción de quimioprofilaxis [ ] Contacto, con QP que no tomó [ ]  
 Contacto, con QP que tomó de forma incompleta [ ] Contacto, que tomó de forma completa la QP [ ] Desconocidos [ ]

**PATOLOGÍA ASOCIADA :**

Alcoholismo [ ] VIH-coinfec. [ ] UDPV [ ] Diabetes [ ] Neoplásia [ ] Otra Patología [ ]  
 Especificar otra \_\_\_\_\_

**FACTORES DE RIESGO:**

Marginados [ ] Inmigrante zon alta endémica < 5 años [ ] Transeúnte [ ] Personal sanitario [ ]  
 Prisiones [ ] Residencia de ancianos [ ] Otras colectividades cerradas [ ]

**TRATAMIENTO OBSERVADO DIRECTAMENTE (TOD)**

Tratamiento Directamente Observado (TOD) Sí [ ] No [ ] Desc. [ ]

- Tuberculosis o TITL en programa TOD: TB [ ] TITL [ ]

- Fecha inicio del TOD:

- Oficina de farmacia, Centro de Atención Primaria u Hospital que dispensa el TOD: \_\_\_\_\_

- Número de controles de toma TOD: \_\_\_\_\_

- Resultados de la bioquímica hepática realizada:

1. Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ GOT \_\_\_\_\_ GPT \_\_\_\_\_

2. Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ GOT \_\_\_\_\_ GPT \_\_\_\_\_

3. Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ GOT \_\_\_\_\_ GPT \_\_\_\_\_

- EL CASO, ha sido declarado por las EDO: Sí [ ] No [ ] Año de declaración : \_\_\_\_\_

- Número de test de Hamilton realizado: \_\_\_\_\_ Número de positivos: \_\_\_\_\_

- Fecha de finalización del TOD: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EVOLUCIÓN AL FINALIZAR EL TOD:**

Curación [ ] Tratamiento completo [ ] Fracaso terapéutico [ ] Traslado [ ]

Abandono [ ] Muerte por TBC [ ] Muerte NO por TBC [ ]

**EVOLUCIÓN AL FINAL DEL PROCESO**

Curación [ ] Tratamiento completo [ ] Fracaso terapéutico [ ] Traslado [ ]

Abandono [ ] Muerte por TBC [ ] Muerte No por TBC [ ]

Tratamiento prolongado por complicaciones [ ] Régimen inicial con duración mayor de 12 meses [ ]

Sin información disponible [ ] Pérdida [ ] Supresión de tratamiento por complicaciones [ ]

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

FECHA DE CUMPLIMENTACIÓN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ANEXO III: Tabla resumen de las características de los pacientes VIH positivos.

Caso	Edad/ Sexo	País de origen	Linfocitos CD4	PT	QTF	Forma clínica	IRSEP	Evolución
3	41/V	ESP	ND	NR	NR	TBP	SSSSS	Éxito
5	38/M	GNQ	ND	NEG	NR	TBEP (miliar)	SSSSS	Buena
10	45/M	ESP	196	POS	NR	TBEP (ganglionar)	SRSSS	Buena
14	41/M	GNQ	411	POS	NR	TBEP (vertebral)	SSSSS	Buena
20	25/M	ESP	25	NR	NR	TBEP (miliar)	SSSSS	Pérdida seguimiento
26	34/V	GAM	83	POS	IND	TBEP (miliar)	SSSSS	Buena
29	45/M	NGA	ND	POS	NR	TBEP (ganglionar)	RRSSS	Buena
30	35/V	NGA	79	NEG	POS	TBEP (ganglionar)	SSSSS	Buena
32	38/V	ESP	ND	NR	NR	TBP	SSSSS	Recidiva
60	42/M	DOM	195	NR	NR	TBEP (miliar)	SSSSS	Buena
115	22/V	GHA	16	NEG	POS	TBEP (miliar)	SSSSS	Buena
131	42/V	ESP	8	NR	NR	TBP	SSSSS	Pérdida seguimiento
138	43/M	ESP	38	POS	POS	TBEP (miliar)	SSSSS	Recidiva
139	39/V	ROU	4	NR	NEG	TBEP (ganglionar)	SSSSS	Pérdida seguimiento
161	41/V	ROU	19	NR	NR	TBEP (miliar)	SSSSS	ND
166	ND	ND	24	NR	NR	TBP	SSSSS	Buena
174	28/V	CAM	206	NR	POS	TBEP (pleural)	SSSSS	Buena
185	31/M	MAR	ND	NR	NR	TBEP (miliar)	SSSSR	Buena
188	36/M	UKR	ND	NR	NR	TBP	RRRSS	Recidiva
190	40/V	GNQ	271	NR	POS	TBEP (ganglionar)	SSSSS	Buena

**PT:** Prueba de la tuberculina; **QTF:** Quantiferon®; **IRSEP:** sensibilidad fenotípica a isoniacida, rifampicina, estreptomocina, etambutol y piracinamida; **m:** meses; **M:** mujer; **V:** varón; **ESP:** España; **GNQ:** Guinea Ecuatorial; **GAM:** Gambia; **NGA:** Nigeria; **DOM:** República Dominicana; **GHA:** Ghana; **ROU:** Rumania; **CAM:** Camerún; **MAR:** Marruecos; **UKR:** Ucrania; **NP:** no procede; **NR:** no realizado; **NEG:** negativo; **POS:** positivo; **TBEP:** tuberculosis extrapulmonar; **TBP:** tuberculosis pulmonar

**ANEXO IV:** Tabla resumen de las características de los enfermos menores de 15 años.

Caso	Edad/ Sexo	País de origen	Contacto conocido	PT	QTF	Forma clínica	IRSEP	Evolución
17	4m/M	MAR	Sí (madre)	NEG	NR	TBP	SSSSS	Buena
42	6m/V	ROU	Sí (tío)	POS	NR	TBEP (ganglionar)	SSSSS	Buena
47	4/M	MAR	Sí (abuela)	POS	POS	TBEP (miliar)	SSSSS	Buena
50	3/M	ESP	Sí (profe)	POS	NR	TBEP (ganglionar)	SSSSS	Buena
75	14/M	ESP	NP	NP	NP	TBEP (becegeitis)	SSSSR	Buena
91	2/M	NGA	Sí (profe)	POS	NR	TBP	SSSSS	Buena
93	3/V	ECU	Sí (profe)	POS	NR	TBP	SSSSS	Buena
112	2/V	ESP	NP	NP	NP	TBEP (becegeitis)	SSSSR	Buena
119	4/M	MAR	Leche	POS	NR	TBEP (intestinal)	No crece	Buena
140	15/V	NGA	ND	NR	NR	TBP	SSSSS	Buena
144	23m/V	ROU	Sí (padre)	POS	NR	TBP	SSSSS	Buena
154	3/V	ESP	Sí (abuelo)	POS	NR	TBP	SSSSS	Buena
159	14/V	ESP	Sí (padre)	POS	NR	TBP	SSSSS	Buena
176	3/M	ROU	No	POS	POS	TBEP (vertebral)	SSSSS	Buena

**PT:** Prueba de la tuberculina; **QTF:** Quantiferon®; **IRSEP:** sensibilidad fenotípica a isoniacida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y piracinamida; **m:** meses; **M:** mujer; **V:** varón; **MAR:** Marruecos; **ROU:** Rumania; **ESP:** España; **NGA:** Nigeria; **ECU:** Ecuador; **NP:** no procede; **NR:** no realizado; **ND:** no disponible; **NEG:** negativo; **POS:** positivo; **TBEP:** tuberculosis extrapulmonar; **TBP:** tuberculosis pulmonar

**ANEXO V:** Resumen de las características de los pacientes con cepas secuenciadas.

<b>N</b>	<b>País de origen</b>	<b>Región</b>	<b>IRSEP</b>	<b>Linaje</b>	<b>R WGS</b>
1	GNQ	África Subsahariana	RSSSS	Haarlem	INH
2	RUS	Europa del Este	RSRRS	Beijing	INH,STR,EMB
3	BOL	Sudamérica	SSSSR	LAM	no
4	CHN	Sudeste asiático	RRRRR	Beijing	INH,RIF,STR,EMB
5	BOL	Sudamérica	SSRSS	LAM	STR
6	ESP	Europa	RRSSS	PGG3	INH,RIF
7	DZA	África del Norte	SSSSS	Haarlem	no
8	ESP	Europa	SSSSS	LAM	no
9	IND	Indico	SSSSS	EastAfricanIndian	no
10	ESP	Europa	SSSSS	PGG3	no
11	ESP	Europa	SSSSS	LAM	STR
12	ESP	Europa	SSSSS	PGG3	no
13	ROU	Europa del Este	SSSSS	Haarlem	no
13	Ídem	Ídem	SRSSS	Haarlem	RIF
13	Ídem	Ídem	RRSSS	Haarlem	INH,RIF
14	ROU	Europa del Este	RRRRR	PGG3	INH,RIF,EMB,PZA
15	ESP	Europa	SSSSS	Haarlem	no
16	PAK	Índico	SSSSS	DelhiCAS	no
17	ESP	Europa	SSSSS	LAM	STR
18	ESP	Europa	SSSSS	Haarlem	no
19	ESP	Europa	SSSS-	LAM	STR
20	IND	Índico	RSSSS	DelhiCAS	INH
21	ROU	Europa del Este	SSSSS	X	no
22	ARG	Sudamérica	SSSS-	S-type/Vietnam	no
23	ECU	Sudamérica	SSSSS	PGG3	no
24	MAR	África del Norte	SSSSS	LAM	STR
25	ESP	Europa	SSSSS	Haarlem	no
26	ESP	Europa	SSSSS	PGG3	no
27	ESP	Europa	SRSSS	PGG3	RIF
28	ROU	Europa del Este	SSSSS	Haarlem	no
29	ESP	Europa	RSSSS	PGG3	no
30	ESP	Europa	SSSSS	LAM	STR
31	ESP	Europa	SSSSS	Haarlem	no
32	ESP	Europa	SSSSS	LAM	no
33	ESP	Europa	SSSSS	Haarlem	no
34	ESP	Europa	SSSSS	LAM	no
35	ESP	Europa	SSSSS	LAM	STR
36	ESP	Europa	SSSSS	LAM	STR
37	ESP	Europa	SSSSS	Haarlem	no
38	ESP	Europa	SSSSS	Haarlem	no
39	ESP	Europa	SSSSS	LAM	STR

	<b>País origen</b>	<b>Región</b>	<b>IRSEP</b>	<b>Linaje</b>	<b>R WGS</b>
<b>40</b>	ESP	Europa	SSSS-	LAM	no
<b>41</b>	ESP	Europa	SSSS	PGG3	no
<b>42</b>	GNQ	África Subsahariana	RRSRS	Haarlem	INH,RIF,EMB
<b>43</b>	GNQ	África Subsahariana	SSSS	LAM	STR
<b>44</b>	ESP	Europa	SSSS	PGG3	no
<b>45</b>	ESP	Europa	SSSS	PGG3	no
<b>46</b>	ND	ND	SSSS	Cameroon	no
<b>47</b>	ESP	Europa	SSSS	PGG3	no
<b>48</b>	ESP	Europa	SSSS	PGG3	no
<b>49</b>	ROU	Europa del Este	SSSS	PGG3	no
<b>50</b>	FRA	Europa	SSSS	PGG3	no
<b>51</b>	ESP	Europa	SSSS	Haarlem	no
<b>52</b>	ESP	Europa	SSSS	PGG3	no
<b>53</b>	CIV	África Subsahariana	SSSS	Ghana	no
<b>54</b>	CHN	Sudeste asiático	SSSS	Beijing	no
<b>55</b>	BGR	Europa del Este	SSSS	PGG3	no
<b>56</b>	ESP	Europa	SSSS	Haarlem	no
<b>57</b>	ESP	Europa	SSSS	Haarlem	no
<b>58</b>	RUS	Europa del Este	RRRRR	LAM	INH,RIF,STR,EMB
<b>59</b>	ESP	Europa	RRRSS	Beijing	INH,RIF,STR
<b>60</b>	PAK	Índico	SSRSS	Iran	no
<b>61</b>	ROU	Europa del Este	RSSSS	PGG3	INH
<b>62</b>	UKR	Europa del Este	RRRSS	Beijing	INH,RIF,STR,EMB

**N:** número de cepa secuenciada; **Ecuat:** ecuatorial; **IRSEP:** isoniácida, rifampicina, estreptomycin, etambutol, pirazinamida (se muestra su sensibilidad (S) o resistencia (R) fenotípica por ese orden); **INH:** isoniácida; **RIF:** rifampicina; **STR:** estreptomycin; **EMB:** etambutol; **PZA:** pirazinamida; **ND:** no disponible