



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**ENFERMEDADES CAUSADAS POR  
MICOBACTERIAS: ESTUDIO  
MICROBIOLÓGICO, EPIDEMIOLÓGICO Y  
MOLECULAR (2006-2015)**

Gema Barbeito Castiñeiras

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES  
EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA  
2019





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

ENFERMEDADES CAUSADAS POR MICOBACTERIAS: ESTUDIO MICROBIOLÓGICO, EPIDEMIOLOGICO Y MOLECULAR (2006-2015)

Dña. Gema Barbeito Castiñeiras

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 22 de julio de 2019*

Fdo Gema Barbeito Castiñeiras





## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

ENFERMEDADES CAUSADAS POR MICOBACTERIAS: ESTUDIO MICROBIOLÓGICO, EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR (2006-2015)

**Dra. María Luisa Pérez del Molino Bernal**, jefa de Servicio de Microbiología y Parasitología de la EOXI de Santiago de Compostela

**Prof. Dr. Benito José Regueiro García**, catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Gema Barbeito Castiñeiras**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 22 de julio de 2019*

Fdo. M<sup>a</sup> Luisa Pérez del Molino Bernal

Fdo. Benito José Regueiro García





## AUTORIZACIÓN DEL TUTOR DE LA TESIS

ENFERMEDADES CAUSADAS POR MICOBACTERIAS: ESTUDIO MICROBIOLÓGICO, EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR (2006-2015)

**Dña. María Alicia Carolina Estévez Toranzo**, catedrática del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMA:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Gema Barbeito Castiñeiras, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 22 de julio de 2019.*

Fdo. María Alicia Carolina Estévez Toranzo





La doctoranda, Gema Barbeito Castiñeiras, declara no tener ningún conflito de interés en relación con la tesis doctoral.

*En Santiago de Compostela., 22 de julio de 2019*



Fdo. Gema Barbeito Castiñeiras



**A Carmen y Martín**





## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera hacer constar mi más sincero agradecimiento por la dirección y horas de trabajo dedicadas a la realización de esta Tesis Doctoral a mis directores:

A la Dra. María Luisa Pérez del Molino Bernal, que me transmitió su pasión por el estudio de las micobacterias, su apoyo y ayuda inestimables.

Al Dr. Benito José Regueiro García, con quien me formé en Microbiología, por su confianza y apoyo incondicionales.

A la Dra. Alicia Estévez, tutora de esta Tesis Doctoral, por su amabilidad y ayuda.

Al Dr. José Costa y a la Dra. Amparo Coira, por su valiosa aportación a este trabajo.

A Luz Martínez, Mónica Manivesa y Teresa Valiño, el equipo técnico de la Unidad de Micobacterias. Por su excelente trabajo, su apoyo y haberse convertido en parte de mi familia.

A Isabel Martínez, maestra y amiga, que colaboró en el diseño de este trabajo.

A la Dra. Fernanda Pardo, por exigirme, enseñarme y darme su cariño.

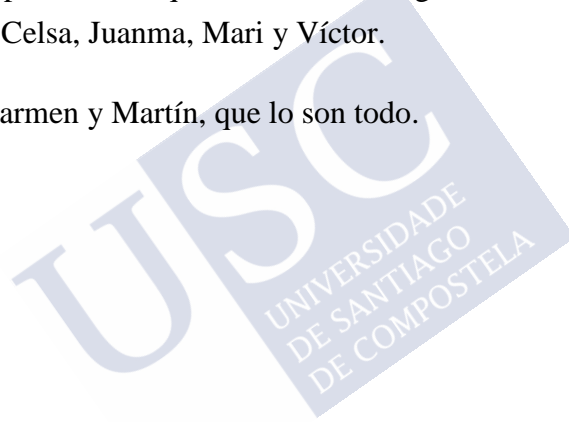
Al Dr. Jesús del Pozo, por sus valiosos consejos y creer en mí.

A mis compañeros Facultativos, Residentes, Técnicos e Investigadores del Servicio de Microbiología y Parasitología, por su ayuda y amistad. En particular al Dr. Javier Rodríguez y a la Dra. Rocío Trastoy, por brindarme siempre su colaboración.

A mis compañeros del grupo PROA, en especial a la Dra. María Jesús Domínguez y al Dr. Pedro Rascado, que siempre estuvieron a mi lado.

A mis amigos, que a lo largo de los años me han animado en todo momento. En especial a los que vivieron conmigo toda esta aventura: Alexia, Catuxa, Celsa, Juanma, Mari y Víctor.

A mis padres, Carmen y Martín, que lo son todo.



## ABREVIATURAS

Anyplex	Anyplex® MTB / NTM
	American Thoracic Society / Infectious Diseases
ATS/IDSA	Society of America
AUC	Área bajo la curva ROC
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
	BioGX <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex Open
BioGX	System Reagents™
CEI-SL	Comité de Ética de Investigación de Santiago – Lugo
DM	Diabetes Mellitus
DOR	Odds Ratio Diagnóstica
DS	Desviación estándar
DST	Estudio de sensibilidad
E	Etambutol
	Centro Europeo para Prevención y Control de
ECDC	Enfermedades
EH	Enfermedad de Hansen
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FQ	Fibrosis Quística
H	Isoniazida
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
LiPA	Line Probe Assay
LR-	Razón de verosimilitud para negativos
LR+	Razón de verosimilitud para positivos
LRMG	Laboratorio de Referencia de Micobacterias de Galicia
MALDI-	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of

TOF MS	Flight mass spectrometry
MDR	Multirresistente
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MTUC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
MUT	Mutantes
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGL-1	anticuerpos antiglicolípido fenólico-1
R	Rifampicina
RRDR	Región determinante de resistencia a rifampicina
S	Streptomycin
TB	Tuberculosis
TMM	Tratamiento Multimedamentoso
UTB	Unidad de Tuberculosis
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
WT	Wild-type
Xpert	Xpert MTB/RIF ®
Z	Pirazinamida

## Índice:

1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	23
2. OBJETIVOS .....	31
3. ESTUDIO GENOTÍPICO DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> COMPLEX RESISTENTE A ISONIAZIDA .....	35
3.1. Introducción .....	35
3.2. Material y métodos .....	37
3.2.1. Muestras clínicas .....	37
3.2.2. Identificación .....	38
3.2.3. Antibiograma .....	38
3.2.4. GenoType MTBDRplus assay .....	39
3.2.5. Análisis de los datos .....	40
3.3. Resultados .....	41
3.4. Discusión .....	43
4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS: ESTUDIO COMPARATIVO .....	55
4.1. Introducción .....	55
4.2. Material y métodos .....	56
4.2.1. Muestras clínicas .....	57
4.2.2. Procesamiento de las muestras .....	58
4.2.3. Identificación y estudio de sensibilidad .....	58
4.2.4. Anyplex® plus MTB/NTM assay .....	59
4.2.5. BioGX <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex Open System Reagents™ para BD MAX .....	60
4.2.6. Xpert® MTB/RIF RT-PCR .....	60

4.2.7. Diagnóstico clínico .....	61
4.2.8. Análisis de los datos .....	61
4.3. Resultados .....	62
4.3.1. Resultados tomando como referencia el cultivo .....	65
4.3.2. Resultados tomando como referencia el diagnóstico de enfermedad tuberculosa .....	66
4.4. Discusión .....	72
5. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO: ESTUDIO COMPARATIVO.....	83
5.1. Introducción .....	83
5.2. Métodos.....	85
5.2.1. Aislados clínicos .....	85
5.2.2. GenoType Mycobacterium CM/AS.....	86
5.2.3. MALDI-TOF MS: .....	86
5.2.3.1. Protocolo de extracción de proteínas.....	86
5.2.3.2. MALDI-TOF MS: análisis .....	87
5.2.4. Secuenciación parcial del gen <i>rpoβ</i> .....	88
5.2.4.1. Extracción de DNA .....	88
5.2.4.2. Amplificación del gen <i>rpoβ</i> .....	88
5.2.4.3. Secuenciación parcial del gen <i>rpoβ</i> .....	89
5.2.5. Análisis filogenético .....	90
5.2.6. Análisis estadístico .....	91
5.3. Resultados .....	91
5.3.1. GenoType® y secuenciación parcial del gen <i>rpoβ</i> .....	92
5.3.2. MALDI-TOF y secuenciación parcial del gen <i>rpoβ</i> .....	92
5.3.3. GenoType® y MALDI-TOF MS.....	93
5.4. Discusión.....	93

6. MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU RELACIÓN CON LA TUBERCULOSIS EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (2006-2015) .....	127
6.1. Introducción .....	127
6.2. Material y métodos .....	130
6.3. Resultados .....	132
6.4. Discusión .....	151
7. LEPRO EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA ...	163
7.1. Introducción .....	163
7.2. Material y métodos .....	166
7.3. Resultados / Casos clínicos.....	166
7.3.1. Caso 1 .....	167
7.3.2. Caso 2.....	168
7.3.3. Caso 3.....	169
7.3.4. Caso 4.....	170
7.3.5. Caso 5.....	170
7.4. Discusión .....	171
8. CONCLUSIONES.....	177
9. BIBLIOGRAFÍA .....	183
10. ANEXOS.....	211
10.1. ANEXO I: COMITÉ DE ÉTICA.....	213
11. INDICES COMPLEMENTARIOS.....	215
11.1. ÍNDICE DE FIGURAS .....	215
11.2. ÍNDICE DE TABLAS .....	219



# 1

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**





## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Mycobacterium* está formado en el momento actual por más de 200 especies distintas: *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M.bovis*, *M.africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* y *M. mungi*) (1), las micobacterias que causan la lepra (*M. leprae* y *M. lepromatosis*) (2), y las 197 especies de micobacterias no tuberculosas oficialmente reconocidas (3) .

Las infecciones por micobacterias constituyen un problema importante de Salud Pública en todo el mundo. Se clasifican etiológicamente en tres grupos: la tuberculosis (TB) producida por *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTUC), la lepra y las producidas por micobacterias no tuberculosas (MNT) (4,5).

La TB es una enfermedad infecciosa que todavía no ha podido ser erradicada ni controlada en el mundo. Actualmente continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial. Supone la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo, y se ha estimado que una tercera parte de la población está infectada. El correcto control de la enfermedad requiere un diagnóstico correcto y temprano; sin embargo, gran parte de los casos escapan a los programas de control de la tuberculosis, y a algunos pacientes no se les ha realizado ninguna prueba microbiológica, especialmente en los países con escasos recursos. Además precisa un estudio y tratamiento de los contactos, y reforzar el cumplimiento terapéutico (6).

La estrategia de control de la TB para los años 2006-2015 de la OMS (*The Stop TB Strategy*) tuvo como objetivos disminuir la prevalencia y la mortalidad a la mitad de las cifras alcanzadas en el año 1990 (7). A partir de ese momento, el objetivo marcado en la Asamblea Mundial de la Salud en mayo de 2014, busca eliminar la TB (*End TB Strategy*) y pretende reducir las muertes por TB en un 95% y reducir los nuevos casos un 90% entre 2015-2035 (8).

En las últimas dos décadas la tuberculosis con resistencia a fármacos se ha convertido en una amenaza y un reto para la salud pública mundial. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2017, 558.000 personas desarrollaron TB resistente a la rifampicina, fármaco que forma parte del tratamiento de primera línea. Además, el 82% de estas personas presentaron resistencia a múltiples fármacos. Tres países representaron casi la mitad de los casos: India (24%), China (13%) y Rusia (10%) (9).

El diagnóstico y el tratamiento de estas formas de tuberculosis es más complejo, y el pronóstico empeora a medida que aumenta el patrón de resistencias. El diagnóstico de la TB se basa en la clínica, las pruebas radiológicas y los estudios microbiológicos, siendo estos últimos imprescindibles para el diagnóstico de la TB resistente a fármacos (10,11). El diagnóstico microbiológico convencional se basa en la microscopía, el cultivo, las pruebas de sensibilidad a fármacos (métodos genotípicos y fenotípicos), y las técnicas de detección de ácidos nucleicos. Una de las claves para el control de la enfermedad tuberculosa es aumentar la rapidez en su diagnóstico, para romper la cadena de transmisión (con el aislamiento respiratorio del paciente, tratamiento adecuado y estudio de contactos) y evitar pruebas

diagnósticas (12). Esto es muy importante en la TB resistente a fármacos debido a sus implicaciones clínicas y epidemiológicas. Las técnicas de detección de ácidos nucleicos son una herramienta fundamental en el diagnóstico rápido de la TB, y de los casos de multirresistencia, con un análisis coste-efectividad adecuado incluso en áreas geográficas con una baja prevalencia de la enfermedad (13). La utilización de técnicas de diagnóstico rápido de detección de genes de resistencia a los fármacos antituberculosos requiere de un previo conocimiento de las resistencias a los antibióticos, en el área sanitaria de aplicación de la técnica, dado que tienen una distribución geográfica (14).

Las MNT son un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos ampliamente en la naturaleza, habiéndose descrito más de 196 especies (3) que pueden causar diversas infecciones en humanos, siendo la más frecuente la localización pulmonar. Suele aparecer en personas con factores predisponentes para la progresión de la enfermedad (15). Pese a que generalmente no se transmiten por vía aérea, se ha documentado transmisión aérea por *M. abscessus* ssp. *masiliense* en pacientes que asisten a la misma consulta de fibrosis quística; el brote se produjo a partir de un paciente bacilífero y se confirmó con análisis genético de las cepas (16). Presentan una variación geográfica en su distribución, condicionada por la capacidad de sobrevivir en determinadas condiciones ambientales y las posibilidades de identificación y aislamiento de los laboratorios locales, que se manifiesta también en las enfermedades que causan al ser humano (17).

La definición, diagnóstico y manejo de estas infecciones se rigen desde el año 2007 por el documento de la American Thoracic Society / Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA) (18). Los datos de prevalencia son limitados, dado que las pruebas de identificación y antibiograma no se realizan en todos los laboratorios de Microbiología y no son enfermedad de declaración obligatoria. Sin embargo, las tasas de infección por MNT parecen estar aumentando en muchas partes del mundo, estando su causa todavía sin esclarecer (19).

El interés de la comunidad científica ha crecido en los últimos tiempos, lo que ha permitido conocer diversos aspectos que pueden asociarse a las patologías que ocasionan y a sus factores de virulencia (20–22). De este modo, realizando una búsqueda por términos MeSH en Pubmed, siendo los descriptores “Atypical mycobacteria” y “non tuberculous mycobacteria”, observamos que en 1990 se encuentran 138 artículos, en el año 2005 son 370 artículos y en 2015 aparecen 583 (búsqueda realizada el 25 de marzo de 2019). En un documento del año 2014, con participación del Center for Disease Control (CDC), se trató de conocer la situación de las MNT entre los países europeos. Concluyen aconsejando la necesidad de centralizar en laboratorios de referencia el diagnóstico de las MNT, tras comprobar que la mayor parte no tienen los procedimientos diagnósticos optimizados para MNT y que probablemente su prevalencia esté infraestimada (19).

Tradicionalmente las micobacterias no tuberculosas se clasificaron según Runyon en aquellas de crecimiento rápido y lento. Actualmente, aunque esta clasificación puede servir de ayuda, necesitamos conocer la identificación a nivel de especie, y en algunos casos el estudio de

sensibilidad para llevar a cabo un tratamiento adecuado en los casos en los que es necesario (23).

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis* (2). En base a los datos recientemente publicados sobre los genomas de *M. leprae*, el descubrimiento *M. lepromatosis*, la evolución de los bacilos de la lepra y la evolución humana, es muy probable que estas bacterias hayan comenzado la evolución en humanos o en los primeros homínidos hace millones de años. Esto hace que la lepra probablemente sea la infección humana más antigua. La evolución adaptativa única probablemente ha moldeado el crecimiento indolente y la evasión de la defensa inmune humana que puede explicar la patogénesis de la lepra. Por lo que, la lepra puede verse como una consecuencia natural de un parasitismo prolongado (24).

Estas micobacterias patógenas no cultivables han experimentado una extensa evolución reductiva, con la mitad de su genoma ahora ocupado por pseudogenes. Usando genómica comparativa, se demostró que todos los casos existentes de lepra son atribuibles a un solo clon cuya diseminación en todo el mundo se puede remontar al análisis de polimorfismos de nucleótido único muy raros. La enfermedad parece haberse originado en África oriental o el Cercano Oriente y se propagó con sucesivas migraciones humanas. Los europeos o los norteafricanos introdujeron la lepra en África occidental y América en los últimos 500 años (25).

La lepra es una enfermedad tratable. En 1981, la OMS recomendó el tratamiento multimedicamentoso (TMM), que en la actualidad consiste en tres fármacos: dapsona, rifampicina y clofazimina (26). La aparición de resistencias bacterianas, hizo que en el año 2010 la OMS

estableciese nueve países en tres continentes (Colombia, Brasil, China, Pakistán, India, Myanmar, Filipinas, Vietnam, Yemen), como países centinelas, responsables del seguimiento de resistencia antimicrobiana (27). Las bases moleculares han llevado a los estudios del genoma de *Mycobacterium leprae* que han evidenciado las mutaciones responsables de la resistencia (28).

En marzo de 2017, el Programa Mundial contra la Lepra publicó su *Estrategia Mundial para la lepra 2016-2020 - Guía de monitoreo y evaluación*. Este Programa Mundial está asumiendo el liderazgo de la expansión de la red de vigilancia de la farmacoresistencia de la lepra, definida por la *Estrategia Mundial contra la Lepra* como una intervención fundamental. También se ha publicado una guía para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en la lepra (29).

En 1981, La OMS declaró la lepra como problema de salud pública a nivel mundial y logro su eliminación en el año 2000 (definida como una prevalencia registrada de menos de 1 caso por 10.000 habitantes) lo cual representa una significativa reducción de la prevalencia de la enfermedad pero no su erradicación. El 94% de los pacientes con lepra notificados en el 2014 se ubicaron en 13 países: Bangladesh, Brasil, República Democrática del Congo, Etiopía, India, Indonesia, Madagascar, Myanmar, Nepal, Nigeria, Filipinas, Sri Lanka y la República Unida de Tanzania (OMS). En 2016 la OMS presentó su *Estrategia mundial para la lepra 2016–2020: acelerar la acción hacia un mundo sin lepra*. La estrategia se centra en evitar las discapacidades, especialmente entre los niños (30).

2

## **OBJETIVOS**





## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es conocer las características microbiológicas, clínicas y epidemiológicas de las enfermedades causadas por micobacterias en el área sanitaria de Santiago de Compostela.

Como objetivos específicos estudiaremos las resistencias y el diagnóstico molecular de la tuberculosis, la identificación de las MNT y su relación con la TB, y el estado actual de la lepra.

Este estudio recibió la aprobación del Comité de Ética de Investigación de Santiago – Lugo (CEI-SL) en la reunión del 19 de julio del año 2016, con código de registro 2016/367 (Anexo 1). Las tablas y figuras que han sido adaptadas cuentan con la aprobación de las editoriales Springer y Elsevier.



# 3

## **ESTUDIO GENOTÍPICO DE *Mycobacterium tuberculosis* complex RESISTENTE A ISONIAZIDA**

Pérez del Molino ML, Barbeito-Castiñeiras G, Mejuto B, Alonso P, Fernández A, González-Mediero G, et al. *The genotypic study of Mycobacterium tuberculosis complex resistant to isoniazid: Galicia, Spain (2008–2013)*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35(11).



### **3. ESTUDIO GENOTÍPICO DE *Mycobacterium tuberculosis* complex RESISTENTE A ISONIAZIDA**

Pérez del Molino ML, Barbeito-Castiñeiras G, Mejuto B, Alonso P, Fernández A, González-Mediero G, et al. The genotypic study of *Mycobacterium tuberculosis* complex resistant to isoniazid: Galicia, Spain (2008–2013). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(11).

#### **3.1. Introducción**

El último informe mundial sobre tuberculosis de la OMS, estima en el año 2014 9,6 millones de casos nuevos y 1,5 millones de muertes debidas a esta enfermedad. Globalmente estima que el 3,5% nuevos casos y 20,5% de los casos previamente tratados son de tuberculosis multirresistente, causados por cepas resistentes al menos a isoniazida y rifampicina (MDR)(6).

La isoniazida y la rifampicina son los fármacos básicos en el tratamiento de la TB, habiéndose asociado una respuesta pobre al tratamiento de primera línea en pacientes infectados por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex con resistencia a isoniazida o multirresistentes(31)(32). La detección de estas cepas es prioritario para el control de la enfermedad.

La Consellería de Sanidade en Galicia, creó en 1994 el Programa Gallego para la Prevención y Control de la Tuberculosis, y con su

desarrollo se ha conseguido una disminución de la incidencia de 72,9 casos por 100.000 habitantes en 1996 a 21,2 por 100.000 habitantes en 2013 (33)(34). Uno de los objetivos de este programa, ha sido el control de la tuberculosis resistente a fármacos; el Laboratorio de Referencia de Micobacterias de Galicia (LRMG) (34), se creó en 1998 y cumple todos los controles de calidad establecidos por la OMS para el estudio de resistencias. Galicia está incluida en el Proyecto Global de la OMS/ Unión Internacional Frente a la Tuberculosis y la Enfermedad Pulmonar en Vigilancia de resistencias a fármacos antituberculosos (WHO/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on AntiTuberculosis Drug Resistance Surveillance) (35)(36). Desde el año 2004, se realizó estudio de sensibilidad a fármacos de 1º línea (DST) a todas las cepas aisladas en Galicia. Los casos de resistencia a isoniazida y MDR son regularmente revisados, evaluados y controlados por la Comisión Gallega para la Evaluación y Control de la Tuberculosis Resistente (34).

Es importante para el tratamiento y estudio de contactos, fundamentalmente en los casos de MDR, que los clínicos tengan los datos de sensibilidad a fármacos lo más precozmente posible. EL DST requiere 4 semanas aproximadamente para generar resultados. La implantación y difusión de sistemas rápidos de detección de las mutaciones de resistencia más frecuentes en *M. tuberculosis* complex a isoniazida (H) y rifampicina (R), nos ha hecho plantearnos el conocimiento de la distribución de éstas en Galicia, dada la variabilidad geográfica descrita para la frecuencia de mutaciones, especialmente en isoniazida; las mutaciones en el codón 315 del gen *katG* (*katG315*) ocurren en un 50-95% (37)(38), y el 20-42% de las

cepas resistentes a H tienen mutaciones en la región promotora del gen *inhA* (37)(39).

### **3.2. Material y métodos**

Estudio de prevalencia transversal realizado entre los años 2008 a 2013 en Galicia, en el Noroeste de España (área 29574,4 km<sup>2</sup>, población 2.748.695 habitantes en el año 2014).

En Galicia, durante el periodo 2008-2013, se diagnosticaron 4.519 casos de tuberculosis (33,67% extrapulmonares). De estos 4.519 casos, 2.993 presentaron cultivo positivo.

En el año 2014 la proporción de la coinfección entre tuberculosis y Virus de la Inmunodeficiencia Humana fue del 4,6 %, y del 1,5% en usuarios de drogas. Los inmigrantes de países con alta endemia de tuberculosis representaron un 5,2% de los casos (34).

#### **3.2.1. Muestras clínicas**

Las muestras clínicas se procesaron siguiendo el método N-acetil-L-cisteína-NaOH con una concentración final de NaOH del 1% (BBL MycoPrep, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). El sedimento se suspendió en 2 ml de tampón fosfato estéril de pH 6,8. Se preparó una extensión para visualización de bacterias ácido-alcohol resistentes mediante tinción de auramina, y se inoculó en medios de cultivo sólido (Coletsos ®, bioMérieux, Francia) y líquido en tubos MGIT 960 (Becton Dickinson, Estados Unidos). Los cultivos en medio sólido se revisaron una vez por semana durante ocho semanas, y los tubos

MGIT se incubaron durante cuarenta y cinco días en el Bactec MGIT 960 a 37°C.

### **3.2.2. Identificación**

Todas las cepas de este estudio fueron identificadas mediante el GenoType Mycobacterium CM assay VER 1.0 (Hain Lifescience, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante (40).

Se realizó extracción de ácidos nucleicos mediante el método ultrasónico, seguido de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un tramo del gen 23S ARNr. La hibridación reversa y la detección se llevaron a cabo en un baño con agitación (TwinCubator®, Hain Lifescience, Nehren, Alemania). La identificación final se obtuvo por comparación de los patrones de bandas con la hoja de evaluación incluida.

### **3.2.3. Antibiograma**

Se realizó el antibiograma de primera línea en el Laboratorio de Referencia de Micobacterias de Galicia (Santiago de Compostela), mediante el sistema BACTEC MIGIT 960, a todas las cepas aisladas en Galicia durante el periodo de estudio (2.993 cepas). Se estudiaron las concentraciones críticas estándar de 0,10 µg/mL en isoniazida (H), 1,0 µg/mL en rifampicina (R), 1,0 µg/mL en estreptomycin (S), 5,0 µg/mL en etambutol (E) y 100 µg/mL para pirazinamida (Z). En todos aquellos casos en los que se detectó resistencia a H, se realizó el estudio a la concentración de 0,4 µg/mL, para determinar las cepas con alto nivel de resistencia.

En las cepas con resistencia al menos a isoniazida se realizó estudio genotípico mediante el sistema GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Alemania).

#### 3.2.4. GenoType MTBDRplus assay

El ensayo GenoType MTBDRplus assay para la detección de mutaciones asociadas con resistencia a H y R en *rpoβ*, *katG* e *inhA* en los nuevos aislamientos en cultivo de *M.tuberculosis* complex, se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (41)(42). Se amplificaron mediante PCR multiplex los genes *rpoβ*, *katG* e *inhA*, y los amplicones obtenidos marcados con biotina fueron hibridados a sondas de ADN unidas a tiras de membrana. La hibridación se detectó con la adición de un conjugado estreptavidina/ fosfatasa alcalina y una reacción de tinción mediada por fosfatasa alcalina.

Para cada gen, el GenoType MTBDRplus detecta la presencia de las sondas llamadas wild-type (WT) y mutantes (MUT). Las sondas WT comprenden las áreas más importantes de resistencia de los respectivos genes, y las sondas MUT algunas de las mutaciones de resistencia más frecuentes.

En la misma prueba, se puede realizar la identificación de especie. La zona TUB hibrida con los amplicones generados por *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Las sondas de ADN incluyen: ocho sondas *rpoβ* WT, cuatro *rpoβ* MUT (con las mutaciones D516V , H526Y , H526D y S531L ), una *katG* WT , dos *katG* MUT (con las mutaciones S315T1 y S315T2),

dos *inhA* WT y cuatro MUT *inhA* (con las mutaciones C15T, A16G, T8C, y T8A).

La sensibilidad a H y R se definió como la hibridación con todas las sondas WT y la no hibridación con las sondas MUT. Una cepa que hibrida tanto con una sonda MUT y su correspondiente sonda WT se considera que representa una población heterogénea de bacterias o una infección mixta de una cepa sensible y una resistente.

En aquellos casos en los que hubo discrepancias entre el estudio fenotípico de sensibilidad y el resultado del GenoType MTBDRplus assay, se resolvió repitiendo el antibiograma mediante un método fenotípico diferente. El instrumento MGIT 960 equipado con el software informático TB eXIST se empleó para establecer un estudio de sensibilidad cuantitativo para *M. tuberculosis*. Este método combina los puntos finales de proporción y concentración con la monitorización continua del crecimiento bacteriano (43).

### **3.2.5. Análisis de los datos**

Los datos para el estudio se almacenaron mediante el programa Microsoft Excel (2010) y la plataforma Windows 7 (Microsoft Corporation, Estados Unidos), el análisis estadístico se realizó con el programa R (R Core Team, 2015).

Los resultados se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes dado que son variables cualitativas. Las posibles diferencias de distribución en el patrón de resistencias entre las cepas de alta y baja resistencia a isoniazida se analizan empleando  $\chi^2$ .

### 3.3. Resultados

Durante el periodo de este trabajo (2008-2013) se realizó estudio de sensibilidad fenotípico a 2.993 cepas de *M. tuberculosis* complex. Como se muestra en la Tabla 1, se identificaron un 3,64 % (109/2.993) de cepas resistentes a H, siendo un 0,43% (13/2.993) resistentes a isoniazida y rifampicina (MDR). El patrón de resistencias obtenido mediante estudio fenotípico de las 96 cepas que presentan resistencia a H (no MDR) revela 57 cepas con monorresistencia a H, 31 con resistencia a H / S y 8 con otros patrones. Las resistencias fenotípicas en las 13 cepas MDR se distribuyen en 4 cepas con resistencia H y R; 3 cepas a H, R y E; 2 cepas a H, R, S, E y Z; 1 cepa a H, R, S y E; y 1 cepa H, R, S y Z.

El análisis genotípico de las cepas mediante el test MTBDRplus se realizó en las 109 cepas y presentaron distintos patrones. De las 96 cepas con resistencia a H-no MDR, 36 (37,50 %) presentaba genotipo salvaje, 34 (35,42 %) mutaciones en *katG* y 26 (27,08 %) mutaciones en el promotor *inhA*. (Tabla 2).

El estudio genotípico revela mutaciones en las cepas 13 cepas MDR (Tabla 3). Todas presentan mutaciones en *rpoβ*, 5 en *inhA* y en *katG* hallamos 8 cepas con mutación y una con delección. Solamente una de las trece cepas presenta una doble mutación que afecta a *katG* y a *inhA*.

El test detectó 15 patrones diferentes en las 109 cepas estudiadas: cepas sin mutación (n=36); mutación solamente en *katG* (n=34); 5 patrones diferentes en cepas con mutación en *katG*, *inhA* negativa, *rpoβ* positiva (n=7); 1 cepa con mutación en *katG*, *inhA* y *rpoβ*; 1

cepa con delección en *katG*, *inhA* negativa y mutación en *rpoβ*; 3 patrones diferentes en cepas con mutación solamente en *inhA* (n=26) y 3 patrones diferentes en cepas con mutación en *inhA* y *rpoβ* (n=4).

En el gen *katG* se detectó mutación en el codón 315 en 42 (38,53%) de las cepas estudiadas, y una delección. De estas cepas 9 son MDR, 8 con mutación (19,05%) más aquella en la que se detectó la delección.

En la región del promotor de *inhA*, de las 31 cepas que presentaron mutación, 29 (93,55%) estaban localizadas en la posición C15T, correspondiendo 5 (22,73%) a cepas MDR. En las cepas resistentes a H no MDR encontramos 2 cepas, con otras mutaciones en el promotor *inhA*, una T8C y una T8A.

Las mutaciones en *rpoβ* en las 13 cepas MDR se muestran en la Tabla 3, siendo la más frecuente la mutación S531L, que aparece en 6 (46,15%).

Encontramos resistencia de alto nivel a H en 73 de las 109 cepas (66,97%) que presentaron resistencia a H. Mediante el test genotípico se detectaron en 43 cepas (58,90%) mutación o delección del gen *katG*, y en 8 cepas (26,66%) en la región del promotor de *inhA*.

La resistencia de alto nivel a H aparece en 9 (69,23%) de las cepas MDR, de las cuales 8 presentan mutación en *katG* y una delección en *katG* y mutación en *inhA*. Las cuatro cepas MDR restantes presentan resistencia de bajo nivel a isoniazida y solamente mutación en *inhA*. (Tabla 3).

Entre las cepas con alta resistencia a isoniazida 64 son no MDR. En la Tabla 4 se muestran las mutaciones en éstas, y se observa que 34

(53,13%) presentaban mutaciones en *katG* (S315L), 8 (12,5%) en el promotor *inhA* (C15T) y 22 (34,38%) eran WT.

Las diferencias de distribución en el patrón de resistencias entre las cepas de alta y baja resistencia se analizó empleando  $\chi^2$ , hallando diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de cepas que presentan mutación en *katG* ( $p=0,007$ ) y en cepas Wild Type ( $p=0,040$ ). No se hallaron diferencias en la distribución de *inhA* ( $p=0,406$ ).

Los resultados obtenidos en el estudio de estreptomicina, muestran 31 cepas resistentes a H y S no MDR, que representan el 1,04% de las 2.993 cepas estudiadas, se muestran en la Tabla 5. El estudio genotípico muestra 12 cepas con mutaciones en *katG* 315 (38,71 %), 13 (41,94 %) con mutaciones en *inhA* (11 C15T, 1 T8C, 1 T8A), y 6 (19,35 %) con WT.

Las cepas MDR resistentes a S son 6, representando un 0,20 % de las cepas estudiadas, y el 46,15 % de las cepas MDR. De estas seis cepas, 4 presentan mutaciones en *katG* (S315T), 1 mutación en *inhA* (C15T), 1 mutación en *katG* (S315T) e *inhA* (C15T) y ninguna presenta genotipo salvaje. En *rpoβ* hay mayor heterogeneidad en el estudio de las seis cepas: 2 cepas (33,33 %) presentaron la mutación S531L.

### 3.4. Discusión

El Proyecto Mundial sobre la vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos, sigue siendo el proyecto más antiguo y

más grande sobre la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (44).

Este proyecto ha permitido la publicación de una serie de estudios globales desde 1994 a 2014, describiendo la distinta distribución geográfica y detectando zonas con graves problemas en relación a la tuberculosis multirresistente (informes OMS). España, y Galicia en concreto, se considera un área de bajas resistencias, no superando el 0,5 % de casos de tuberculosis multirresistente en los años del estudio, incluyendo los casos nuevos y los previamente tratados. Los datos de la OMS tratan esta cifra de MDR entre un 3,5 y un 20,5%, a nivel mundial (35,44,45).

La confirmación de la TB y de la farmacorresistencia es fundamental para que las personas con posible enfermedad tuberculosa sean tratadas correctamente. En 2014, el 58% de los 4,9 millones de casos de TB notificados en el mundo se confirmaron bacteriológicamente mediante pruebas recomendadas por la OMS, entre ellas pruebas de diagnóstico rápido como GenXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Estados Unidos) y GenoType MTBDRplus assay(6).

En Galicia, con una clara disminución de la incidencia de tuberculosis en la última década, el porcentaje de cepas resistentes a isoniazida parece mostrar un ligero aumento desde el inicio del estudio en el año 2008 con un 2,60% y en 2013 el 4,65%. Sería interesante disponer de mayor tamaño muestral para analizar esta tendencia mediante un test estadístico, ya que en este momento no tendría potencia suficiente.

La sensibilidad del test Genotype MTBDRplus, comparado con la técnica fenotípica, es del 72,48%, siendo de un 62,5% para las cepas resistentes a isoniazida no MDR y del 100% para las cepas MDR. Estos resultados de baja sensibilidad son comparables con estudios previos publicados, donde las cepas de nuestra área se encuentran en el umbral inferior de los niveles de sensibilidad para cepas no MDR y en el umbral más alto para las cepas MDR (46,47).

Observamos diferencias en los valores predictivos del test Genotype MTBDRplus entre cepas resistentes a H no MDR y aquellas MDR, siendo este dato muy importante a la hora de aplicarlo en la práctica clínica. Otros estudios documentan que ambas pruebas diagnósticas, Genotype MTBDRplus y GenXpert, presentan variaciones en la sensibilidad y en la especificidad según la región geográfica (48).

No podemos evaluar la especificidad de la determinación para la isoniazida, puesto que solamente se realizó en muestras que presentaban resistencia al fármaco en el estudio fenotípico. En el caso de la rifampicina, la sensibilidad y la especificidad fueron del 100%, se clasificaron correctamente todas las cepas.

Las mutaciones en la región del promotor *inhA* raramente suponen más del 20% (49). En nuestra región la mutación C15T en la región del promotor *inhA*, es ligeramente superior, aparece en el 26,60% del total de cepas; 22,92% de las cepas resistentes a isoniazida no MDR, y en el 30,77% de las cepas MDR. Este mayor porcentaje en cepas TB MDR está en consonancia con trabajos previamente publicados; Estudios realizados en Western Cape Province, Suráfrica encuentran un 30% en las cepas monoresistentes a H, 48% en las MDR y un 85 %

en las extremadamente resistentes (50). Debemos tener en cuenta que las mutaciones en *inhA* pueden estar asociadas a resistencia a etionamida (62%), fármaco que se emplea en la segunda línea de tratamiento de la TB. La mutación que ocurre de modo más común en *inhA* es la C15T, en nuestro estudio representa el 93,55%, y se ha encontrado más frecuentemente asociada con cepas no MDR (51).

La prevalencia de mutaciones en *katG* difiere en los distintos países estudiados, oscilando entre 30% al 95%; en nuestra serie es del 40,37%. La mutación S315T es la más frecuente; en nuestro estudio aparece en el 61,54% de las cepas MDR y sólo en el 34,38 % de las resistentes a H no MDR (52).

La mutación S531L en la región hot-spot del gen *rpoβ* se detectó en el 46,15% de las cepas resistentes a rifampicina, mutación descrita como más frecuente en trabajos previos (53).

Está documentado que la resistencia a isoniazida se asocia más frecuentemente a mutaciones en *katG* 315, y a multiresistencia, mientras que las mutaciones en *inhA* son menos frecuentes y se asocian con resistencia a estreptomycinina (37). En nuestro estudio, las cepas que presentan resistencia a isoniazida y estreptomycinina, y no a rifampicina, presentan un porcentaje de mutaciones semejante en *katG* (38,71%) e *inhA* (41,9%).

Sin embargo en las cepas MDR con resistencia a estreptomycinina, el 83,33% presentan mutaciones en *katG*, y un 33,33% a *inhA*, habiendo solamente una cepa con alteraciones en *inhA* y no en *katG* (41).

El hecho de que en nuestro estudio el test Genotype MTBDRplus no detecte el 37,50 % de las cepas resistentes a isoniazida no MDR

refleja la complejidad de la detección de la resistencia a este fármaco. Otros genes incluyendo *kasA*, *ahpC*, *ndh* y la región intragénica *ahp-oxvR* se han asociado con resistencia a isoniazida, pero el impacto de esta resistencia en aislamientos clínicos es desconocida (53–55). Igualmente encontramos que la resistencia a isoniazida asociada a mutaciones es menos común en las cepas no MDR (56).

En nuestro estudio todas las cepas no MDR presentaron una sola mutación, y sólo una de las cepas MDR presentó simultáneamente mutación en *katG* (S315T1) y en *inhA* (C15T). Esto coincide con lo publicado previamente, que refiere una relación negativa entre mutaciones en *katG* y en *inhA* en posible relación con la presión selectiva frente a mutantes en las dos regiones (37,50). Respecto a nuestra área sanitaria, el test Genotype MTBDRplus no puede reemplazar el estudio fenotípico de sensibilidad convencional. A la limitación de los genes estudiados, se une que la sensibilidad obtenida para las cepas resistentes a isoniazida no MDR es baja, debido a la presencia de cepas con genotipo salvaje y a la existencia de asociación estadística de estas cepas con la resistencia a alta concentración. Creemos que sería necesario advertir desde el Servicio de Microbiología a los clínicos si esta prueba diagnóstica se utiliza sobre muestras directas.

El test MTBDRplus assay es una herramienta muy útil para la detección de rutina de resistencias a isoniazida y rifampicina, que ayuda a la optimización del tratamiento en los pacientes. Esto es especialmente importante en el caso de las cepas MDR, que se asocian con peor evolución en los pacientes que presentan retraso diagnóstico,

y en los que tienen alta carga bacteriana, para la prevención de transmisión de estas cepas resistentes (37).

Tabla 1. Resistencia de *M. tuberculosis* complex a los fármacos de primera línea, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016).

	FÁRMACO	CEPAS (n)	%
<b>SENSIBLE</b>	H	2884	96,36
<b>RESISTENTE (96-2993) (3,21%)</b>	H*	57	1,91
	HS	31	1,04
	HE	1	0,03
	HZ**	5	0,17
	HSZ	1	0,03
	HEZ	1	0,03
<b>MDR (13-2993) (0,43%)</b>	HR	4	0,14
	HRS	2	0,07
	HRE	3	0,10
	HRSE	1	0,03
	HRSZ	1	0,03
	HRSEZ	2	0,07
<b>TOTAL (109-2993) (3,64%)</b>		<b>2993</b>	<b>100%</b>

\* No disponibles los resultados de Z en dos cepas

\*\* 2 cepas *Mycobacterium bovis*; 2 cepas *Mycobacterium bovis* BCG

Tabla 2. Distribución anual de la resistencia a isoniazida en relación al ensayo GenoType MTBDRplus, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016).

Año	CEPAS (n)	CEPAS RESISTENTES H (n-%)	Genotype MTBDRplus		
			<i>KatG</i> S315L	<i>InhA</i> C15T	Wild Type
2008	578	13 - 2,25%	5	2	6
2009	536	18 - 3,36%	8	7	3
2010	531	19 - 3,58%	5	5	9
2011	478	16 - 3,35%	4	5*	7
2012	461	11 - 2,39%	4	2**	5
2013	409	19 - 4,65%	8	5	6
<b>TOTAL</b>	<b>2993</b>	<b>96- 3,21%</b>	<b>34-35,42%</b>	<b>26-27,08%</b>	<b>36-37,50%</b>

\* 1 mutación, T8C

\*\* 1 mutación, T8A

Tabla 3. Distribución anual de cepas multirresistentes en relación al ensayo GenoType MTBDRplus, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016).

AÑO	CEPAS (n)	RESISTENCIAS H & R (n-%)	ISONIAZIDA	Genotype MTBDRplus (n-%)		
			H 0,4 (µg/mL)	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>
2008	578	2 / 0,35%	R	S315T1	N	S531L
			R	S315T1	N	530-533
2009	536	2 / 0,37%	S	N	C15T	H526D
			R	Ausencia	N	526-529
2010	531	1 / 0,19%	R	S315T1	N	510-513
2011	478	2 / 0,42%	S	N	C15T	D516V
			S	N	C15T	S531L
2012	461	4 / 0,87%	R	S315T1	N	530-533
			R	S315T1	N	510-519
			R	S315T1	C15T	S531L
			S	N	C15T	S531L
2013	409	2 / 0,49%	R	S315T1	N	S531L
			R	S315T1	N	S531L
<b>TOTAL</b>	<b>2993</b>	<b>13</b>	<b>9 / 69,23%</b>	<b>9 / 69,23%</b>	<b>5 / 38,46%</b>	<b>13 / 100%</b>

Tabla 4. Distribución anual de las cepas con alto nivel de resistencia a isoniazida con relación al ensayo GenoType MTBDRplus. 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016).

AÑO	CEPAS (n)	CEPAS RESISTENTES H (0, 4%) (n-%)	Genotype MTBDRplus (n-%)		
			<i>katG</i> S315L	<i>InhA</i> C15T	Wild Type
2008	578	10-1,73%	5	0	5
2009	536	12-2,39%	8	2	2
2010	531	14-2,64%	5	4	5
2011	478	8-1,67%	4	1	3
2012	461	6-1,30%	4	0	2
2013	409	14-3,42%	8	1	5
TOTAL	2993	64-2,14%	34-53,13%	8-12,5%	22-34,38%

Tabla 5. Distribución anual de cepas no MDR resistentes a isoniazida y rifampicina en relación al ensayo GenoType MTBDRplus, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016)

AÑO	CEPAS (n)	CEPAS RESISTENTES H & S (n-%)	Genotype MTBDRplus		
			<i>katG</i>	<i>inhA</i>	Wild Type
2008	578	7 - 1,21 %	4	0	3
2009	536	7 - 1,31 %	4	2	1
2010	531	4 - 0,75 %	1	2	1
2011	478	5 - 1,05 %	0	4*	1
2012	461	2 - 0,43 %	1	1**	0
2013	409	6 - 1,47 %	2	4	0
TOTAL	2993	31 - 1,04 %	12-38,71%	13-41,94%	6-19,35%

\* 1 mutación, T8C , \*\* 1 mutación, T8A



# 4

## **TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS: ESTUDIO COMPARATIVO**



## 4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS: ESTUDIO COMPARATIVO

### 4.1. Introducción

En Galicia, en el año 2017 la incidencia de la tuberculosis fue de 19,5 casos por 100.000 habitantes. El 50% de los pacientes presentó un retraso diagnóstico de 50 días, siendo de 61 días en el caso de las tuberculosis pulmonares bacilíferas. Las consecuencias son especialmente negativas en este último caso debido al alto riesgo de transmisión en la comunidad y por la incapacidad e incluso fallecimiento del paciente (57).

Son necesarias nuevas herramientas diagnósticas para identificar de modo más rápido y mejorar la precisión del diagnóstico de tuberculosis. Las pruebas microbiológicas convencionales, la baciloscopia y el cultivo, son los métodos estándar de diagnóstico; las pruebas moleculares se consideran diagnósticos alternativos para complementarlos e intentar mejorar sus limitaciones (58).

El diagnóstico molecular directo de *Mycobacterium tuberculosis* complex se basa en la amplificación de fragmentos genéticos específicos en las muestras clínicas. El principal interés de estas técnicas es el diagnóstico rápido de enfermedad tuberculosa con una sensibilidad superior a la baciloscopia, considerada la técnica rápida de referencia (59). Además, tienen el valor añadido de que pueden

discernir a los pacientes con baciloscopia positiva en enfermedad causada por *M.tuberculosis* complex de las micobacterias no tuberculosas (60).

La información aportada por las técnicas moleculares se emplea junto con los datos clínicos en la decisión de iniciar el tratamiento antituberculoso, y para valorar el inicio de los estudio de contactos (60).

El objetivo de este estudio es evaluar la detección directa de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante el uso de tres técnicas comercializadas que emplean la PCR a tiempo real. Dos de ellas tienen lugar en plataformas completamente automatizadas: Xpert MTB/RIF (Cepheid, Estados Unidos) y BioGx *Mycobacterium tuberculosis* Complex Open System Reagents for BD MAX™ (BioGx, Estados Unidos). La tercera técnica emplea un sistema manual para la extracción de ácidos nucleicos y un termociclador para PCR a tiempo real: Anyplex ® MTB/NTM (Seegene, Corea del Sur).

## **4.2. Material y métodos**

Estudio de validación de pruebas diagnósticas realizado entre los años 2013 a 2015 en el área sanitaria de Santiago de Compostela (448.608 habitantes en el año 2015), con una prevalencia media de enfermedad tuberculosa de 17,28 casos por 100.000 habitantes.

Evalúamos tres ensayos moleculares comerciales para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* complex a partir de muestras clínicas: Anyplex ® MTB/NTM (Seegene, Corea del Sur), Xpert MTB/RIF (Cepheid, EEUU) y BioGx *Mycobacterium tuberculosis* Complex Open System Reagents® para BD MAX (BioGx, EEUU).

Anyplex® MTB / NTM (Anyplex) está diseñado para detectar *M.tuberculosis* complex con la diana de los genes IS6110 y MPB64, mientras que para la detección de micobacterias no tuberculosas se basa en la amplificación y detección de una sección del gen 16S ARNr (61).

Xpert MTB/RIF® (Xpert) se diseñó para amplificar una secuencia del gen *rpoB* específica para *M. tuberculosis* complex y para investigar mutaciones en la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR). Se trata de una PCR semianidada, que minimiza la detección cruzada de micobacterias no tuberculosas y maximiza la detección de resistencias (62).

BioGX *Mycobacterium tuberculosis* Complex Open System Reagents™ para BD MAX (BioGX) tiene como diana la secuencia de inserción IS6110 de *M. tuberculosis* complex y un control interno, para extracción y amplificación, de *Drosophila* por lo que no requiere adición de control interno.

#### **4.2.1. Muestras clínicas**

En este estudio, se recogieron 111 muestras de esputo procedentes de la práctica clínica habitual entre los años 2013-2015, en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Las muestras pertenecen a pacientes con sospecha de enfermedad tuberculosa respiratoria según criterios clínicos. Los pacientes que ya estaban recibiendo un régimen antituberculoso no fueron excluidos del análisis.

#### **4.2.2. Procesamiento de las muestras**

Las muestras clínicas se procesaron siguiendo el método N-acetil-L-cisteína-NaOH con una concentración final de NaOH del 1% (BBL MycoPrep, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). El sedimento se suspendió en 2 ml en fosfato estéril de pH 6.8. Se preparó una extensión para visualización de bacterias ácido-alcohol resistentes mediante tinción de auramina, y se inoculó en medios de cultivo sólido (Coletsos®, bioMérieux, Francia) y líquido en tubos MGIT 960 (Becton Dickinson, Estados Unidos). Los cultivos en medio sólido, incubados en estufa a 37°C se revisaron una vez por semana durante ocho semanas, y los tubos MGIT se incubaron durante cuarenta y cinco días en el Bactec MGIT 960 a 37°C. El resto del sedimento de estas muestras, que constituyó la muestra para realización de estudios moleculares se inactivó a 100°C durante 60 minutos y se conservó a -80 °C.

#### **4.2.3. Identificación y estudio de sensibilidad**

A todas las muestras que presentaron cultivo positivo se les realizó identificación mediante GenoType Mycobacterium ® (Hain Lifescience, Nehren, Alemania), una técnica de Line Probe Assay (LiPA) y reducción de nitratos.

GenoType® realiza una amplificación específica de una secuencia de ARNr 23S e hibridación posterior en fase sólida con sondas genéticas inmovilizadas sobre tiras de nitrocelulosa. La hibridación se hace evidente mediante revelado enzimático.

Para este estudio empleamos tres presentaciones de este ensayo: Mycobacterium CM VER 1.0®, que identifica las 17 especies aisladas

con mayor frecuencia (de las cuales 6 necesitan estudios complementarios); Mycobacterium AS VER 1.0®, que identifica de manera adicional 17 especies menos frecuentes (y dos de las 6 micobacterias que necesitan estudios complementarios mediante el Mycobacterium CM VER 1.0®); y Mycobacterium MTBC VER 1.X®, que identifica las cinco especies de *M.tuberculosis* complex, dos subespecies de *M.bovis* y la cepa vacunal BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). El ensayo GenoType® se realizó de acuerdo con las instrucciones facilitadas por el fabricante (63–65).

A todas las muestras se les realizó estudio de sensibilidad según el protocolo del centro (14).

#### **4.2.4. Anyplex® plus MTB/NTM assay**

El ensayo molecular Anyplex® MTB / NTM se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (61).

La solución de extracción (DNA extraction solution, Seegene, Seúl, Corea) se añadió a las muestras clínicas tras el proceso de descontaminación y concentración. A continuación las muestras se calentaron en un bloque térmico a 100 °C durante una hora y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se emplearon 5 µl del sobrenadante de cada muestra a los que se añadieron 15 µl de la mezcla de reacción de Anyplex. En cada uno de los ensayos se emplearon los controles incluidos en el kit, de amplificación (positivo y negativo), y control interno para detectar posibles inhibiciones. La reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo en el instrumento CFX96™ (Bio-Rad, Berkeley, California). El análisis de los resultados se realizó mediante el software del instrumento según los

valores umbral y de corte proporcionados por el fabricante previa revisión y validación de las curvas obtenidas.

#### **4.2.5. BioGX *Mycobacterium tuberculosis* Complex Open System Reagents™ para BD MAX**

La técnica BioGX *Mycobacterium tuberculosis* Complex Open System Reagents™ para BD MAX se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (66).

Empleamos el kit de extracción BD MAX™ ExK™ DNA-1. Se añadieron 200 µl de la muestra pretratada al tubo de muestras, y se procedió a realizar agitación en vórtex durante 3 segundos antes de colocarlos en la gradilla de extracción. A continuación se colocaron los tubos con reactivos liofilizados en la gradilla. En la posición uno se colocó el tubo de extracción Snap one BD MAX™ ExK™ DNA para cada muestra. En segundo lugar el tubo con la mezcla de PCR liofilizado BioGX Sample-Ready™, y en la posición 3 el tubo para rehidratar (BioGX Rehydration Buffer). Se colocaron la gradilla y la tarjeta en el instrumento, seleccionando el programa recomendado para esta determinación. Los resultados se interpretaron con el software del instrumento tras la revisión y validación de las curvas obtenidas.

#### **4.2.6. Xpert® MTB/RIF RT-PCR**

El ensayo Xpert® MTB/RIF se realizó siguiendo las indicaciones descritas en la literatura (62).

Se añadió el reactivo de muestra en una proporción de 3: 1 a al menos 0,5 ml de muestra procesada previamente para estudio

molecular. El tubo cerrado se agitó manualmente dos veces durante un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente antes de transferir 2 ml de la mezcla reactivo-muestra inactivada al cartucho Xpert. Los cartuchos se insertaron en el dispositivo GenXpert, y el análisis de los resultados se realizó automáticamente mediante el software del instrumento.

#### **4.2.7. Diagnóstico clínico**

Tomamos como criterio el diagnóstico que figura en la historia clínica del paciente, que aúna los criterios clínicos, microbiológicos y radiológicos de enfermedad (67).

#### **4.2.8. Análisis de los datos**

Los datos para el estudio se almacenaron mediante el programa Microsoft Excel (2010) y la plataforma Windows 7 (Microsoft Corporation, Estados Unidos), el análisis estadístico se realizó con el programa Stata 13 (Statacorp. 2013. Stata Statistical Software: Release 13. College Station, TX: StataCorp LP.).

Se evaluó la capacidad diagnóstica para todas las técnicas de diagnóstico microbiológico: baciloscopia mediante tinción de auramina, cultivo de *M.tuberculosis* complex y las tres técnicas de diagnóstico molecular. Como diagnóstico de referencia se tomó en primer lugar el cultivo de *M.tuberculosis* complex, y en segundo lugar el diagnóstico clínico de enfermedad pulmonar respiratoria por *M.tuberculosis* complex (teniendo en cuenta los síntomas, signos y pruebas complementarias practicadas por el clínico responsable de cada paciente

en el diagnóstico de rutina de nuestro centro). Para las tres técnicas de diagnóstico molecular se evaluó además la capacidad diagnóstica con un análisis estratificado en función del resultado de la baciloscopia.

En el análisis estadístico de la capacidad diagnóstica se evaluaron la exactitud diagnóstica (sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud, Odds Ratio Diagnóstica, Curva ROC) y el poder predictivo (valores predictivos positivo y negativo). La concordancia entre las técnicas moleculares se analiza mediante el índice kappa y el sentido del sesgo.

Los resultados se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes en el caso de variables cualitativas, y en medias y desviación estándar en las variables cuantitativas.

#### **4.3. Resultados**

Se estudiaron 111 muestras de esputo, de pacientes diferentes con sospecha diagnóstica de enfermedad tuberculosa respiratoria. De éstos, siete pacientes (6,31%) habían iniciado el tratamiento antituberculoso en el momento de recepción de la muestra.

La media de edad fue 59 años, con una desviación estándar de 19,99; la mediana de edad fue 59,28 años. El 30,63 % (34/111) fueron mujeres y el 69,37% (77) fueron hombres.

La radiografía de tórax fue patológica en el 78,38 % (87/111).

Los resultados de los estudios microbiológicos se muestran en la Tabla 6.

Las 31 muestras (27,93%) en las que en la tinción de auramina se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) se distribuyeron con menor a un bacilo en tres líneas en 18 (16,22%), entre 1 y 10 bacilos por campo en 7 (6,31%), entre 10 y 99 bacilos por campo en 5 (4,50%) y mayor o igual a 100 bacilos por campo en 1 muestra (0,90%).

Se identificaron como *M.tuberculosis* las 38 (34,23%) muestras con cultivo positivo para *M.tuberculosis* complex, de las que 26 (68,42%) presentaron tinción de auramina positiva.

El cultivo para micobacterias no tuberculosas fue positivo en 8 muestras (7,21%), con cultivo negativo para *M.tuberculosis* complex. De estas solamente una fue positiva en la tinción de auramina presentando menos de un BAAR en tres líneas, correspondiendo a *Mycobacterium intracellulare/Mycobacterium chimaera*. Las micobacterias no tuberculosas aisladas fueron *Mycobacterium intracellulare/Mycobacterium chimaera* en tres muestras, *Mycobacterium avium* complex en dos, *Mycobacterium chelonae* en dos y en una muestra *Mycobacterium xenopi*.

Se constataron finalmente 45 episodios de enfermedad tuberculosa (40,54%) en el estudio, 38 (84,44%) presentaron cultivo positivo para *M.tuberculosis*.

Tabla 6. Resultados de los estudios microbiológicos.

<b>Técnica</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<b>Baciloscopia</b>	31 - (27,93%)	80 - (72,07%)
<b>Cultivo</b>	38 - (34,23%)	73 - (65,77%)
<b>Diagnóstico clínico</b>	45 - (40,54)	66 - (59,46%)
<b>Anyplex</b>	40 - (36,04%)	71 - (63,96%)
<b>BioGX</b>	45 - (40,54%)	66 - (59,46%)
<b>Xpert</b>	44 - (39,64%)	67 - (60,36%)

En el análisis de los resultados, en primer lugar evaluamos la concordancia de las tres técnicas moleculares entre sí mediante el índice kappa. En todos los casos fue superior a 0,9, considerándose una concordancia excelente aquellos valores entre 0,81 y 1 (68).

El índice kappa entre Anyplex y BioGX fue 0,9049 ( $p < 0,001$ ), con un acuerdo total de 95,50% (106/111) que es alto tanto para diagnósticos positivos (94,12%) como negativos (96,35%). El sentido del sesgo (BI= -4,50%) indica que BioGx detecta un 4,5% de positivos entre los negativos de Anyplex.

El índice kappa entre Anyplex y Xpert fue 0,9235 ( $p < 0,001$ ), con un acuerdo total de 96,40% (107/111), elevado para diagnósticos positivos (95,24%) y negativos (97,10%). El sentido del sesgo (BI= -3,60) nos indica que Xpert detecta un 3,60% de positivos entre los negativos de Anyplex.

El índice kappa entre BioGx y Xpert fue 0,9812 ( $p < 0,001$ ), con un acuerdo total de 99,10% (110/111), que es alto para ambos

diagnósticos, positivos (98,88%) y negativos (99,25%). El sentido del sesgo (BI= 0,90) nos indica que BioGX detecta un 0,90% de positivos entre los negativos de Xpert.

#### **4.3.1. Resultados tomando como referencia el cultivo**

Tomando como técnica de referencia el cultivo, la sensibilidad obtuvo valores superiores al 90% en las tres técnicas de diagnóstico molecular, y la baciloscopia un 68,4%. Cuando estratificamos según el resultado de la baciloscopia, estos resultados se mantienen para las tres técnicas de diagnóstico molecular.

Asimismo, la especificidad fue superior al 90% en la baciloscopia y en las tres técnicas moleculares. Al estratificar mediante el resultado de la baciloscopia, el valor de la especificidad en las tres técnicas es inferior al 50% cuando la baciloscopia es positiva, manteniendo valores superiores al 95% cuando es negativa.

El área bajo la curva ROC (AUC) para las tres técnicas moleculares fue en todos los casos superior al 0,9; excepto al estratificar los resultados en función de la baciloscopia, que en el caso de ser positiva descendió a valores cercanos al 0,6 en las tres técnicas.

La razón de verosimilitud para positivos (LR+) es superior a 9 en todas las técnicas, siendo mayor de 19 para las tres técnicas moleculares cuando la baciloscopia es negativa e inferior a 1,55 cuando es positiva.

La razón de verosimilitud para negativos (LR-) es inferior a 0,085 en las técnicas moleculares. Cuando estratificamos el resultado en función de la baciloscopia, es inferior a 0,09 para las tres cuando la

baciloscopia es negativa; y menor a 0,2 cuando la baciloscopia es positiva.

La Odds Ratio Diagnóstica (DOR) es superior a 1 en todos los casos, observándose que los valores disminuyen mucho cuando estratificamos los resultados en función de baciloscopia positiva.

El valor predictivo positivo (VPP) es al menos del 80% en las todas las técnicas, independientemente de la estratificación en función de la baciloscopia.

El valor predictivo negativo (VPN) es superior al 95% en las técnicas moleculares. Al estratificar en función de baciloscopia, los resultados se mantienen, salvo para la técnica molecular Anyplex cuando la baciloscopia es positiva, que disminuye al 50%.

#### **4.3.2. Resultados tomando como referencia el diagnóstico de enfermedad tuberculosa**

Tomando como referencia el diagnóstico clínico de enfermedad tuberculosa, la sensibilidad en las tres técnicas moleculares es igual o superior al 88% en todos los casos. La baciloscopia presenta una sensibilidad del 66,7% y el cultivo 84,4%, que al estratificar pasa a un 80% en caso de baciloscopia negativa y 86,7% si es positiva.

La especificidad se mantiene en valores superiores al 98% en todas las técnicas, independientemente de la estratificación de los resultados en función de la baciloscopia.

El AUC es superior a 0,9 en el cultivo y las tres técnicas moleculares, siendo de 0,826 en la baciloscopia. Al estratificar los

resultados por el resultado de la baciloscopia este resultado se mantiene para el cultivo y las técnicas de diagnóstico molecular.

La LR+ es superior a 100 para las tres técnicas moleculares y el cultivo, manteniendo este resultado cuando la baciloscopia es negativa. Cuando la baciloscopia es positiva los valores oscilan entre 3,42-3,94.

La LR- presenta valores inferiores a 0,13 para las tres técnicas moleculares, manteniéndose en 0,12 para Anyplex y menor a 0,033 para Xpert y BioGX cuando estratificamos en función de la baciloscopia.

La DOR es superior a 1 para todas las técnicas, sin embargo al estratificar los datos en función de los resultados de la baciloscopia vemos que su valor disminuye. Es de 130 para la baciloscopia, 683 para el cultivo y mayor de 900 para las técnicas moleculares. Al estratificar por baciloscopia negativa el cultivo tiene un valor de 468, y las técnicas moleculares son todas mayores de 700; con baciloscopia positiva pasa el cultivo a 17,7 y el valor máximo en las técnicas moleculares es 183.

El VPP es superior al 96% para todas las técnicas. Al estratificar los resultados en función de la baciloscopia se alcanza el valor 100% para todas las técnicas.

El VPN es superior al 90% en el cultivo y las técnicas moleculares. Al estratificar los resultados, se mantienen estos resultados cuando la baciloscopia es positiva; disminuyendo a valores entorno al 20% cuando la baciloscopia es negativa para el cultivo y la técnica molecular Anyplex.

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 7-10; los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo se expresan en porcentajes. El área bajo la curva ROC, la razón de verosimilitud para positivos y negativos, y la Odds Ratio Diagnóstica se expresan en valor numérico decimal. Entre paréntesis figuran los intervalos de confianza al 95% (IC 95).

Tabla 7. Capacidad diagnóstica tomando el cultivo como referencia.

	Baciloscopia	Anyplex	BioGX	Xpert
Sensibilidad (n=38)	68,4% (51,3-82,5)	92,1 % (78,6- 98,3)	100 % (90,7- 100)	100% (90,7-100)
Especificidad (n=73)	93,2% (84,7-97,7)	93,2 % (84,7 - 97,7)	90,4 % (81,2 - 96,1)	91,8% (83-96,9)
AUC	0,808 (0,727 - 0,888)	0,926 (0,874 - 0,979)	0,952 (0,918 - 0,986)	0,959 (0,927-0,991)
LR+	9,99 (4,17 - 23,9)	13,4 (5,74-31,5)	9,74 (4,94-19,2)	11,2 (5,39-23,4)
LR-	0,339 (0,211 - 0,544)	0,0848 (0,0286-0,252)	0,0143 (9,1e <sup>-04</sup> -0,224)	0,0141 (8,9e <sup>-04</sup> -0,221)
DOR	29,5 (9,66 - 89,2)	159 (37,2-668)	683 (37,9-12.286)	800 (43,8-14.584)
VPP	83,9% (66,3 - 94,5)	87,5% (73,2-95,8)	84,4% (70,5-93,5)	86,4% (72,6-94,8)
VPN	85% (75,3 - 92)	95,8% (88,1-99,1)	100 % (94,6-100)	100% (94,6-100)

Tabla 8. Capacidad diagnóstica tomando la técnica de cultivo como referencia: resultados estratificados por baciloscopia.

	Baciloscopia	Anyplex	BioGX	Xpert
Sensibilidad	Negativa (n=12)	91,7% (61,5-99,8)	100% (73,5-100)	100% (73,5-100)
	Positiva (n=26)	92,3% (74,9-99,1)	100% (86,8-100)	100% (86,8-100)
Especificidad	Negativa (n=68)	97,1% (89,8-99,6)	95,6% (87,6-99,1)	97,1% (89,8-99,6)
	Positiva (n=5)	40% (5,27-85,3)	20% (0,505-71,6)	20% (0,505-71,6)
AUC	Negativa	0,944 (0,859-0,999)	0,978 (0,953-1)	0,985 (0,965-1)
	Positiva	0,662 (0,416-0,907)	0,6 (0,404-0,796)	0,6 (0,404-0,796)
LR+	Negativa	31,2 (7,97-123)	19 (6,79-52,9)	26,5 (7,82-90,1)
	Positiva	1,54 (0,746-3,17)	1,31 (0,822-2,08)	1,31 (0,822-2,08)
LR-	Negativa	0,0859 (0,0131-0,561)	0,0405 (0,0027-0,614)	0,0399 (0,0026-0,605)
	Positiva	0,192 (0,0348-1,06)	0,0741 (0,0034-1,61)	0,0741 (0,034-1,61)
DOR	Negativa	363 (35,8-1.697)	468 (22,7-9.628)	665 (30,1-14.701)
	Positiva	8 (1,01-67,7)	17,7 (0,618-505)	17,7 (0,618-505)
VPP	Negativa	84,6% (54,6-98,1)	80% (51,9-95,7)	85,7% (57,2-98,2)
	Positiva	88,9% (70,8-97,6)	86,7% (69,3-96,2)	86,7% (69,3-96,2)
VPN	Negativa	98,5% (92-100)	100% (94,5-100)	100% (94,6-100)
	Positiva	50% (6,76-93,2)	100% (2,5-100)	100% (2,5-100)

Tabla 9. Capacidad diagnóstica tomando el diagnóstico de enfermedad tuberculosa pulmonar como referencia.

	Baciloscopia	Cultivo	Anyplex	BioGX	Xpert
<b>Sensibilidad (n=45)</b>	66,7% (51-80)	84,4% (70,5-93,5)	88,9% (75,9-96,3)	100% (92,1-100)	97,8% (88,2-99,9)
<b>Especificidad (n=66)</b>	98,5% (91,8-100)	100% (94,6-100)	100% (94,6-100)	100% (94,6-100)	100% (94,6-100)
<b>AUC</b>	0,826 (0,755-0,897)	0,922 (0,869-0,976)	0,944 (0,898-0,991)	1 (1-1)	0,989 (0,967-0,999)
<b>LR+</b>	44 (6,22-311)	112 (7,07-1.780)	118 (7,44-1.871)	133 (8,38-2.098)	130 (8,19-2.052)
<b>LR-</b>	0,338 (0,224-0,512)	0,164 (0,0853-0,316)	0,12 (0,055-0,264)	0,011 (7,0e <sup>-04</sup> -0,172)	0,0329 (0,068-0,159)
<b>DOR</b>	130 (20,4-456)	683 (37,9-12.286)	979 (52,8-18.182)	12.103 (236-621.091)	3.946 (0,157-99.053)
<b>VPP</b>	96,8% (83,3-99,9)	100% (90,7-100)	100% (91,2-100)	100% (92,1-100)	100% (92-100)
<b>VPN</b>	81,3% (71-89,1)	90,4 (81,2-96,1)	93% (84,3-97,7)	100% (94,6-100)	98,5% (92-100)

Tabla 10. Capacidad diagnóstica tomando el diagnóstico de enfermedad tuberculosa pulmonar como referencia: resultados estratificados por el resultado de la baciloscopia.

	Baciloscopia	Cultivo	Anyplex	BioGX	Xpert
Sensibilidad	Negativa (n=15)	80% (51,9-95,7)	86,7% (59,5-98,3)	100% (78,2-100)	93,3% (68,1-99,8)
	Positiva (n=30)	86,7% (69,3-96,2)	90% (73,5-97,9)	100% (88,4-100)	100% (88,4-100)
Especificidad	Negativa (n=65)	100% (94,5-100)	100% (94,5-100)	100% (94,5-100)	100% (94,5-100)
	Positiva (n=1)	100% (2,5-100)	100% (2,5-100)	100% (2,5-100)	100% (2,5-100)
ÁUC	Negativa	0,9 (0,745-0,999)	0,933 (0,844-1)	1 (1-1)	1 (0,901-0,999)
	Positiva	0,933 (0,930-0,999)	0,950 (0,940-0,999)	1 (0,998-1)	0,998 (0,998-1)
LR+	Negativa	103 (6,44-1.651)	111 (6,98-1.776)	128 (8,07-2.026)	120 (7,53-1.901)
	Positiva	3,42 (0,309-37,9)	3,55 (0,321-39,3)	3,94 (0,357-43,4)	3,94 (0,357-43,4)
LR-	Negativa	0,22 (0,0873-0,557)	0,157 (0,0504-0,492)	0,0315 (0,0021-0,482)	0,0945 (0,0206-0,433)
	Positiva	0,194 (0,06-0,624)	0,151 (0,0423-0,536)	0,0215 (0,0012-0,377)	0,0215 (0,0012- 0,377)
DOR	Negativa	468 (22,7-9.628)	707 (32,1-15.583)	4.061 (77,5-212.780)	1.266 (49,1-32.684)
	Positiva	17,7 (0,618-505)	23,6 (0,796-698)	183 (2,61-12.815)	183 (2,61-12.815)
VPP	Negativa	100% (73,5-100)	100% (75,3-100)	100% (78,2-100)	100% (76,8-100)
	Positiva	100% (86,8-100)	100% (87,2-100)	100% (88,4-100)	100% (88,4-100)
VPN	Negativa	95,6% (87,6-99,1)	97% (89,6-99,6)	100% (94,5-100)	98,5% (91,8-100)
	Positiva	20% (0,505-71,6)	25% (0,631-80,6)	100% (2,5-100)	100% (2,5-100)

#### 4.4. Discusión

Las técnicas moleculares de detección de ácidos nucleicos se han desarrollado para ayudar al control de la enfermedad tuberculosa, aportando un diagnóstico más rápido (69).

Actualmente, el cultivo sigue considerándose la técnica de referencia en el diagnóstico microbiológico de la enfermedad tuberculosa, siendo la técnica más sensible según la literatura, con un límite de detección entre 10 y 100 micobacterias viables por mililitro, siendo su principal inconveniente el tiempo de incubación (hasta 45 días antes de emitir un resultado negativo empleando medios líquidos) (70,71).

Las técnicas moleculares se consideran más sensibles que la microscopía, pero menos sensibles que el cultivo cuando la baciloscopia es negativa. En nuestro estudio hemos empleado tres sistemas comerciales de PCR a tiempo real, ya que se considera la sensibilidad puede aumentar con la sistematización de la técnica y eliminando la presencia de inhibidores (71,72). En la literatura se estima la sensibilidad global en el 85% (rango 36-100) (69). Los buenos resultados obtenidos en nuestro estudio pueden ser debidos a que las técnicas se realizaron por personal entrenado, se empleó la técnica de concentración de micobacterias y se prepararon las muestras para evitar posibles inhibiciones (73).

En primer lugar evaluamos la concordancia de las tres técnicas moleculares entre sí mediante el índice kappa, que fue en todos los casos superior a 0,9, considerándose una concordancia excelente aquellos valores entre 0,81 y 1 (68).

A continuación, evaluamos la sensibilidad y la especificidad, que son independientes de la prevalencia de la enfermedad. Se considera que una prueba tiene una exactitud aceptable si su sensibilidad y especificidad alcanzan el umbral 0,8 (74).

En nuestro estudio, al evaluar la sensibilidad, obtenemos valores superiores para las técnicas moleculares que para la baciloscopia y el cultivo, independientemente de tomar como referencia el cultivo o el diagnóstico clínico.

Comparando las técnicas diagnósticas tomando el cultivo como referencia muestran al menos un 23,7% de superioridad en la sensibilidad de la técnica molecular que resultó menos sensible, Anyplex plus MTB/NTM (sensibilidad: 92,1%). Al estratificar los resultados en función de la baciloscopia, las tres técnicas moleculares mantienen un resultado por encima de 88%, siendo valores adecuados por encima del 80% cuando evaluamos este parámetro. Cuando tomamos como referencia el diagnóstico clínico, la baciloscopia sigue sin alcanzar el umbral del 80%, siendo el del cultivo 84,4%. Al estratificar según los resultados de la baciloscopia, las técnicas moleculares siguen manteniendo valores por encima del 88%, con valores superiores para la sensibilidad de 4,5 % frente al cultivo y de un 22,2% frente a la baciloscopia..

Estos resultados de la baciloscopia coinciden con lo reflejado en la literatura. La sensibilidad de la tinción depende de diversos factores como el tipo de muestra, extensión de la enfermedad, concentración de micobacterias y volumen de muestra. El límite de sensibilidad se estima entre 5.000 y 10.000 micobacterias por mililitro, con una sensibilidad global entre el 20% y el 80%. Es más elevada en muestras

respiratorias, cuando se emplea una tinción fluorescente y se emplea la técnica de concentración, requisitos que se cumplen en nuestro estudio (70,72).

La especificidad de la baciloscopia cuando tomamos como referencia el cultivo y el diagnóstico clínico fue muy elevada. Sin embargo, al estratificar tomando el cultivo como referencia, la especificidad de las técnicas moleculares es inferior al 50%, lo que no sucede al comparar con el diagnóstico clínico. Esto debido a que en el estudio participaron pacientes con enfermedad tuberculosa activa, que ya habían iniciado el tratamiento por el diagnóstico clínico, no pudiendo considerarse que los resultados de las técnicas sean falsos positivos en nuestro estudio. Está documentada la elevada especificidad de las técnicas moleculares, obteniéndose falsos positivos en caso de contaminación en el laboratorio, por amplicones o por muestras con alta carga micobacteriana (60,75,76).

El área bajo la curva ROC puede tomar un valor entre 0,5 y 1, siendo un área igual a 1 una prueba diagnóstica perfecta, y sin poder diagnóstico si tiene un área igual a 0,5 (74,77). En nuestro estudio, es superior a 0,9 para todas las técnicas excepto para la baciloscopia, que se sitúa entorno al 0,8. Al estratificar el resultado en función de la baciloscopia tomando como referencia el cultivo, se obtienen valores cercanos al 0,6 para las técnicas moleculares, reflejando los resultados obtenidos en la especificidad.

Las razones de verosimilitud relacionan los conceptos de sensibilidad y especificidad en un solo índice (78). Es la probabilidad de tener la enfermedad frente a no tenerla, teniendo un resultado positivo en la prueba; y la probabilidad de no tener la enfermedad

frente a tenerla, teniendo un resultado negativo en la prueba. Es una herramienta para la toma de decisiones clínicas al realizar una prueba diagnóstica, independiente de la prevalencia, lo que facilita la comparación entre distintas pruebas (79,80). Aunque su cálculo deriva de probabilidades condicionadas en base al teorema de Bayes, se puede estimar en base a parámetros de sensibilidad y especificidad, siendo LR+ el cociente de la sensibilidad entre 1 menos la especificidad, y LR- el cociente de 1 menos la sensibilidad entre la especificidad (81). Refleja la capacidad de un test diagnóstico para cambiar una probabilidad pretest a una nueva probabilidad postest. Empleamos el nomograma de Fagan, que permite realizar una estimación de la probabilidad postest, conocida la probabilidad pretest (que es la prevalencia) y un LR de la prueba (82). En general, un LR+ entre 5-10 y un LR- entre 0,1-0,2 están relacionados con una utilidad buena de la prueba en la práctica clínica (83).

En nuestro estudio, los resultados obtenidos de la razón de verosimilitud en las pruebas moleculares muestran una buena utilidad. Los valores de LR+ en las tres técnicas moleculares son superiores a 9 cuando tomamos como referencia el cultivo, disminuyendo en los casos en los que estratificamos por baciloscopia positiva. Indica que si un paciente con tuberculosis obtiene un resultado positivo mediante una técnica molecular, es 9 veces más probable se obtenga en presencia de enfermedad que en un paciente sano (resultados sin estratificar). Al tomar como referencia el diagnóstico de enfermedad tuberculosa respiratoria, los valores son superiores a 100 para las tres técnicas, disminuyendo a valores entre 3,42-3,92 cuando la baciloscopia es positiva (debido a los resultados de especificidad ya comentados). La LR- es inferior a 0,085 para las tres técnicas

moleculares, cuando tomamos como referencia el cultivo, y tomando como máximo el valor de 0,192 al estratificar por baciloscopia positiva. Indica que si un paciente ha obtenido un resultado negativo con la prueba, es 11,76 (1/0,085) veces más probable que se obtenga este resultado en ausencia de enfermedad. Al tomar como referencia el diagnóstico de enfermedad, los valores de LR- son inferiores a 0,12 para las tres técnicas moleculares, presentando como mínimo el valor de 0,011 para BioGX: 90,91 (1/0,011) veces más probable que el paciente no presente la enfermedad cuando esta técnica ofrece un resultado negativo. Estos resultados de LR- son similares a los de un metaanálisis ya publicado, pero como limitación tenemos que no en todos los estudios se estratificó en función de la baciloscopia (69).

La DOR se ha propuesto como único indicador para la realización de una prueba diagnóstica, cuyo rango va de 0 a infinito; cuanto mayor es el valor de la DOR mejor es la prueba, alcanzando el máximo cuando los valores de sensibilidad y especificidad están cerca de la perfección (84). La interpretación clínica en ocasiones se complica ya que el mismo valor de DOR se obtiene con distintos valores de especificidad y sensibilidad (73). Es independiente de la prevalencia, pero puede afectarle el grado de severidad de la enfermedad, como en el caso de los otros indicadores de realización de pruebas diagnósticas (85). La DOR fue mayor a 1 en todas las técnicas, presentando valores muy superiores para las moleculares, tomando como referencia tanto el cultivo como el diagnóstico de enfermedad, y los datos brutos o estratificados. En nuestro estudio se observa que se obtienen peores resultados cuando estratificamos en función de la baciloscopia positiva. Esto puede estar relacionado con el hecho de que hay pacientes a tratamiento como hemos comentado,

que afectan a la especificidad cuando tomamos como referencia el cultivo. El tamaño muestral puede haber afectado también, ya que el grupo de pacientes bacilíferos puede ser poco representativo.

Los valores predictivos determinan la seguridad de una prueba, evalúan el comportamiento de una prueba en una población con una determinada proporción de enfermos. Son por lo tanto, índices que dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población de procedencia de los sujetos a los que se aplica la prueba (86). Mediante el teorema de Bayes, a partir de la sensibilidad y especificidad se pueden calcular los valores predictivos para cualquier prevalencia de la enfermedad. En nuestro estudio, los valores predictivos se calcularon a partir de la prevalencia de enfermedad en nuestra muestra. Esto se justifica debido a que las pruebas diagnósticas van a ser aplicadas no a la comunidad entera, sino a una parte seleccionada (sospecha de enfermedad tuberculosa); por lo que presentará una probabilidad previa de la enfermedad bastante superior a la de la población general (74). En nuestro estudio, los valores predictivos positivos muestran un resultado superior al 84% para las técnicas moleculares cuando tomamos como referencia el cultivo, y alcanzan el 100% cuando tomamos como referencia el diagnóstico clínico. En nuestro estudio, el valor predictivo negativo se mantiene en valores por encima del 90% para todas las técnicas moleculares, excepto para Anyplex cuando estratificamos por baciloscopia positiva; esto puede deberse al escaso tamaño muestral.

Las tres técnicas moleculares presentan buenos resultados globales de exactitud y capacidad diagnóstica que recomiendan su uso en el diagnóstico microbiológico. Xpert® MTB/RIF assay y BioGX

*Mycobacterium tuberculosis* Complex Open System Reagents for BD MAX® se realizan en plataformas totalmente automatizadas, lo que puede haber contribuido a la obtención de mejores resultados (72). Actualmente las sociedades científicas internacionales resaltan la utilidad de un resultado negativo en la técnica molecular, que ante una baciloscopia positiva hace muy improbable el diagnóstico de enfermedad tuberculosa. En caso de un resultado positivo de la técnica molecular y una baciloscopia negativa, en pacientes con sospecha alta o intermedia de enfermedad tuberculosa, puede constituir un diagnóstico presuntivo, pero un resultado negativo no puede excluir la enfermedad (60). Cabe resaltar que Anyplex® plus MTB/NTM, a pesar de sus resultados algo inferiores a las otras dos plataformas, presenta un valor añadido al realizar también la detección de micobacterias no tuberculosas en la muestra clínica directa, lo cual es relevante en los casos de enfermedad por micobacterias no tuberculosas con baciloscopia positiva (72). Estas recomendaciones se extraen de varios metaanálisis que evalúan la exactitud y la capacidad diagnóstica de estas técnicas. La calidad de la evidencia obtenida es baja debido a que puede existir un sesgo de selección, ya que no se han incluido pacientes de modo consecutivo con diagnóstico incierto de tuberculosis, y hay inconsistencia entre los metaanálisis. Además, en algunos se toma como referencia el cultivo, en otros el diagnóstico clínico, y no siempre se estratifican los resultados en función del resultado de la baciloscopia (69,73,87).

El cultivo positivo de *M.tuberculosis* complex requiere al menos 1-3 semanas. La necesidad de un diagnóstico rápido hace recomendables la baciloscopia y las técnicas moleculares, presentando estas últimas la capacidad de diferenciar entre micobacterias no

tuberculosas y *M.tuberculosis* complex. Sin embargo, las técnicas moleculares deben usarse en conjunto con el cultivo y la baciloscopia. No presentan suficiente sensibilidad para descartar el cultivo, y es relevante aislar la micobacteria para realizar estudios de sensibilidad y de tipificación molecular. Los resultados de las pruebas moleculares dependen además del resultado de la baciloscopia y la sospecha clínica (12,60,88,89).

En nuestro estudio hemos obtenido resultados en los valores predictivos negativos superiores al 80%, tomando como referencia tanto el cultivo como el diagnóstico clínico; lo que nos permitiría concluir que un test negativo puede descartar la enfermedad en nuestro medio. Además, los valores de DOR, muy superiores al 1, nos hacen pensar en la buena capacidad y exactitud diagnóstica de la prueba. Todas las pruebas moleculares presentaron una buena capacidad y exactitud diagnóstica. El mejor rendimiento de las pruebas en nuestro estudio puede ser debido al uso de plataformas muy automatizadas, el elevado entrenamiento del personal que realiza la técnica y la presencia de una unidad específica en nuestro centro de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tuberculosa.



# 5

## **TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO: ESTUDIO COMPARATIVO**

Costa-Alcalde JJ, Barbeito-Castiñeiras G, González-Alba JM, Aguilera A, Galán JC, Pérez-del-Molino ML. *Comparative evaluation of the identification of rapidly growing non-tuberculous mycobacteria by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), GenoType Mycobacterium CM/AS assay and partial sequencing of the rpoβ gene with phylogenetic analysis as a reference method.* Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019;37(3):160–6.



## 5. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO: ESTUDIO COMPARATIVO

Costa-Alcalde JJ, Barbeito-Castiñeiras G, González-Alba JM, Aguilera A, Galán JC, Pérez-del-Molino ML. Comparative evaluation of the identification of rapidly growing non-tuberculous mycobacteria by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), GenoType Mycobacterium CM/AS assay and partial sequencing of the *rpoB* gene with phylogenetic analysis as a reference method. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(3):160–6.

### 5.1. Introducción

Las últimas dos décadas se han caracterizado por un extraordinario incremento de nuevas especies de *Mycobacterium* spp. De entre las 197 especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) oficialmente reconocidas, sólo alrededor de 30 están presentes en la práctica clínica habitual (3). Las MNT están ampliamente distribuidas en el medio ambiente y de manera habitual habitan suelo y agua.

Este grupo de microorganismos se consideran patógenos oportunistas capaces de provocar infecciones pulmonares, de la piel, en tejidos blandos, linfáticas o diseminadas así como brotes nosocomiales relacionados con una inadecuada desinfección o

esterilización del instrumental médico. La incidencia de enfermedades causadas por MNT parece estar en aumento debido, entre otras causas, al incremento de pacientes inmunocomprometidos (90). La ATS/IDSA recomienda que las MNT con relevancia clínica se identifiquen a nivel de especie para determinar su significado clínico y seleccionar el tratamiento más adecuado (18).

La tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight mass spectrometry) permite la identificación de microorganismos a partir de un espectro único producido por proteínas. En los últimos años MALDI-TOF MS se ha convertido en una herramienta rápida, potente y relativamente barata para la identificación a nivel de laboratorio clínico de hongos levaduriformes y bacterias (91,92).

Los métodos moleculares mediante sistemas caseros y/o comerciales son las técnicas más usadas para la identificación de micobacterias a nivel de especie. En este trabajo se utilizaron dos métodos moleculares para la identificación micobacterias: un método molecular comercial y la secuenciación parcial del gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoβ*) (93).

La secuenciación de genes conservados es el método de referencia para la identificación de micobacterias (91). En el genoma de las micobacterias se han encontrado algunas regiones útiles para su identificación. En varios estudios se recomienda, tanto como punto de partida como para una correcta identificación a nivel de especie, la región hipervariable del gen *rpoβ*, localizado entre los pares de bases 2300 y 3300 (94).

El objetivo de este estudio fue evaluar la identificación de micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido obtenidas de

muestras clínicas utilizando los dos métodos que se emplean en la práctica asistencial habitual en nuestro laboratorio de Microbiología: la tecnología MALDI-TOF MS y un método molecular comercial. Se compararon los resultados con los obtenidos mediante un método de referencia (la secuenciación parcial del gen *rpoβ*).

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Aislados clínicos**

Para este trabajo empleamos 46 cepas de MNT de crecimiento rápido procedentes de muestras clínicas aisladas en el periodo comprendido entre enero de 2007 y abril de 2015 en el área sanitaria de Santiago de Compostela (458.759 habitantes).

Solamente 15 de estos pacientes presentaron criterios diagnósticos según la ATS/IDSA (18). La identificación de las micobacterias aisladas procedentes de muestras clínicas se realizó en primer lugar con el sistema molecular comercial GenoType® CM/AS VER 1.0, (Hain Lifescience, Nehren, Alemania) y se preservaron a -80°C. Posteriormente cada cepa se sembró en un medio de agar con sangre (Columbia-blood agar base, Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos) e incubados a 37°C en una estufa con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 5-7 días el crecimiento logrado fue suficiente para llevar a cabo los estudios correspondientes.

Los aislados clínicos se obtuvieron como parte de la actividad asistencial rutinaria del Servicio de Microbiología y se analizaron anonimizados retrospectivamente.

### **5.2.2. GenoType Mycobacterium CM/AS**

GenoType® (Hain Lifescience, Nehren, Alemania) es una técnica de Line Probe Assay (LiPA), que realiza una amplificación específica de una secuencia de ARNr 23S e hibridación posterior en fase sólida con sondas genéticas inmovilizadas sobre tiras de nitrocelulosa. La hibridación se hace evidente mediante revelado enzimático.

Para este estudio empleamos dos presentaciones de este ensayo: Mycobacterium CM VER 1.0®, que identifica las 17 especies aisladas con mayor frecuencia (de las cuales 6 necesitan estudios complementarios), y Mycobacterium AS VER 1.0®, que identifica de manera adicional 17 especies menos frecuentes (y dos de las 6 micobacterias que necesitan estudios complementarios mediante el Mycobacterium CM VER 1.0®). El ensayo GenoType® se realizó de acuerdo con las instrucciones facilitadas por el fabricante (64,95).

### **5.2.3. MALDI-TOF MS:**

#### **5.2.3.1. Protocolo de extracción de proteínas**

Empleamos el protocolo de inactivación de micobacterias con perlas de cristal proporcionado por Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Alemania) (96). Todos los pasos previos a la inactivación por calor que requerían manipulación abierta de las micobacterias se realizaron en una cabina de seguridad biológica IIA.

Las cepas se procesaron en un MALDI-TOF MS microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (96).

Con un asa estéril de 10  $\mu$ l se transfirieron las colonias del cultivo de micobacterias en agar sangre a un tubo de microcentrífuga con tapón de rosca de 1,5 ml que contenía 300 $\mu$ l de agua estéril. A continuación se calentó durante 30 minutos a 100°C en un termobloque para inactivar las micobacterias. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 2 minutos, y se añadieron 900  $\mu$ l de etanol al 100%. Después de agitar en vórtex, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante dos minutos y se desechó el sobrenadante. Se volvieron a centrifugar los tubos a 13.000 rpm 2 minutos y todo el líquido residual se eliminó por completo. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se suspendió en 25 $\mu$ l de acetonitrilo y se añadió un volumen de aproximadamente 50 $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 milímetros de diámetro. Los tubos se agitaron en vórtex durante 1 minuto, se añadieron 25  $\mu$ l de ácido fórmico al 70%, y las muestras se volvieron a agitar en vórtex durante 1 minuto. Los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 minutos, y el sobrenadante se empleó para el análisis con MALDI-TOF MS.

#### 5.2.3.2. MALDI-TOF MS: análisis

Las cepas se procesaron con un MALDI-TOF MS microflex LT (Brucker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania).

Un microlitro del sobrenadante se depositó por duplicado en una tarjeta de acero (MTP 384 polished steel target plate BC; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) y se dejó secar a temperatura ambiente. Se pipeteó 1  $\mu$ l de solución matriz

(solución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico en 50 % de acetonitrilo y 2,5 % de ácido trifluoroacético) en cada una de las muestras. Tras secarse la tarjeta, se insertó en el MALDI-TOF MS. El análisis en MALDI-TOF MS se realizó en modo automático. Los espectros se adquirieron con una frecuencia de láser de 60 Hz a través de un ratio masa/carga ( $m/z$ ) de 2000–20,000 Da.

Los perfiles de proteínas se obtuvieron mediante el software FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania). Los espectros se analizaron con la base de datos de Bruker Maldi Biotyper Mycobacteria Library 3.0 mediante el software Maldi Biotyper software (v 3.1; Bruker Daltonics), que asigna un valor logarítmico entre 0 y 3 y asigna la mayor concordancia en relación a la razón masa/carga ( $m/z$ ) y el tamaño relativo de cada pico de cada proteína ionizada.

#### **5.2.4. Secuenciación parcial del gen *rpoB***

##### 5.2.4.1. Extracción de DNA

Se realizó con el método de extracción de ADN para medio de cultivo sólido incluido en el kit Anyplex<sup>®</sup> MTB/NTM Real-time Detection V2.0 (Seegen, Seúl, Corea) siguiendo las instrucciones del fabricante (61).

##### 5.2.4.2. Amplificación del gen *rpoB*

Se emplearon 5  $\mu$ L del ADN extraído para una PCR con volumen de reacción final de 25  $\mu$ L. Se utilizaron los reactivos proporcionados

en el kit GoTaq® PCR Core Systems I (Promega) kit: 5U/ µl GoTaq® DNA Polymerase, 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Mg-Free), 25mM MgCl<sub>2</sub> y 10mM PCR Nucleotide Mix. Las concentraciones de trabajo de los primers directo e inverso fueron 10 µM. Las concentraciones finales fueron 0.025 U/µl GoTaq® DNA Polymerase, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (de cada nucleótido), 0.2 µM de cada primer. Todas las cepas se identificaron mediante la secuenciación parcial del gen *rpoβ* mediante un método descrito previamente (97). De manera resumida, flanqueando la región más variable del gen *rpoβ*, los primers de PCR MycoF (5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3'; posición de las bases 2573 a 2592, los nucleótidos se numeraron según la secuencia del gen *rpoβ* de la cepa de *M. smegmatis* ATCC 14468) y MycoR (5'-AGCGGCTGCGGGTGATCATC-3'; posición de las bases 3316 a 3337), amplifican un fragmento de 764-bp de la región del gen *rpoβ* de las cepas. Las condiciones para la amplificación del gen *rpoβ* fueron un precalentamiento a 95<sup>0</sup>C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95<sup>0</sup>C durante 30 segundos, 55<sup>0</sup>C durante 30 segundos y 72<sup>0</sup>C durante 90 segundos. Para finalizar con un paso de elongación de 72<sup>0</sup>C durante 7 minutos. Cinco microlitros del producto de PCR se analizaron con luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1%.

#### 5.2.4.3. Secuenciación parcial del gen *rpoβ*

Los productos de la PCR se purificaron con columnas Qiagen (Qiagen, Alemania). Los amplicones purificados se secuenciaron con el kit GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick

Start siguiendo las instrucciones del fabricante (Beckman Coulter®) mediante el programa: 30 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 20 segundos, anillamiento de los primers a 50°C durante 20 segundos y extensión a 60°C durante 4 minutos. Los primers de la secuenciación fueron los mismos usados en la amplificación. Los productos de la reacción de secuenciación se leyeron en un secuenciador automático (CEQ™ 8000 Gentic Analysis System, Beckman Coulter®) siguiendo el protocolo estándar del fabricante.

Las secuencias parciales del gen *rpoβ* así obtenidas se compararon con aquellas disponibles en el GenBank mediante el software BLAST (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se seleccionó la especie bacteriana más probable. Las secuencias parciales del gen *rpoβ* que mostraron al menos un 98% de identidad cuando se compararon con las secuencias del GenBank se consideraron identificativas de especie (93).

#### **5.2.5. Análisis filogenético**

El análisis filogenético se llevó a cabo para mejorar la exactitud de la secuenciación parcial del gen *rpoβ*. El tamaño de las secuencias parciales del gen *rpoβ* obtenidas fue entre 278 y 710 nucleótidos. Mediante BLAST se obtuvieron un conjunto de secuencias de referencia del gen *rpoβ* de micobacterias disponibles en GenBank (Tabla 11). Estos datos de referencia incluyeron 1 093 secuencias y las secuencias de nucleótidos se tradujeron y alinearon usando el algoritmo ClustalW implementado en MEGA. Las secuencias para el análisis se dividieron de acuerdo con el fragmento secuenciado.

Los árboles filogenéticos se construyeron por máxima verosimilitud usando como modelo de sustitución nucleotídica el Tiempo General Reversible (GTR) incluyendo una proporción de sitios invariables (I) y variación de la tasa de mutación entre sitios según una distribución gamma (G). El modelo de sustitución nucleotídica se seleccionó con el programa Modeltest 0,1 (98). La selección heurística del árbol más verosímil se realiza por el método de intercambio del vecino más próximo a partir de un árbol inicial obtenido por un método de distancias (BIONJ). La prueba de razón de verosimilitudes aproximada basada en el método de Shimodaira-Hasegawa se usa para calcular el soporte de las ramas (99). Solamente los soportes con valor >90% se consideran significativos y se sitúan en los nodos del árbol filogenético.

#### **5.2.6. Análisis estadístico**

Para estudiar el grado de concordancia entre métodos se usó el coeficiente Kappa. El test exacto de Fisher se usó para evaluar la concordancia entre GenoType® y MALDI-TOF. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron con STATA 13.1 (StataCorp, Estados Unidos).

### **5.3. Resultados**

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12 y las Figuras 1-8.

Los análisis filogenéticos y los realizados con BLAST coincidieron, aunque en 2 cepas los análisis filogenéticos no

encontraron diferencias significativas para diferenciar entre al menos dos especies de *Mycobacterium* spp. (Tabla 11, cepas 29 y 45).

Mediante BLAST, las muestras 42 y 45 mostraron una identidad en su secuencia inferior al 98% cuando se compararon con las secuencias disponibles en GenBank. Las identificaciones mediante BLAST concordaron con las obtenidas mediante el análisis filogenético. EL análisis filogenético de la muestra 45 no encontró diferencias significativas entre las especies *M. duvalii* y *M. monacense*.

Tres cepas (6,5%) no se identificaron mediante secuenciación parcial del gen *rpoβ* (BLAST y filogenia) porque no fue posible amplificarlas mediante PCR.

Ocho cepas fueron identificadas mediante secuenciación parcial del gen *rpoβ* como *M. abscessus*, pero no fue posible clasificarlas a nivel de subespecie.

### **5.3.1. GenoType® y secuenciación parcial del gen *rpoβ***

Entre los métodos GenoType® y secuenciación parcial del gen *rpoβ* la concordancia se observó en 27 de 43 casos (62,8%), valor Kappa 0,534 ( $p < 0,001$ ).

### **5.3.2. MALDI-TOF y secuenciación parcial del gen *rpoβ***

Entre los métodos MALDI-TOF MS y secuenciación parcial del gen *rpoβ* la concordancia se observó en 38 de 43 casos (88,3%), valor Kappa 0,854 ( $p < 0,001$ ).

Cuando se consideraron sólo los valores de puntuación de MALDI-TOF MS  $> 1.85$ , la concordancia fue del 100% (36 de 36).

Para valores de puntuación de MALDI-TOF MS  $< 1.85$ , sólo se obtuvo concordancia en 2 de 7 (28,6%) resultados (Tabla 12).

### 5.3.3. GenoType® y MALDI-TOF MS

Todas las cepas identificadas correctamente mediante GenoType® también fueron correctamente identificadas mediante MALDI-TOF MS (27/27). Pero MALDI-TOF MS identificó correctamente un 68,75% (11/16) de las cepas que GenoType® no identificó correctamente ( $p=0,005$ ).

## 5.4. Discusión

En la actualidad, pocos laboratorios de diagnóstico utilizan los métodos convencionales bioquímicos o de cultivo diferencial. Estos métodos se han abandonado porque, además de basarse en pruebas que son poco reproducibles y muy lentas, carecen del suficiente poder para diferenciar entre especies (91). Incluso los métodos de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) basados en el análisis de los lípidos de la pared en la actualidad se encuentran con problemas por el constante aumento en el número de especies dentro del género *Mycobacterium* spp. (100) y la aparición de nuevas especies con perfiles de HPLC idénticos (91).

Hay trabajos que avalan la tecnología MALDI-TOF MS para identificar *Mycobacterium* spp. (92)(101). Clark et al, 2011, concluyen que estos estudios demuestran la viabilidad y la solidez de la exactitud asociada a MALDI-TOF MS para la identificación de micobacterias (92). A pesar de ello, otros autores creen que en el

momento presente la exactitud en la identificación alcanzada mediante los métodos genéticos está fuera del alcance de la tecnología MALDI-TOF MS (91).

En este trabajo hemos encontrado que es necesario alcanzar una determinada puntuación de MALDI-TOF (1,85) para que las identificaciones obtenidas sean correctas con respecto al método de referencia utilizado (102,103). Sin embargo, debe considerarse el número limitado de aislamientos de especies de micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido que empleamos en nuestro estudio.

Desde el punto de vista coste efectividad, con MALDI-TOF MS los resultados se obtienen en alrededor de 90 minutos, mientras que con GenoType® son necesarias sobre 6 horas (104). Además, la metodología de MALDI-TOF MS es simple, rápida y asociada con menos coste por consumibles que GenoType®. El espectrómetro MALDI-TOF MS y el software asociado son caros inicialmente, pero tiene la ventaja de que puede ser utilizado para la identificación de otros tipos de bacterias y los costes en consumibles son económicos (menos de 1 \$, 1,25 € , por aislamiento) (101). El coste por identificación con GenoType® en nuestro laboratorio asciende a 49€ por determinación, lo que multiplica varias veces el coste de cada determinación obtenida con MALDI-TOF MS.

*M. abscessus* complex comprende un grupo de micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido multirresistentes que se han convertido en un patógeno importante responsable de un amplio espectro de infecciones, tras su reconocimiento como especie diferenciada de *M. chelonae* en 1992. En este trabajo los tres métodos fueron capaces de diferenciar estas especies con total concordancia.

*M. abscessus* complex consta de tres subespecies: *abscessus*, *masiliense* y *bolletii*. (105). Las subespecies tienen relevancia clínica porque están relacionadas con la respuesta a macrólidos: *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *bolletii* poseen un gen *erm*(41) funcional que media la resistencia inducible a macrólidos; mientras que *M. abscessus* subsp. *masiliense* tiene una delección en el gen *erm* (41) convirtiéndolo en no funcional y siendo por tanto intrínsecamente resistente a macrólidos. La excepción es que aproximadamente un 15% de las cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* tienen una mutación puntual (28 T por C) que convierte el gen en no funcional (106) . La infección por *M. abscessus* subsp. *bolletii* tiene una tasa superior de respuesta (aproximadamente 90%) que los pacientes con infección por *M. abscessus* subsp. *abscessus* (aproximadamente 25%) (107). A diferencia con algunos autores (108,109) y en acuerdo con otros (110,111) hemos encontrado que la secuenciación parcial del gen *rpoβ* empleada en nuestro estudio (97) no fue capaz de clasificar las subespecies de *M. abscessus*. Está ampliamente aceptado que varios genes, analizados en particular por los investigadores, son necesarios para identificar las tres subespecies: los genes *rpoβ*, *secA*, *sodA* y *hsp65* (110,111). El enfoque basado en un solo gen es sensible para la evolución histórica de ese gen, pero no necesariamente de las especies, y puede estar limitado por la falta de variación suficiente en la secuencia de un solo gen. Por lo tanto, un enfoque basado en múltiples genes, puede conducir a una inferencia precisa del árbol filogenético para la clasificación de subespecies (112). Además algunos autores han descrito métodos para emplear MALDI-TOF MS para la diferenciación de *M. abscessus* complex a nivel de subespecie (113). Consideramos que sería de gran interés ampliar el estudio para

la identificación de estas especies micobacterianas y sus subespecies mediante MALDI-TOF MS debido a su importancia clínica y posibles diferencias en su tratamiento.

*M. fortuitum* complex comprende las siguientes especies: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. setense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. alvei*, *M. houstonense*, *M. boenickei*, *M. conceptinense*, *M. porcinum*, *M. neworleansense* y *M. brisbanense*. En nuestro estudio hallamos 18 aislamientos de *M. fortuitum* complex pero solamente seis especies diferentes. Según las instrucciones del fabricante, GenoType VER 1.0 ® diferencia *M. fortuitum* tipo 1, *M. fortuitum* tipo 2/*M. mageritense* y *M. peregrinum* /*M. alvei* /*M. septicum* pero, en este estudio, todos ellos se identificaron como *M. fortuitum* mediante GenoType®. A pesar de la limitación implícita en el número y variedad de las especies estudiadas, cuando se compararon GenoType®, MALDI-TOF MS y los métodos de secuenciación de *rpoB*, se mostró que MALDI-TOF MS fue superior con respecto al método GenoType® para diferenciar las especies de *M. fortuitum* complex. Con nuestros resultados, GenoType® no sería capaz de diferenciar las especies de *M. fortuitum* complex (114). Sin embargo, sería necesario e interesante disponer de un número mayor de aislamientos y especies de este complejo para poder obtener conclusiones más sólidas. Empleando MALDI-TOF MS, 4/17 cepas de *M. fortuitum* complex no se identificaron a nivel de especie. Sin embargo, debe señalarse que esas cuatro cepas mostraron una puntuación en MALDI-TOF MS <1,85 (rango 1,715-1,781) (102).

De las 17 cepas estudiadas de *M. chelonae*, 16 fueron correctamente identificadas por los tres métodos empleados, y una no fue identificada por análisis filogenético ni por BLAST.

*M. mucogenicum* se identificó en solamente una muestra con MALDI-TOF MS y el método de secuenciación parcial de *rpoβ*, mientras que fue identificada como *Mycobacterium* spp. con GenoType®. Han et al. (115) describieron *M. mucogenicum* como la especie predominante de micobacteria no tuberculosa de crecimiento rápido responsable de infecciones en sangre y relacionadas con catéter.

Encontramos dos cepas con una similitud de secuenciación parcial del gen *rpoβ* <98% con respecto a las secuencias de referencia de BLAST. Estas 2 cepas con secuenciación parcial del gen *rpoβ* con una similitud <98% mostraron puntuaciones MALDI-TOF MS <1,85 y una de ellas se identificó con análisis filogenético como *M. septicum*. Además, el análisis filogenético no encontró diferencias significativas entre al menos dos especies de *Mycobacterium* spp.: *M. alvei* / *peregrinum* y *M. monacense* / *duvalii*. Estas cepas no pudieron clasificarse correctamente debido a la corta longitud del fragmento amplificado. Estas cepas serían candidatas para un estudio posterior para establecer su identificación a nivel de especie. La secuenciación de regiones adicionales (genes 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *dnaK* completos) estaría indicada en estos casos (116–118). Es conocido que el análisis de secuencias de ADN aislado de muestras clínicas también ha permitido el descubrimiento de nuevos patógenos bacterianos (119).

Cuando la puntuación de MALDI-TOF MS fue <1,85 se propuso la revisión de estos espectros con el objetivo de completar la base de datos de *Mycobacterium* spp. de MALDI-TOF MS. Otros autores en publicaciones previas, documentaron espectros no identificados mediante la versión 1.0 de MALDI-TOF MS. Nuestro trabajo fue

realizado con la versión 3.0, que tiene mayor número de espectros que las versiones anteriores que justifica los mejores resultados obtenidos (104,120).

Otro aspecto interesante sería la ampliación del estudio con micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento. Sin embargo, esto presentaría una mayor dificultad debido a las características intrínsecas de estas micobacterias no tuberculosas, así como a la gran diversidad de especies existentes.

En conclusión, los métodos moleculares son más costosos y lentos y es posible que no estén disponibles en algunos laboratorios de microbiología clínica. Nuestros resultados, que se obtuvieron con un número limitado de especies de micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido, indican que el análisis MALDI-TOF MS es un método rápido y fiable para identificación de *Mycobacterium* spp., así como para identificar correctamente todas las *Mycobacterium* spp. clínicamente relevantes, se requerirá la secuenciación de genes adicionales de *Mycobacterium* spp. o la secuenciación del genoma completo y el posterior análisis filogenético.

Tabla 11. Secuencias de referencia del gen *rpoB*. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018.

gi 299013526 gb HM229793.1	gi 115383174 gb DQ866799.1	gi 110816552 gb CP000431.1
gi 1003003271 gb KU361327.1	gi 1031418466 gb KU351672.1	gi 920216844 emb LN877229.1
gi 126232413 gb CP000580.1	gi 987312414 gb KR025885.1	gi 589062392 gb CP003949.1
gi 119692146 gb CP000518.1	gi 753220773 gb KM973031.1	gi 404551296 gb JX294410.1
gi 108767400 gb CP000384.1	gi 753220767 gb KM973028.1	gi 315435623 gb HM807434.1
gi 213876738 gb FJ418054.1	gi 1014153750 gb CP014952.1	gi 219671580 gb FJ590435.1
gi 213876740 gb FJ418056.1	gi 698183444 gb CP009499.1	gi 157851005 gb EF584435.1
gi 34595748 gb AY262738.1	gi 243010749 gb GQ153309.1	gi 1013823606 gb KU212280.1
gi 34391562 gb AY147172.1	gi 157851024 gb EF584445.1	gi 944205708 gb CP011883.2
gi 34595756 gb AY262742.1	gi 183579274 gb EU591501.1	gi 745794294 gb KM507925.1
gi 34595746 gb AY262737.1	gi 976929842 gb KP840586.1	gi 633955473 gb KJ729110.1
gi 906350884 gb CP012150.1	gi 987898843 gb KT861786.1	gi 459376681 gb KC669532.1
gi 62720651 gb AY859695.1	gi 611962927 gb KJ409443.1	gi 169247682 gb EU370225.1
gi 937417870 gb CP011269.1	gi 404551276 gb JX294400.1	gi 148879060 emb AM421394.1
gi 311901491 gb HM536982.1	gi 355344045 gb JN571261.1	gi 699263052 gb KM234056.1
gi 986958377 gb KT455000.1	gi 355344025 gb JN571251.1	gi 319998254 gb HQ141574.1
gi 986958375 gb KT454999.1	gi 355344013 gb JN571245.1	gi 319998246 gb HQ141570.1
gi 986958373 gb KT454998.1	gi 355344011 gb JN571244.1	gi 315435625 gb HM807435.1
gi 986958379 gb KT455001.1	gi 355343987 gb JN571232.1	gi 225348571 gb FJ786256.1
gi 987010091 gb CP014258.1	gi 355343985 gb JN571231.1	gi 627792463 gb KJ586647.1
gi 725869003 gb CP009914.1	gi 355343983 gb JN571230.1	gi 576647242 gb KF910157.1
gi 259559668 gb GQ850588.1	gi 299473870 gb HM132044.1	gi 343131441 gb JF327744.1
gi 34391554 gb AY147168.1	gi 1023529977 gb KU146533.1	gi 327553821 gb HQ174247.1
gi 34391548 gb AY147165.1	gi 976929840 gb KP840583.1	gi 315435629 gb HM807437.1
gi 1024325410 gb KU240543.1	gi 938485649 gb KT185536.1	gi 315435583 gb HM807414.1
gi 350528723 gb JN682046.1	gi 243010753 gb GQ153311.1	gi 313759668 gb HQ404284.1
gi 350528719 gb JN682044.1	gi 207691926 gb FJ172337.1	gi 256014677 gb FJ616948.1
gi 346230979 gb JF706631.1	gi 207690922 gb FJ172335.1	gi 185179191 gb EU597582.1
gi 34391564 gb AY147173.1	gi 115383176 gb DQ866800.1	gi 745794278 gb KM507917.1

GEMA BARBEITO CASTIÑEIRAS

gi 976929836 gb KP840575.1	gi 1004314153 gb CP010996.1	gi 576647266 gb KF910169.1
gi 976929834 gb KP840570.1	gi 511362848 dbj AB824285.1	gi 681956687 gb KJ920346.1
gi 350528717 gb JN682043.1	gi 399147257 gb JQ717032.1	gi 448871657 gb JX083139.1
gi 627792459 gb KJ586645.1	gi 388784868 gb JQ744020.1	gi 319998248 gb HQ141571.1
gi 363990276 gb JN400399.1	gi 243010757 gb GQ153313.1	gi 225030858 gb FJ667552.1
gi 350528729 gb JN682049.1	gi 157850999 gb EF584432.1	gi 938485663 gb KT185543.1
gi 350528721 gb JN682045.1	gi 827048815 gb KP401757.1	gi 699263072 gb KM234066.1
gi 326694951 gb JF508476.1	gi 725542682 gb KM392056.1	gi 379773165 gb JF738053.1
gi 34391552 gb AY147167.1	gi 355344039 gb JN571258.1	gi 927278145 gb KT168290.1
gi 343407456 gb JF346874.1	gi 355344015 gb JN571246.1	gi 699263048 gb KM234054.1
gi 350528727 gb JN682048.1	gi 355343991 gb JN571234.1	gi 576647494 gb KF910305.1
gi 1024325414 gb KU240545.1	gi 355343989 gb JN571233.1	gi 576647490 gb KF910303.1
gi 1001184183 emb LN995673.1	gi 355343975 gb JN571226.1	gi 576647244 gb KF910158.1
gi 34391550 gb AY147166.1	gi 355343971 gb JN571224.1	gi 380875716 gb JQ411510.1
gi 444436469 gb KC242463.1	gi 355343953 gb JN571215.1	gi 404551268 gb JX294396.1
gi 346230977 gb JF706630.1	gi 295815620 gb HM022210.1	gi 344995109 gb JF437550.1
gi 51038415 gb AY684057.1	gi 295814669 gb HM011175.1	gi 344995097 gb JF437544.1
gi 627792471 gb KJ586651.1	gi 239925563 gb GQ166762.1	gi 315435593 gb HM807419.1
gi 627792453 gb KJ586641.1	gi 193093813 gb EU109294.1	gi 183579262 gb EU591495.1
gi 444436465 gb KC242461.1	gi 158954685 gb EU109295.1	gi 157004970 gb EF521911.1
gi 315435607 gb HM807426.1	gi 190694900 gb EU770576.1	gi 745794302 gb KM507929.1
gi 219671616 gb FJ590453.1	gi 148879044 emb AM421386.1	gi 698276644 gb KJ949019.1
gi 119953846 gb CP000511.1	gi 71148460 gb DQ068742.1	gi 432160663 emb FO203509.1
gi 308367813 gb HQ229607.1	gi 987312424 gb KR025890.1	gi 225030860 gb FJ667553.1
gi 51038419 gb AY684059.1	gi 725542686 gb KM392058.1	gi 256014683 gb FJ616951.1
gi 627792461 gb KJ586646.1	gi 611962929 gb KJ409444.1	gi 208343770 gb FJ194538.1
gi 627792456 gb KJ586643.1	gi 545714258 gb KF224995.1	gi 944389169 gb CP012184.1
gi 315435591 gb HM807418.1	gi 442581001 gb CP003899.1	gi 944383274 gb CP012181.1
gi 189187660 gb EU371509.1	gi 404551288 gb JX294406.1	gi 928461215 gb CP010989.1
gi 189187655 gb EU371506.1	gi 295815612 gb HM022206.1	gi 760453955 gb KP098592.1
gi 185179209 gb EU597591.1	gi 219671594 gb FJ590442.1	gi 388564867 gb JQ599259.2
gi 148879078 emb AM421403.1	gi 197944872 gb EU999023.1	gi 371534683 gb JN881349.1

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS ...

gi 116488417 gb AY262743.2	gi 183173361 gb CP000854.1	gi 344995101 gb JF437546.1
gi 34595744 gb AY262736.1	gi 157004968 gb EF521910.1	gi 256014685 gb FJ616952.1
gi 51038423 gb AY684061.1	gi 161015972 gb EU254721.1	gi 256014681 gb FJ616950.1
gi 51038413 gb AY684056.1	gi 816214082 gb CP011341.1	gi 183579270 gb EU591499.1
gi 1001184185 emb LN995674.1	gi 576647264 gb KF910168.1	gi 157004962 gb EF521907.1
gi 777214100 emb LN831039.1	gi 393186805 emb FR695851.1	gi 157004960 gb EF521906.1
gi 444436467 gb KC242462.1	gi 355344035 gb JN571256.1	gi 951592648 gb KT149384.1
gi 346427156 gb JF712876.1	gi 355344033 gb JN571255.1	gi 951592646 gb KT149383.1
gi 315435643 gb HM807444.1	gi 355343969 gb JN571223.1	gi 576647248 gb KF910160.1
gi 315435621 gb HM807433.1	gi 355343965 gb JN571221.1	gi 612176425 gb KJ586587.1
gi 219671610 gb FJ590450.1	gi 355343963 gb JN571220.1	gi 421952529 gb JQ902013.1
gi 213876734 gb FJ418050.1	gi 355343957 gb JN571217.1	gi 315435587 gb HM807416.1
gi 34595742 gb AY262735.1	gi 295815616 gb HM022208.1	gi 295815634 gb HM022217.1
gi 148879072 emb AM421400.1	gi 295814745 gb HM011213.1	gi 699263060 gb KM234060.1
gi 115383180 gb DQ866802.1	gi 295814663 gb HM011172.1	gi 348167260 gb JF896097.1
gi 62720655 gb AY859697.1	gi 295814659 gb HM011170.1	gi 226934679 gb FJ859887.1
gi 51038427 gb AY684063.1	gi 213876748 gb FJ418068.1	gi 157004958 gb EF521905.1
gi 51038421 gb AY684060.1	gi 148879068 emb AM421398.1	gi 933680483 gb CP011853.1
gi 51038417 gb AY684058.1	gi 976929832 gb KP840565.1	gi 576647252 gb KF910162.1
gi 1024325422 gb KU240549.1	gi 938485687 gb KT185555.1	gi 348167258 gb JF896096.1
gi 698956000 gb CP009496.1	gi 856571562 gb KP710216.1	gi 640911543 gb KJ577612.1
gi 698947717 gb CP009495.1	gi 315435617 gb HM807431.1	gi 363990286 gb JN400393.1
gi 698938524 gb CP009494.1	gi 154278270 gb EF536970.1	gi 226934681 gb FJ859888.1
gi 399228992 gb CP001663.1	gi 148879038 emb AM421383.1	gi 183579276 gb EU591502.1
gi 315435633 gb HM807439.1	gi 115383156 gb DQ866790.1	gi 928471965 gb CP011868.1
gi 219671612 gb FJ590451.1	gi 1024325408 gb KU240542.1	gi 576647480 gb KF910298.1
gi 148879074 emb AM421401.1	gi 955654877 gb KU198411.1	gi 404551294 gb JX294409.1
gi 118168627 gb CP000480.1	gi 862570604 emb HG917972.2	gi 404551278 gb JX294401.1
gi 38174792 emb AJ605718.1	gi 404551266 gb JX294395.1	gi 698276646 gb KJ949020.1
gi 148879076 emb AM421402.1	gi 385246858 gb JQ081982.1	gi 698276642 gb KJ949018.1
gi 1024325412 gb KU240544.1	gi 295815610 gb HM022205.1	gi 698276636 gb KJ949015.1
gi 627792451 gb KJ586640.1	gi 221763243 gb EU220422.2	gi 698276622 gb KJ949008.1

GEMA BARBEITO CASTIÑEIRAS

gi 183989080 gb EU600786.1	gi 148879062 emb AM421395.1	gi 684133017 gb KJ957807.1
gi 148879080 emb AM421404.1	gi 148879050 emb AM421389.1	gi 295815636 gb HM022218.1
gi 51038425 gb AY684062.1	gi 118568029 gb CP000325.1	gi 295815614 gb HM022207.1
gi 1001184179 emb LN995671.1	gi 411107714 gb JX575123.1	gi 745794318 gb KM507937.1
gi 315435615 gb HM807430.1	gi 355344037 gb JN571257.1	gi 185179222 gb EU597598.1
gi 133872966 gb EF138819.1	gi 355344007 gb JN571242.1	gi 1017207219 gb CP015219.1
gi 78172769 gb DQ137416.1	gi 355343959 gb JN571218.1	gi 698276634 gb KJ949014.1
gi 1003466887 gb CP014475.1	gi 355343955 gb JN571216.1	gi 698276624 gb KJ949009.1
gi 213876744 gb FJ418062.1	gi 295814665 gb HM011173.1	gi 294992899 gb GU992871.1
gi 1001184177 emb LN995670.1	gi 295814661 gb HM011171.1	gi 256014693 gb FJ616956.1
gi 612176423 gb KJ586586.1	gi 183579266 gb EU591497.1	gi 113871076 gb DQ851569.1
gi 315435641 gb HM807443.1	gi 938485653 gb KT185538.1	gi 745794274 gb KM507915.1
gi 315435601 gb HM807423.1	gi 312451969 gb HM638453.1	gi 404551292 gb JX294408.1
gi 213876752 gb FJ418070.1	gi 158954687 gb EU109296.1	gi 374278693 gb JN866834.1
gi 213876750 gb FJ418065.1	gi 185179220 gb EU597597.1	gi 185179217 gb EU597595.1
gi 190694908 gb EU770580.1	gi 62720671 gb AY859705.1	gi 698276640 gb KJ949017.1
gi 183579284 gb EU591506.1	gi 62720665 gb AY859702.1	gi 758794546 gb KP161205.1
gi 819325434 gb KP644749.1	gi 1041040123 gb CP016192.1	gi 930828324 gb CP012752.1
gi 819325432 gb KP644748.1	gi 1041035406 gb CP016191.1	gi 578005119 gb CP007155.1
gi 819325430 gb KP644747.1	gi 1041030359 gb CP016190.1	gi 873551602 emb LN868939.1
gi 627792473 gb KJ586652.1	gi 1014887703 gb CP014959.1	gi 255918463 gb CP001630.1
gi 694173402 gb KM186139.1	gi 1014206045 gb CP014957.1	gi 54013472 dbj AP006618.1
gi 404551282 gb JX294403.1	gi 1014196153 gb CP014956.1	gi 319998250 gb HQ141572.1
gi 343407458 gb JF346875.1	gi 1014185322 gb CP014955.1	gi 188532107 gb EU684590.1
gi 1003098529 gb CP011022.1	gi 169239075 emb CU458896.1	gi 54013472 dbj AP006618.1
gi 674790876 gb CP006936.2	gi 873876620 gb CP012044.1	gi 451317005 gb KC352795.1
gi 390613681 gb CP003053.1	gi 946534980 gb CP013049.1	gi 873551602 emb LN868939.1
gi 995970841 gb KT695875.1	gi 701174647 gb CP009613.1	gi 822660254 gb KP636958.1
gi 404551272 gb JX294398.1	gi 690342032 gb CP009408.1	gi 1032535321 gb CP015773.1
gi 315435605 gb HM807425.1	gi 690335947 gb CP009407.1	gi 1006063767 gb CP014617.1
gi 619728092 gb KJ720535.1	gi 1002636253 gb KT779900.1	gi 1004319210 gb CP010968.1
gi 337732502 gb EU597590.2	gi 917548000 gb KT284833.1	gi 1003103374 gb CP014566.1

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS ...

gi 60218855 gb AY772165.1	gi 627792467 gb KJ586649.1	gi 1000829456 gb KU646990.1
gi 219958091 gb FJ531483.1	gi 576647340 gb KF910214.1	gi 984994143 gb CP010340.1
gi 183579280 gb EU591504.1	gi 576647338 gb KF910213.1	gi 984989958 gb CP010339.1
gi 395459729 gb JQ906698.1	gi 576647334 gb KF910211.1	gi 984985728 gb CP010338.1
gi 1001184181 emb LN995672.1	gi 635574949 emb LK021336.1	gi 984981517 gb CP010337.1
gi 699263036 gb KM234048.1	gi 635574947 emb LK021335.1	gi 984976917 gb CP010336.1
gi 355343977 gb JN571227.1	gi 448871646 gb JX083133.1	gi 984972452 gb CP010335.1
gi 158954699 gb EU109302.1	gi 385246846 gb JQ081976.1	gi 984967653 gb CP010334.1
gi 190694914 gb EU770583.1	gi 313759662 gb HQ404281.1	gi 984963331 gb CP010333.1
gi 413911353 gb KC113118.1	gi 313759624 gb HQ404262.1	gi 984959134 gb CP010332.1
gi 310877108 gb HQ009483.1	gi 295815632 gb HM022216.1	gi 984954355 gb CP010331.1
gi 1034244260 gb CP011491.1	gi 157062991 gb EU117207.1	gi 984950177 gb CP010330.1
gi 1024325406 gb KU240541.1	gi 154520236 gb EU031906.1	gi 984945858 gb CP010329.1
gi 699263032 gb KM234046.1	gi 183579260 gb EU591494.1	gi 971171538 gb CP013741.1
gi 699263030 gb KM234045.1	gi 34391546 gb AY147164.1	gi 927989386 gb CP011455.1
gi 404551286 gb JX294405.1	gi 34595754 gb AY262741.1	gi 923105817 gb CP012506.1
gi 355343981 gb JN571229.1	gi 974005069 dbj LC107149.1	gi 922675521 gb CP009243.1
gi 62720661 gb AY859700.1	gi 407304062 gb CP003876.1	gi 918453982 gb CP012090.1
gi 699263046 gb KM234053.1	gi 407304062 gb CP003876.1	gi 893678340 gb KP744372.1
gi 699263042 gb KM234051.1	gi 355344031 gb JN571254.1	gi 893678338 gb KP744371.1
gi 612176475 gb KJ586617.1	gi 355344029 gb JN571253.1	gi 893678336 gb KP744370.1
gi 433294648 gb CP003078.1	gi 355344027 gb JN571252.1	gi 893678627 gb CP012095.1
gi 158954697 gb EU109301.1	gi 355343967 gb JN571222.1	gi 857097266 gb CP008744.1
gi 699263034 gb KM234047.1	gi 355343961 gb JN571219.1	gi 769537622 gb CP010873.1
gi 190694904 gb EU770578.1	gi 343407450 gb JF346871.1	gi 31742509 emb BX248333.1
gi 1033471560 emb LT549889.1	gi 295814675 gb HM011178.1	gi 761544669 gb CP010895.1
gi 355343979 gb JN571228.1	gi 295814657 gb HM011169.1	gi 755917060 gb CP007299.1
gi 790347 gb U24494.1 MSU24494	gi 197944876 gb EU999025.1	gi 749193065 gb CP007027.1
gi 413911345 gb KC113114.1	gi 148879054 emb AM421391.1	gi 737516150 dbj AP014573.1
gi 62720657 gb AY859698.1	gi 827048817 gb KP401758.1	gi 702068662 emb HG813240.1
gi 815933415 gb KP676925.1	gi 805308331 gb KP890659.1	gi 690310687 gb CP009480.1
gi 815933413 gb KP676920.1	gi 699263054 gb KM234057.1	gi 690294709 gb CP009449.1

GEMA BARBEITO CASTIÑEIRAS

gi 815933411 gb KP676915.1	gi 381149693 gb JQ411536.1	gi 686575205 gb CP009427.1
gi 333484608 gb CP002329.1	gi 469615182 gb KC342200.1	gi 686571222 gb CP009426.1
gi 612176473 gb KJ586616.1	gi 207691930 gb FJ172339.1	gi 590920838 gb KJ371034.1
gi 352963810 gb JF923624.1	gi 158954681 gb EU109293.1	gi 671748780 gb CP009101.1
gi 699263026 gb KM234043.1	gi 148879056 emb AM421392.1	gi 671744865 gb CP009100.1
gi 346427154 gb JF712875.1	gi 148879048 emb AM421388.1	gi 669122404 gb CP008983.1
gi 627792479 gb KJ586655.1	gi 1026358345 gb KU144851.1	gi 669114883 gb CP008981.1
gi 295815622 gb HM022211.1	gi 1026358343 gb KU144850.1	gi 669110801 gb CP008980.1
gi 745794272 gb KM507914.1	gi 1026358309 gb KU144833.1	gi 669108091 gb CP008979.1
gi 289598457 gb GU564406.1	gi 1026358307 gb KU144832.1	gi 669104290 gb CP008978.1
gi 183579264 gb EU591496.1	gi 1026358297 gb KU144827.1	gi 669100516 gb CP008977.1
gi 627792469 gb KJ586650.1	gi 1026358295 gb KU144826.1	gi 669096251 gb CP008976.1
gi 627792449 gb KJ586639.1	gi 976929846 gb KP840591.1	gi 669092523 gb CP008975.1
gi 315435627 gb HM807436.1	gi 1014892468 gb CP014960.1	gi 669088828 gb CP008974.1
gi 702074166 gb KJ873244.1	gi 1002636251 gb KT779899.1	gi 669085449 gb CP008973.1
gi 346427158 gb JF712877.1	gi 1002636249 gb KT779898.1	gi 669082003 gb CP008972.1
gi 702074168 gb KJ873245.1	gi 1002636247 gb KT779897.1	gi 669079827 gb CP008971.1
gi 413911355 gb KC113119.1	gi 938485659 gb KT185541.1	gi 669076051 gb CP008970.1
gi 158954705 gb EU109305.1	gi 927278143 gb KT168289.1	gi 669073577 gb CP008969.1
gi 190694912 gb EU770582.1	gi 576647360 gb KF910224.1	gi 669069792 gb CP008968.1
gi 1028497411 gb CP015596.1	gi 576647350 gb KF910219.1	gi 669066845 gb CP008967.1
gi 404551290 gb JX294407.1	gi 576647342 gb KF910215.1	gi 669063436 gb CP008966.1
gi 190694910 gb EU770581.1	gi 399125319 gb JQ678807.1	gi 669060166 gb CP008965.1
gi 186660235 gb EU605693.1	gi 219671588 gb FJ590439.1	gi 669056685 gb CP008964.1
gi 448871652 gb JX083136.1	gi 315435579 gb HM807412.1	gi 669052560 gb CP008963.1
gi 392312056 gb JQ886108.1	gi 315435575 gb HM807410.1	gi 669048997 gb CP008962.1
gi 745794326 gb KM507941.1	gi 313759678 gb HQ404289.1	gi 669045193 gb CP008961.1
gi 413911343 gb KC113113.1	gi 313759640 gb HQ404270.1	gi 669041410 gb CP008960.1
gi 315435597 gb HM807421.1	gi 313759648 gb HQ404274.1	gi 669037569 gb CP008959.1
gi 62720647 gb AY859693.1	gi 295815618 gb HM022209.1	gi 655543725 gb CP007809.1
gi 745794268 gb KM507912.1	gi 219671586 gb FJ590438.1	gi 646273867 gb CP007803.1
gi 699263038 gb KM234049.1	gi 219671584 gb FJ590437.1	gi 597502018 gb KJ095683.1

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS ...

gi 62720659 gb AY859699.1	gi 154520240 gb EU031908.1	gi 594543418 gb CP003494.1
gi 315435585 gb HM807415.1	gi 185179203 gb EU597588.1	gi 585539546 gb CP002885.1
gi 310877315 gb HM807281.1	gi 148879058 emb AM421393.1	gi 585528731 gb CP002883.1
gi 190694916 gb EU770584.1	gi 148879046 emb AM421387.1	gi 585514057 gb CP002882.1
gi 161015974 gb EU254722.1	gi 468943839 gb KC315798.1	gi 585499635 gb CP002871.1
gi 815933407 gb KP676905.1	gi 408422567 emb FR695853.1	gi 569534005 gb KF771066.1
gi 815933405 gb KP676900.1	gi 296011771 gb HM029237.1	gi 569534003 gb KF771065.1
gi 413911357 gb KC113120.1	gi 295814743 gb HM011212.1	gi 569534001 gb KF771064.1
gi 62720669 gb AY859704.1	gi 295814715 gb HM011198.1	gi 569533999 gb KF771063.1
gi 1023044132 gb CP007220.1	gi 225348568 gb FJ786254.1	gi 569533997 gb KF771062.1
gi 1015670019 gb CP010071.1	gi 46361029 gb AY492286.1	gi 569533995 gb KF771061.1
gi 807052974 gb CP010946.1	gi 82795298 gb DQ288264.1	gi 569533993 gb KF771060.1
gi 197944874 gb EU999024.1	gi 987312420 gb KR025888.1	gi 569533991 gb KF771059.1
gi 144954313 gb EF202188.1	gi 341573828 gb JF271806.1	gi 569533989 gb KF771058.1
gi 34391544 gb AY147163.1	gi 341573803 gb JF271801.1	gi 569533987 gb KF771057.1
gi 34595752 gb AY262740.1	gi 699263024 gb KM234042.1	gi 569533985 gb KF771056.1
gi 817379475 gb KP281269.1	gi 381149691 gb JQ411535.1	gi 569533983 gb KF771055.1
gi 815933409 gb KP676910.1	gi 226934689 gb FJ859892.1	gi 569533981 gb KF771054.1
gi 672718468 gb KM196106.1	gi 185179213 gb EU597593.1	gi 569533979 gb KF771053.1
gi 355344063 gb JN571270.1	gi 183579282 gb EU591505.1	gi 569533977 gb KF771052.1
gi 355344055 gb JN571266.1	gi 156255564 gb EU090063.1	gi 569533975 gb KF771051.1
gi 355344051 gb JN571264.1	gi 62720663 gb AY859701.1	gi 569533973 gb KF771050.1
gi 355344049 gb JN571263.1	gi 341573818 gb JF271804.1	gi 559794742 gb CP003248.2
gi 207690914 gb FJ172331.1	gi 341573793 gb JF271799.1	gi 542043551 gb CP001664.1
gi 213876742 gb FJ418059.1	gi 701462252 dbj LC008146.1	gi 523435879 gb CP006578.1
gi 987312422 gb KR025889.1	gi 521363701 gb CP003347.1	gi 505808486 gb CP002884.1
gi 828180134 gb CP011773.1	gi 701188573 gb CP009614.1	gi 492073345 gb CP005387.1
gi 315435603 gb HM807424.1	gi 690324916 gb CP009482.1	gi 478739819 gb CP005082.1
gi 158954689 gb EU109297.1	gi 690305170 gb CP009493.1	gi 459650308 gb CP003900.2
gi 34391566 gb AY147174.1	gi 508732639 dbj AP012555.1	gi 451317001 gb KC352793.1
gi 355344067 gb JN571272.1	gi 576647386 gb KF910237.1	gi 444893469 emb AL123456.3
gi 355344053 gb JN571265.1	gi 576647380 gb KF910234.1	gi 440579446 emb HE663067.1

GEMA BARBEITO CASTIÑEIRAS

gi 62720649 gb AY859694.1	gi 576647362 gb KF910225.1	gi 432164605 emb FO203510.1
gi 371534687 gb JN881351.1	gi 576647356 gb KF910222.1	gi 432156676 emb FO203508.1
gi 207690912 gb FJ172330.1	gi 576647336 gb KF910212.1	gi 432152694 emb FO203507.1
gi 612176421 gb KJ586585.1	gi 381149687 gb JQ411533.1	gi 405113491 gb JX303331.1
gi 315435609 gb HM807427.1	gi 399125293 gb JQ678794.1	gi 405113489 gb JX303330.1
gi 145213092 gb CP000656.1	gi 320090107 gb HQ153091.1	gi 405113485 gb JX303328.1
gi 315259999 gb CP002385.1	gi 315435637 gb HM807441.1	gi 405113483 gb JX303327.1
gi 1041024973 gb CP016189.1	gi 315435581 gb HM807413.1	gi 405113477 gb JX303324.1
gi 359817839 gb CP003169.1	gi 313759660 gb HQ404280.1	gi 405113473 gb JX303322.1
gi 1013055887 gb CP011530.1	gi 295815626 gb HM022213.1	gi 405113453 gb JX303312.1
gi 34391560 gb AY147171.1	gi 243010743 gb GQ153306.1	gi 405113469 gb JX303320.1
gi 34391558 gb AY147170.1	gi 226934693 gb FJ859894.1	gi 405113463 gb JX303317.1
gi 355344047 gb JN571262.1	gi 226934691 gb FJ859893.1	gi 405113461 gb JX303316.1
gi 355344021 gb JN571249.1	gi 226934677 gb FJ859886.1	gi 405113459 gb JX303315.1
gi 355344017 gb JN571247.1	gi 152926447 gb EU009467.1	gi 405113457 gb JX303314.1
gi 355344003 gb JN571240.1	gi 157004966 gb EF521909.1	gi 405113445 gb JX303308.1
gi 243010741 gb GQ153305.1	gi 156255570 gb EU090066.1	gi 405113447 gb JX303309.1
gi 207692936 gb FJ172342.1	gi 156255568 gb EU090065.1	gi 392051818 gb CP001976.1
gi 1024325418 gb KU240547.1	gi 156255566 gb EU090064.1	gi 380723578 gb CP003234.1
gi 976929828 gb KP840557.1	gi 955654881 gb KU198413.1	gi 380719886 gb CP003233.1
gi 987390686 gb KT592292.1	gi 698276620 gb KJ949007.1	gi 379026087 dbj AP012340.1
gi 699263028 gb KM234044.1	gi 568232286 gb CP006996.1	gi 378543272 emb HE608151.1
gi 651231932 gb KJ607137.1	gi 118163506 gb CP000479.1	gi 356592064 gb CP002095.1
gi 34595750 gb AY262739.1	gi 311886853 emb FN563149.1	gi 344217818 gb CP002992.1
gi 392312054 gb JQ886107.1	gi 295814729 gb HM011205.1	gi 341599927 emb AM412059.2
gi 355344065 gb JN571271.1	gi 46361027 gb AY492285.1	gi 340003223 emb HE572590.1
gi 355344057 gb JN571267.1	gi 938485677 gb KT185550.1	gi 339329439 emb FR878060.1
gi 355344019 gb JN571248.1	gi 938485675 gb KT185549.1	gi 339296727 gb CP001642.1
gi 207690924 gb FJ172336.1	gi 612487418 gb KJ364653.1	gi 339293079 gb CP001641.1
gi 699263064 gb KM234062.1	gi 158954701 gb EU109303.1	gi 328456706 gb CP001662.1
gi 243010755 gb GQ153312.1	gi 185179205 gb EU597589.1	gi 290745667 gb GU561645.1
gi 190694906 gb EU770579.1	gi 115383170 gb DQ866797.1	gi 253318418 gb CP001658.1

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS ...

gi 62720653 gb AY859696.1	gi 1035933047 gb KX008971.1	gi 224771496 dbj AP010918.1
gi 355344023 gb JN571250.1	gi 1032995455 gb CP015495.1	gi 148719718 gb CP000717.1
gi 355343999 gb JN571238.1	gi 1026358359 gb KU144858.1	gi 148503909 gb CP000611.1
gi 355343997 gb JN571237.1	gi 1026358357 gb KU144857.1	gi 121491530 emb AM408590.1
gi 154184296 gb EU022519.1	gi 1026358355 gb KU144856.1	gi 50952454 gb AE000516.2
gi 148879064 emb AM421396.1	gi 1026358353 gb KU144855.1	gi 515684 gb U12205.1 MTU12205
gi 148879040 emb AM421384.1	gi 1026358351 gb KU144854.1	gi 690330613 gb CP009483.1
gi 363990291 gb JN400396.1	gi 1026358349 gb KU144853.1	gi 672354214 gb CP009110.1
gi 207690918 gb FJ172333.1	gi 1026358347 gb KU144852.1	gi 556021639 gb CP006835.1
gi 207690908 gb FJ172328.1	gi 1026358341 gb KU144849.1	gi 492065852 gb CP005386.1
gi 148879030 emb AM421379.1	gi 1026358339 gb KU144848.1	gi 405113465 gb JX303318.1
gi 375750259 gb CP003119.1	gi 1026358337 gb KU144847.1	gi 405113443 gb JX303307.1
gi 1041045138 gb CP016193.1	gi 1026358335 gb KU144846.1	gi 380450146 gb JQ582667.1
gi 1041020278 gb CP016188.1	gi 1026358333 gb KU144845.1	gi 326948588 gb CP002593.1
gi 731175139 dbj AP014547.1	gi 1026358331 gb KU144844.1	gi 208343772 gb FJ194539.1
gi 1014897074 gb CP014961.1	gi 1026358329 gb KU144843.1	gi 745794292 gb KM507924.1
gi 374843763 emb FO082843.1	gi 1026358327 gb KU144842.1	gi 569534007 gb KF771067.1
gi 1024325420 gb KU240548.1	gi 1026358325 gb KU144841.1	gi 405113481 gb JX303326.1
gi 243010747 gb GQ153308.1	gi 1026358323 gb KU144840.1	gi 405113475 gb JX303323.1
gi 169264488 gb EU370532.1	gi 1026358321 gb KU144839.1	gi 405113455 gb JX303313.1
gi 162286181 gb AY593981.2	gi 1026358319 gb KU144838.1	gi 256014695 gb FJ616957.1
gi 148879032 emb AM421380.1	gi 1026358317 gb KU144837.1	gi 253740488 gb GQ245966.1
gi 576647250 gb KF910161.1	gi 1026358315 gb KU144836.1	gi 468333 gb L27989.1 MSGRPOB
gi 355344005 gb JN571241.1	gi 1026358313 gb KU144835.1	gi 367465845 gb JN935397.1
gi 355344001 gb JN571239.1	gi 1026358311 gb KU144834.1	gi 366985102 gb JN986748.1
gi 268373733 gb GU139240.1	gi 1026358305 gb KU144831.1	gi 321172107 gb HQ880687.1
gi 448871663 gb JX083142.1	gi 1026358303 gb KU144830.1	gi 407879691 emb HE804045.1
gi 299013524 gb HM229788.1	gi 1026358301 gb KU144829.1	gi 133909243 emb AM420293.1
gi 169264486 gb EU370524.1	gi 1026358299 gb KU144828.1	gi 745794320 gb KM507938.1
gi 148879066 emb AM421397.1	gi 1002636255 gb KT779901.1	gi 633955471 gb KJ729109.1
gi 148879042 emb AM421385.1	gi 938485673 gb KT185548.1	gi 938485655 gb KT185539.1
gi 343407460 gb JF346876.1	gi 938485669 gb KT185546.1	gi 745794314 gb KM507935.1

GEMA BARBEITO CASTIÑEIRAS

gi 326694957 gb JF508479.1	gi 927278147 gb KT168291.1	gi 699263056 gb KM234058.1
gi 315435589 gb HM807417.1	gi 756081930 gb CP010114.1	gi 459376677 gb KC669530.1
gi 148879036 emb AM421382.1	gi 756072988 gb CP010113.1	gi 352963806 gb JF923622.1
gi 448871659 gb JX083140.1	gi 633955475 gb KJ729111.1	gi 492059766 gb CP004886.1
gi 403643428 gb CP002907.1	gi 494536091 gb CP005928.1	gi 290490551 dbj AB491287.1
gi 319998252 gb HQ141573.1	gi 399125329 gb JQ678812.1	gi 256014689 gb FJ616954.1
gi 262083393 gb CP001802.1	gi 399125327 gb JQ678811.1	gi 169247688 gb EU370229.1
gi 243010759 gb GQ153314.1	gi 399125323 gb JQ678809.1	gi 352963808 gb JF923623.1
gi 148879034 emb AM421381.1	gi 388564865 gb JQ599258.2	gi 219932450 emb FM211192.1
gi 699263044 gb KM234052.1	gi 320202798 emb FR775976.1	gi 13093428 emb AL583923.1
gi 413911359 gb KC113121.1	gi 315435619 gb HM807432.1	gi 44382 emb Z14314.1
gi 207690910 gb FJ172329.1	gi 313759628 gb HQ404264.1	gi 451316971 gb KC352778.1
gi 158954673 gb EU109289.1	gi 313759622 gb HQ404261.1	gi 336318021 gb HM586100.1
gi 158954671 gb EU109288.1	gi 295815628 gb HM022214.1	gi 185179224 gb EU597599.1
gi 158954667 gb EU109286.1	gi 243010751 gb GQ153310.1	gi 451316999 gb KC352792.1
gi 71148462 gb DQ068743.1	gi 241897476 gb GQ178075.1	gi 185179215 gb EU597594.1
gi 1014218050 gb CP014958.1	gi 226934687 gb FJ859891.1	gi 404551270 gb JX294397.1
gi 1014174528 gb CP014954.1	gi 157851001 gb EF584433.1	gi 769526933 gb CP010797.1
gi 1014163170 gb CP014953.1	gi 157004964 gb EF521908.1	gi 451316973 gb KC352779.1
gi 1014144265 gb CP014951.1	gi 160337105 gb EU220421.1	gi 198448643 gb EU287435.2
gi 378802229 gb CP003323.1	gi 41400296 gb AE016958.1	gi 169247684 gb EU370227.1
gi 506960221 gb CP004374.1	gi 938485665 gb KT185544.1	gi 190149255 gb EU203594.2
gi 1002636231 gb KT779889.1	gi 576082433 gb CP006850.1	gi 1018275532 gb CP015235.1
gi 1002636229 gb KT779888.1	gi 343407452 gb JF346872.1	gi 745794316 gb KM507936.1
gi 1002636215 gb KT779881.1	gi 298162153 gb HM069330.1	gi 1039680091 gb CP016174.1
gi 1002636207 gb KT779877.1	gi 295814711 gb HM011196.1	gi 1017211286 gb CP015220.1
gi 1002636205 gb KT779876.1	gi 295814707 gb HM011194.1	gi 970862235 gb CP007255.1
gi 995970839 gb KT695874.1	gi 295814703 gb HM011192.1	gi 296179587 gb CP001958.1
gi 341573813 gb JF271803.1	gi 295814693 gb HM011187.1	gi 311225233 gb CP002299.1
gi 701184041 gb CP009616.1	gi 295814681 gb HM011181.1	gi 1035337757 gb CP015961.1
gi 701179514 gb CP009615.1	gi 938485671 gb KT185547.1	gi 667678325 gb CP008953.1
gi 699263074 gb KM234067.1	gi 938485667 gb KT185545.1	gi 115383162 gb DQ866793.1

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS ...

gi 576647254 gb KF910163.1	gi 545714260 gb KF224996.1	gi 745794296 gb KM507926.1
gi 690289480 gb CP009447.1	gi 115383158 gb DQ866791.1	gi 183579278 gb EU591503.1
gi 649943780 gb CP003699.2	gi 1002636257 gb KT779902.1	gi 459376687 gb KC669535.1
gi 523585813 gb KF360857.1	gi 955654879 gb KU198412.1	gi 755970769 gb CP007790.1
gi 381149689 gb JQ411534.1	gi 938485691 gb KT185557.1	gi 672718466 gb KM196105.1
gi 343407454 gb JF346873.1	gi 938485689 gb KT185556.1	gi 404551274 gb JX294399.1
gi 303325237 gb HM853023.1	gi 938485679 gb KT185551.1	gi 256014679 gb FJ616949.1
gi 303325235 gb HM853022.1	gi 938485651 gb KT185537.1	gi 185179193 gb EU597583.1
gi 243010745 gb GQ153307.1	gi 699263040 gb KM234050.1	gi 183579272 gb EU591500.1
gi 190694902 gb EU770577.1	gi 583844020 gb KF856622.1	gi 808767303 gb CP011295.1
gi 185179201 gb EU597587.1	gi 577861911 emb HG810919.1	gi 532219856 gb CP003761.1
gi 938485661 gb KT185542.1	gi 411107716 gb JX575124.1	gi 226182604 dbj AP008957.1
gi 169247686 gb EU370228.1	gi 404551280 gb JX294402.1	gi 413911347 gb KC113115.1
gi 115383172 gb DQ866798.1	gi 374278691 gb JN866833.1	gi 755908329 gb CP007219.1
gi 62720667 gb AY859703.1	gi 313759632 gb HQ404266.1	gi 404551298 gb JX294411.1
gi 1002636217 gb KT779882.1	gi 313759630 gb HQ404265.1	gi 185179211 gb EU597592.1
gi 1001184189 emb LN995676.1	gi 296025884 gb CP001966.1	gi 169247683 gb EU370226.1
gi 1001184187 emb LN995675.1	gi 295815630 gb HM022215.1	gi 46360931 gb AY492237.1
gi 341573823 gb JF271805.1	gi 157851003 gb EF584434.1	gi 46360923 gb AY492233.1
gi 341573798 gb JF271800.1	gi 507847312 gb KC960546.1	gi 358250192 emb HE613443.1
gi 576647268 gb KF910170.1	gi 303325239 gb HM853024.1	gi 258553496 gb CP001737.1
gi 576647256 gb KF910164.1	gi 295814701 gb HM011191.1	gi 505812666 gb CP003410.1
gi 381149699 gb JQ411539.1	gi 295814679 gb HM011180.1	gi 185179218 gb EU597596.1
gi 381149695 gb JQ411537.1	gi 295814677 gb HM011179.1	gi 699263066 gb KM234063.1
gi 405126727 gb CP002275.1	gi 699263070 gb KM234065.1	gi 334105928 gb CP002810.1
gi 1014135708 gb CP014950.1	gi 699263058 gb KM234059.1	gi 404551300 gb JX294412.1
gi 448871665 gb JX083143.1	gi 374306677 gb JN661704.1	gi 768311912 gb CP007699.1
gi 386786868 gb CP003491.1	gi 938485685 gb KT185554.1	gi 332337569 gb CP002666.1
gi 378807379 gb CP003324.1	gi 886827290 emb LN850107.1	gi 334857119 gb CP002801.1
gi 378797084 gb CP003322.1	gi 399125287 gb JQ678791.1	gi 296019684 gb CP001964.1
gi 326694961 gb JF508481.1	gi 315435631 gb HM807438.1	gi 283807292 gb CP001736.1
gi 315435599 gb HM807422.1	gi 313759652 gb HQ404276.1	gi 158107272 gb CP000820.1

GEMA BARBEITO CASTIÑEIRAS

gi 243010729 gb GQ153299.1	gi 313759646 gb HQ404273.1	gi 46361019 gb AY492281.1
gi 213876746 gb FJ418063.1	gi 295815624 gb HM022212.1	gi 955654885 gb KU198415.1
gi 213876736 gb FJ418052.1	gi 226934673 gb FJ859884.1	gi 358250188 emb HE613441.1
gi 213876732 gb FJ418047.1	gi 160337111 gb EU220424.1	gi 451902131 gb CP003697.1
gi 62720645 gb AY859692.1	gi 976929830 gb KP840562.1	gi 296090785 gb CP001874.1
gi 955654883 gb KU198414.1	gi 1002636245 gb KT779896.1	gi 973193275 gb CP011502.1
gi 627792447 gb KJ586638.1	gi 1002636243 gb KT779895.1	gi 529195098 gb CP006259.1
gi 355344059 gb JN571268.1	gi 1002636241 gb KT779894.1	gi 492002190 gb CP005929.1
gi 346427152 gb JF712874.1	gi 1002636239 gb KT779893.1	gi 46361031 gb AY492287.1
gi 319919236 gb HQ127228.1	gi 927278149 gb KT168292.1	gi 972705425 emb LN997842.1
gi 169264484 gb EU370515.1	gi 640911540 gb KJ577611.1	gi 288558675 dbj AB516306.1
gi 148879070 emb AM421399.1	gi 371534662 gb JN935808.1	gi 852460626 gb CP011799.1
gi 976929838 gb KP840580.1	gi 363990281 gb JN400390.1	gi 827433367 gb CP011497.1
gi 968195281 gb KR856203.1	gi 311324411 gb HM627012.1	gi 1037185465 emb LT594324.1
gi 207692934 gb FJ172341.1	gi 295814683 gb HM011182.1	gi 311893446 dbj AP010968.1
gi 207691928 gb FJ172338.1	gi 226237899 dbj AP011115.1	gi 46360979 gb AY492261.1
gi 207690920 gb FJ172334.1	gi 148879052 emb AM421390.1	gi 692319829 gb CP009438.1
gi 158954703 gb EU109304.1	gi 938485683 gb KT185553.1	gi 675824235 gb CP009215.1
gi 158954693 gb EU109299.1	gi 938485657 gb KT185540.1	gi 111147037 emb CT573213.2
gi 158954677 gb EU109291.1	gi 699263068 gb KM234064.1	gi 745794286 gb KM507921.1
gi 158954675 gb EU109290.1	gi 448871648 gb JX083134.1	gi 745794264 gb KM507910.1
gi 158954669 gb EU109287.1	gi 371534685 gb JN881350.1	gi 398359421 gb JX041988.1
gi 1024325416 gb KU240546.1	gi 371534681 gb JN881348.1	gi 398359415 gb JX041985.1
gi 987312418 gb KR025887.1	gi 347811070 gb JF804804.1	gi 336102715 gb CP002665.1
gi 1002636201 gb KT779874.1	gi 226934671 gb FJ859883.1	gi 1001839319 gb CP014485.1
gi 753220771 gb KM973030.1	gi 158954695 gb EU109300.1	gi 971347791 gb CP013142.1
gi 576647270 gb KF910171.1	gi 160337109 gb EU220423.1	gi 947251633 gb CP009802.1
gi 681956685 gb KJ920345.1	gi 115383168 gb DQ866796.1	gi 953779698 gb CP013219.1
gi 355343993 gb JN571235.1	gi 938485681 gb KT185552.1	gi 874526668 gb KP722021.1
gi 326694959 gb JF508480.1	gi 459376689 gb KC669536.1	gi 723622094 gb CP009896.1
gi 315435577 gb HM807411.1	gi 404551284 gb JX294404.1	gi 477542455 gb CP004370.1
gi 207691932 gb FJ172340.1	gi 167540464 gb EF584444.1	gi 46360989 gb AY492266.1

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS ...

gi 976929844 gb KP840588.1	gi 164472696 gb EU341971.1	gi 46360987 gb AY492265.1
gi 725542684 gb KM392057.1	gi 927278141 gb KT168288.1	gi 398359403 gb JX041979.1
gi 355344069 gb JN571273.1	gi 745794270 gb KM507913.1	gi 358250190 emb HE613442.1
gi 355344061 gb JN571269.1	gi 669176684 gb CP008947.1	gi 297153409 gb CP002047.1
gi 355344043 gb JN571260.1	gi 611962931 gb KJ409445.1	gi 924539656 gb CP011522.1
gi 355344009 gb JN571243.1	gi 459376683 gb KC669533.1	gi 568605513 gb KF551873.1
gi 355343995 gb JN571236.1	gi 346427150 gb JF712873.1	gi 521353217 gb CP006567.1
gi 296041314 gb HM030494.1	gi 183579268 gb EU591498.1	gi 238626047 gb FJ438820.1
gi 194293710 gb EU834057.1	gi 169247690 gb EU370230.1	gi 86565586 gb CP000249.1
gi 315435595 gb HM807420.1	gi 442569743 gb JX566892.1	gi 398359417 gb JX041986.1
gi 255762381 gb FJ607776.1	gi 226934685 gb FJ859890.1	gi 398359413 gb JX041984.1
gi 158954665 gb EU109285.1	gi 158954679 gb EU109292.1	gi 398359411 gb JX041983.1
gi 185179189 gb EU597581.1	gi 115383160 gb DQ866792.1	gi 398359407 gb JX041981.1
		gi 183989082 gb EU600787.1

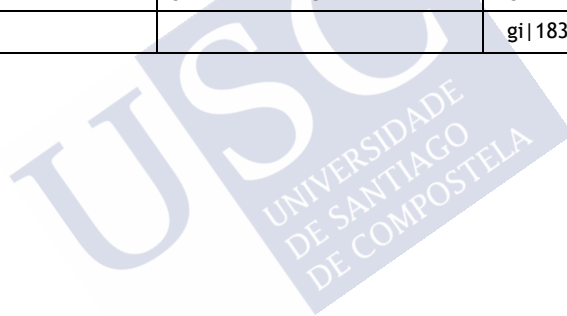


Tabla 12. Muestras clínicas, identificación con GenoType®, análisis filogenético, BLAST, % similitud con BLAST, identificación con MALDI-TOF y puntuación de MALDI-TOF. Adaptada de Costa-Alcalde et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018.

NÚMERO DE MUESTRA	MUESTRA	GenoType®	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	BLAST	% SIMILITUD	MALDI-TOF	MALDI-TOF score
1	Espuito	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	99,86	<i>M. abscessus</i>	2,019
2	Espuito	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	100,00	<i>M. abscessus</i>	2,027
3	Lavado broncoalveolar	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	100,00	<i>M. abscessus</i>	2,162
4	Espuito	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	99,86	<i>M. abscessus</i>	2,169
5	Lavado broncoalveolar	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	100,00	<i>M. abscessus</i>	2,174
6	Espuito	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	100,00	<i>M. abscessus</i>	2,191
7	Espuito	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	100,00	<i>M. abscessus</i>	2,225
8	Aspirado bronquial	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	100,00	<i>M. abscessus</i>	2,273
9	Espuito	<i>M. abscessus</i>	**	**		<i>M. abscessus</i>	2,011
10	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	99,69	<i>M. chelonae</i>	1,87
11	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	1,873
12	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	1,93
13	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	1,993
14	Biopsia cutánea	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,005
15	Biopsia cutánea	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,012

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS ...

NÚMERO DE MUESTRA	MUESTRA	GenoType®	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	BLAST	% SIMILITUD	MALDI-TOF	MALDI-TOF score
16	Biopsia cutánea	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	99,69	<i>M. chelonae</i>	2,03
17	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,041
18	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	99,86	<i>M. chelonae</i>	2,043
19	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,057
20	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,063
21	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,098
22	Exudado úlcera corneal	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	98,66	<i>M. chelonae</i>	2,117
23	Biopsia cutánea	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,131
24	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	100,00	<i>M. chelonae</i>	2,231
25	Espuito	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	99,86	<i>M. chelonae</i>	2,338
26	Espuito	<i>M. chelonae</i>	**	**		<i>M. chelonae</i>	2,112
27	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. alvei</i>	<i>M. alvei</i>	99,08	<i>M. peregrinum</i>	1,717
28	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. alvei</i>	<i>M. alvei</i>	99,20	<i>M. boenickei/peregrinum</i>	1,757
29	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. alvei /peregrinum</i>	<i>M. alvei</i>	98,96	<i>M. conceptionense</i>	1,781
30	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	99,20	<i>M. fortuitum</i>	2,046
31	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	98,29	<i>M. fortuitum</i>	2,133
32	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	100,00	<i>M. fortuitum</i>	2,265
33	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	99,56	<i>M. mageritense</i>	1,715
34	Orina	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	100,00	<i>M. mageritense</i>	1,98

GEMA BARBEITO CASTIÑEIRAS

NÚMERO DE MUESTRA	MUESTRA	GenoType®	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	BLAST	% SIMILITUD	MALDI-TOF	MALDI-TOF score
35	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	99,22	<i>M. mageritense</i>	2,089
36	Aspirado bronquial	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	99,37	<i>M. mageritense</i>	2,125
37	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	100,00	<i>M. mageritense</i>	2,227
38	Aspirado bronquial	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	100,00	<i>M. peregrinum</i>	1,978
39	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	98,92	<i>M. peregrinum</i>	2,037
40	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	100,00	<i>M. peregrinum</i>	2,269
41	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	100,00	<i>M. peregrinum</i>	2,269
42	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. septicum</i>	<i>M. septicum</i>	95,01	<i>M. septicum</i>	1,704
43	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. setense</i>	<i>M. setense</i>	98,96	<i>M. alvei</i>	1,843
44	Espuito	<i>M. fortuitum</i>	**	**		<i>M. conceptionense</i>	1,89
45	Espuito	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>M. monacense/duvalii</i>	<i>M. duvalii</i>	91,91	<i>M. vaccae</i>	1,46
46	Líquido pleural	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	100,00	<i>M. mucogenicum</i>	2,04

\*\*no amplificable por PCR

Tabla 13. Identificación por secuenciación parcial de *rpoB*. Amplitud del amplicón *rpoB* y porcentaje de similitud con las secuencias de GenBank. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018.

IDENTIFICACIÓN <i>rpoB</i>	n	Amplitud amplicón <i>rpoB</i>			% SIMILITUD		
		Mín	Med	Máx	Mín	Med	Máx
<i>M. abscessus</i>	8	617	644,	710	99,86	100,00	100,00
<i>M. alvei</i>	3	628	654	672	98,96	99,08	99,2
<i>M. chelonae</i>	16	384	632	704	98,66	100,00	100,00
<i>M. dubalii</i>	1	705	705	705	91,91	91,91	91,91
<i>M. fortuitum</i>	3	631	638	642	98,29	99,69	100,00
<i>M. mageritense</i>	5	516	632	688	99,22	99,56	100,00
<i>M. mucogenicum</i>	1	435	435	435	100,00	100,00	100,00
<i>M. peregrinum</i>	4	278	658	709	98,92	100,00	100,00
<i>M. septicum</i>	1	702	702	702	95,01	95,01	95,01
<i>M. setense</i>	1	673	673	673	98,96	98,96	98,96
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>278</b>	<b>649,25</b>	<b>710</b>	<b>91,91</b>	<b>99,63</b>	<b>100,00</b>

\*Mín: Mínimo; Med: Mediana; Máx: Máximo

Tabla 14. Identificación mediante secuenciación parcial de *rpoB* con cepas de referencia obtenidas de GenBank. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018

Identificación	n	Número de acceso de GenBank
<i>Mycobacterium abscessus</i> UC22, genoma completo	8	CP012044.1
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> cepa MC1518, genoma completo	8	CP009613.1
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> cepa 14 069 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	8	KT185557.1
<i>Mycobacterium alvei</i> cepa CIP103464 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	3	HM807430.1
<i>Mycobacterium chelonae</i> genoma completo	2	CP010946.1
<i>Mycobacterium chelonae</i> cepa ATCC 19237 gen <i>rpoB</i> , secuencia codificante completa	2	AY262740.1
<i>Mycobacterium chelonae</i> cepa D8 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	1	EU109290.1
<i>Mycobacterium chelonae</i> cepa PCH-038 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	5	JN400396.1
<i>Mycobacterium chelonae</i> cepa U5 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	6	EU109288.1
<i>Mycobacterium duvalii</i> cepa FI-08127 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	1	FJ418062.1
<i>Mycobacterium fortuitum</i> cepa ATCC 49403T <i>RpoB</i> ( <i>rpoB</i> ) gen, secuencia codificante completa	1	AY147173.1
<i>Mycobacterium fortuitum</i> cepa FI-09299 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ) , secuencia codificante parcial	1	HM807433.1
<i>Mycobacterium fortuitum</i> cepa FI-10131 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	1	HM807443.1
<i>Mycobacterium mageritense</i> cepa ATCC 700351 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	5	JF706630.1
<i>Mycobacterium mucogenicum</i> cepa Coh <i>RpoB</i> ( <i>rpoB</i> ) gen, secuencia codificante parcial	1	DQ068742.1
<i>Mycobacterium peregrinum</i> ATCC:700686 <i>RpoB</i> ( <i>rpoB</i> ) gen, secuencia codificante parcial	2	EU591498.1
<i>Mycobacterium peregrinum</i> cepa ATCC 14467 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	2	JF712876.1
<i>Mycobacterium septicum</i> cepa ATCC 700731T <i>RpoB</i> ( <i>rpoB</i> ) gen, secuencia codificante completa	1	AY147167.1
<i>Mycobacterium setense</i> cepa ABO-M06 Subunidad-beta del gen de la ARN polimerasa ( <i>rpoB</i> ), secuencia codificante parcial	1	EF138819.1



Figura 2. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 593 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018.

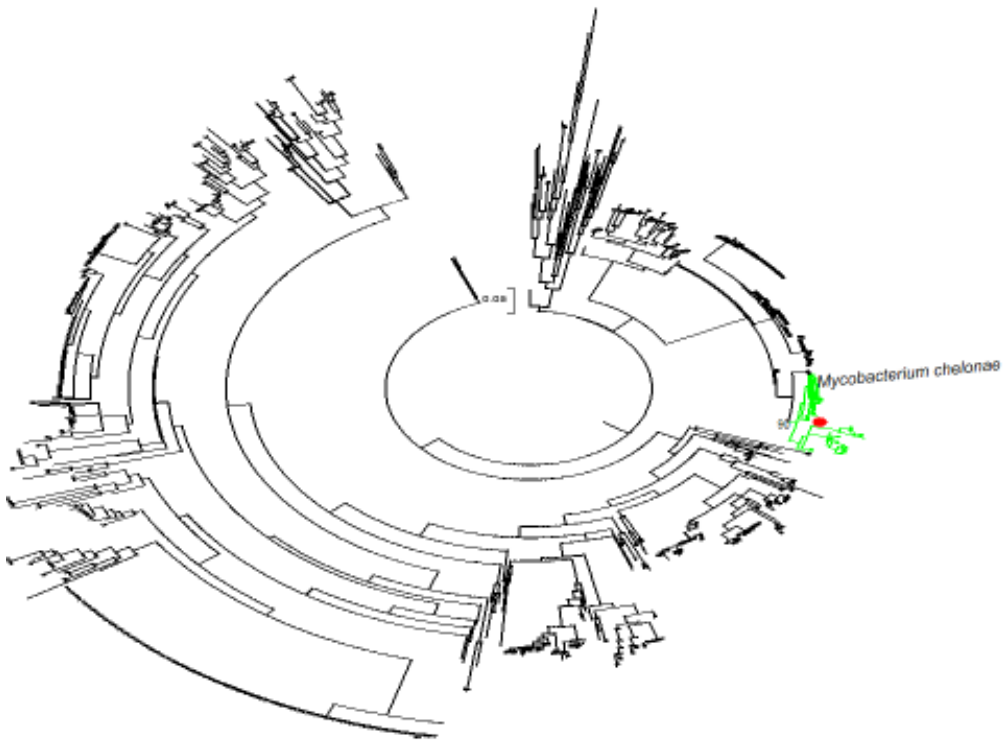


Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial *Mycobacterium rpoB* 612 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018.

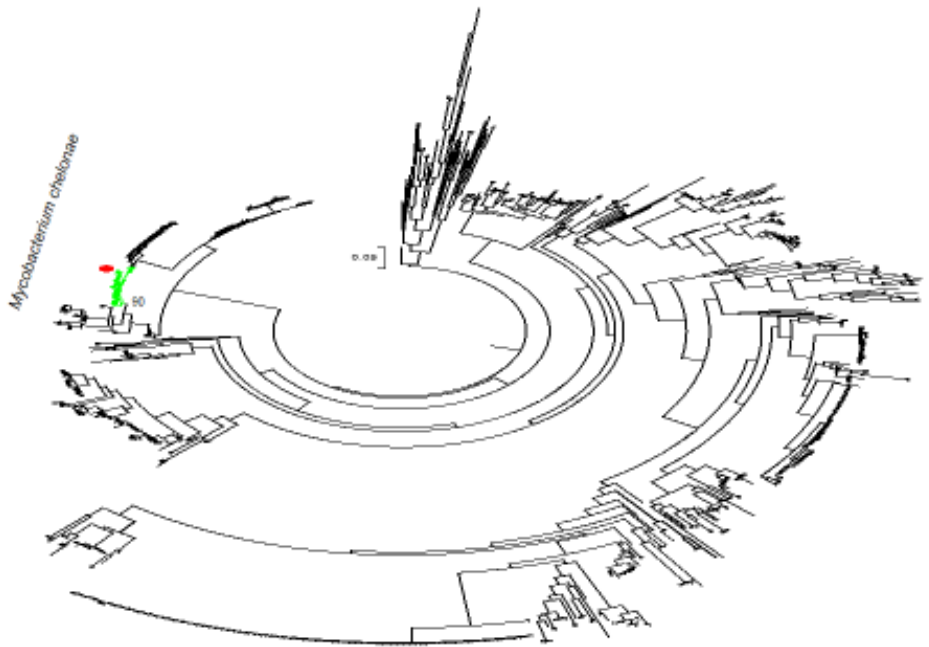


Figura 4. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 80%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 384 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018.

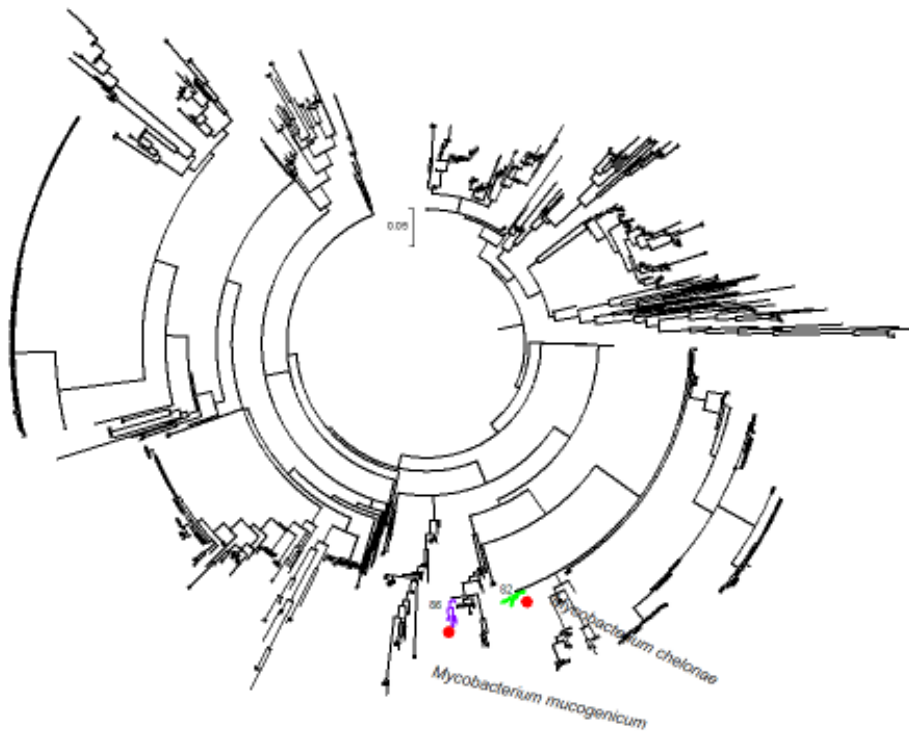


Figura 5. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 317 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018.

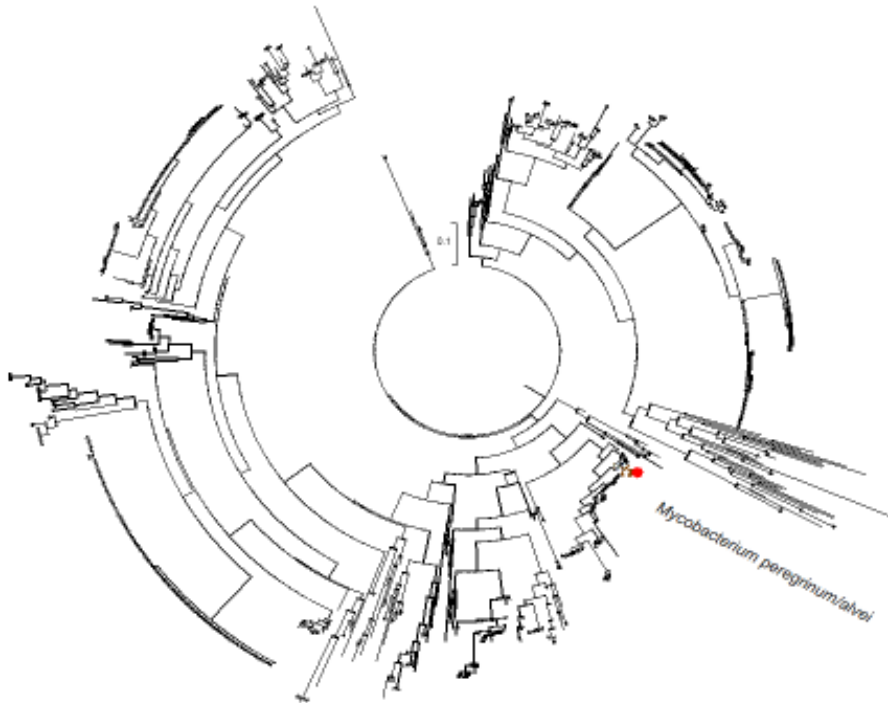


Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud (GTR más I más G; aLRT > 80%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 529 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018.

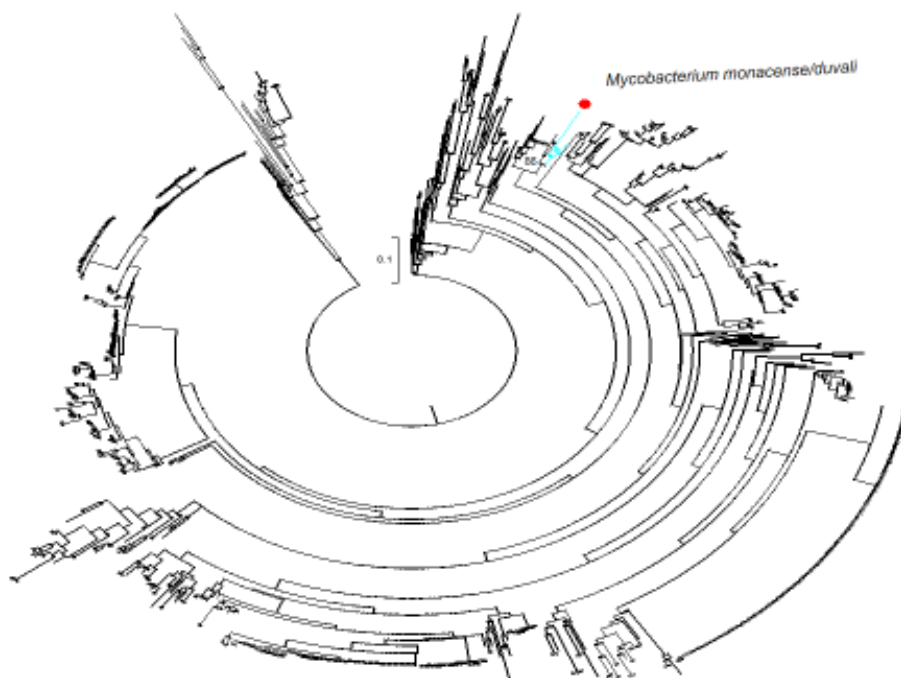


Figura 7. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLR T> 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 274 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018.

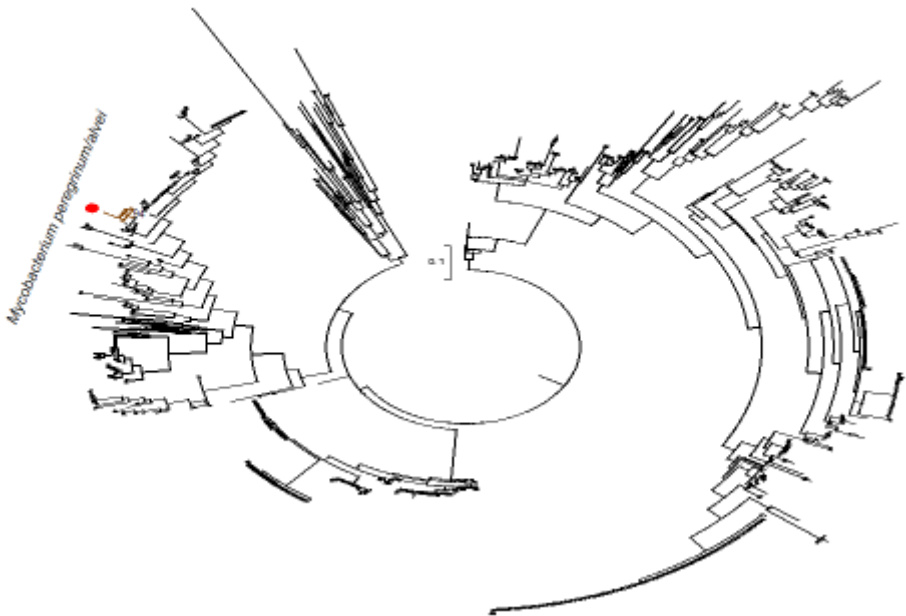
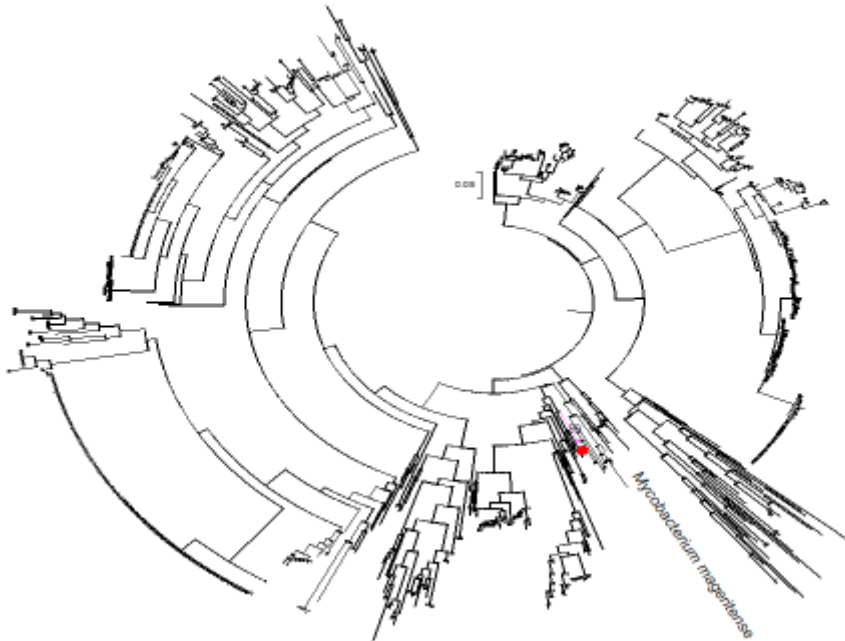


Figura 8. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 274 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018.



6

**MICOBACTERIAS NO  
TUBERCULOSAS Y SU RELACIÓN  
CON LA TUBERCULOSIS EN  
EL ÁREA SANITARIA DE  
SANTIAGO DE COMPOSTELA  
(2006-2015)**



## **6. MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU RELACIÓN CON LA TUBERCULOSIS EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (2006-2015)**

### **6.1. Introducción**

La tuberculosis es conocida por su morbilidad y mortalidad. Causa enfermedad en millones de personas cada año, y es una de las principales causas de mortalidad en el mundo junto con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (121). La incidencia de la tuberculosis ha ido disminuyendo gradualmente en los países industrializados (122).

En los últimos años las micobacterias no tuberculosas (MNT) han tomado relevancia, aumentando el número de aislamientos en los Servicios de Microbiología Clínica, llegando a representar entre el 30-50% de los aislamientos del total de micobacterias (123).

El tratamiento de las enfermedades causadas por micobacterias se ha complicado notablemente, debido al aumento en la resistencia en los escasos antibióticos disponibles (31,124).

La posible relación epidemiológica de infecciones por *M.tuberculosis* complex y MNT no está bien entendida, algunos estudios sugieren que los incrementos locales documentados en las tasas de infección por MNT coinciden con la disminución de las de

MTUC. Se ha intentado objetivar si existe una relación entre el aumento de MNT y la disminución de MTUC. La primera explicación es desde el punto de vista de la inmunidad: un fenómeno de reactividad cruzada entre ambas y defectos inmunes que favorecen la enfermedad por MNT, sin embargo no se ha podido demostrar porque ambas enfermedades aparecen desde un punto de vista geográfico en distintas poblaciones (125). La segunda explicación sería que no están relacionadas, pero si existe un vínculo común entre ellas, que sería la mejora en la calidad de vida (126). La mejora en la nutrición y la calidad de vida se relacionan con una disminución de MTUC. Al mismo tiempo, factores como el suministro de aguas centralizado se han relacionado con un aumento de MNT (127), al igual que algunos procedimientos diagnósticos (broncoscopias, líquidos de diálisis) y cosméticos (mesoterapia) (15,128). Por último, puede que no exista ningún tipo de relación y sea un proceso multifactorial. La disminución de MTUC está en relación a la mejora en la calidad de vida y a los programas de control de la enfermedad. El incremento en enfermedad por MNT puede ser real o espurio, debido al mayor número de investigaciones y a la mejora de las pruebas diagnósticas en los laboratorios. Si el incremento es real se puede relacionar con el paciente, el patógeno o la interacción entre ambos. Un aumento en el envejecimiento poblacional implica mayor población con enfermedades estructurales pulmonares, tumores, VIH, diabetes mellitus (DM) e insuficiencia renal. Sabemos además que puede haber cambios en la virulencia de las MNT (129). Por último, cambios como el uso de la ducha, favorecen la exposición respiratoria por aerosoles a las MNT que pueden encontrarse en el agua (125).

Santiago de Compostela (Galicia) pertenece a un área geográfica donde las tasas de TB eran elevadas la pasada década, y se llevó a cabo la puesta en marcha del Programa Gallego de Prevención y Control de la tuberculosis. En el Hospital Clínico de Santiago está el Laboratorio de Referencia de Micobacterias de Galicia, que realiza identificación y estudio de sensibilidad de TB para toda Galicia, pero solamente realiza el estudio de MNT para el área sanitaria de Santiago de Compostela (33).

La incidencia de TB en Galicia cambió de 72,9 casos por 100.000 habitantes en 1996 a 24,6 casos por 100.000 habitantes en 2011, según datos del Programa Gallego de Prevención y Control de la Tuberculosis (34). Los casos de MNT no están documentados en Galicia.

El conocimiento de la situación epidemiológica y de los factores clínicos asociados, puede facilitar el diagnóstico y la instauración de un tratamiento precozmente y rentabilizar los medios microbiológicos para detectar MTUC o MNT en las distintas áreas sanitarias (88).

El manejo de ambas enfermedades es diferente desde el punto de vista de la salud pública, clínico y microbiológico. El diagnóstico de tuberculosis en un paciente bacilífero conlleva aislamiento respiratorio del paciente y un estudio de contactos, con el coste social de absentismo laboral o escolar, y sanitario por las pruebas a los contactos (88). En la enfermedad por MNT no es necesario. El tratamiento médico emplea el uso de antibióticos diferentes para cada una de las enfermedades. El uso inadecuado de los antibióticos produce un posible daño al paciente por no estar recibiendo el tratamiento adecuado, por los posibles efectos adversos y además repercute en la población porque conlleva un aumento en la resistencia

farmacológica. Desde el punto de vista microbiológico, las técnicas están diseñadas para optimizar la detección de *M. tuberculosis* complex, y solamente se hace una labor específica para MNT en casos seleccionados por su relevancia clínica.

El objetivo general de este trabajo es comprobar si existe una relación entre la disminución en la incidencia en la enfermedad tuberculosa y el aumento de incidencia en la enfermedad producida por micobacterias no tuberculosas. Los objetivos específicos son: conocer la incidencia de las enfermedades por micobacterias en el área sanitaria de Santiago de Compostela, diferenciando entre tuberculosis y micobacterias no tuberculosas; identificar las variables que se relacionan con la enfermedad por tuberculosis y micobacterias no tuberculosas, y predecir ante la sospecha de enfermedad por micobacterias si se trata de MTUC o MNT; y analizar si existe un cambio de tendencia en la prevalencia e incidencia de cada una de las enfermedades.

Conocer la situación epidemiológica actual nos ayudará a plantear un mejor protocolo diagnóstico y terapéutico en la enfermedad por micobacterias en nuestra área.

## **6.2. Material y métodos**

Es un estudio descriptivo retrospectivo, en el período comprendido entre los años 2006-2015, cuyo ámbito de realización son todos los pacientes del área sanitaria de Santiago de Compostela (456 874 habitantes de media; mínimo 448 608 en 2015 y máximo 464 874 en 2010) diagnosticados de enfermedad por micobacterias en el período.

La estructura sanitaria está formada por cinco hospitales (Hospital Clínico, Hospital Gil Casares, Hospital Provincial, Hospital Psiquiátrico de Conxo y Hospital del Barbanza); y 75 centros de atención primaria. Consta de una unidad multidisciplinar dedicada al estudio de la tuberculosis (UTB) y el LRMG.

Los criterios de inclusión y exclusión son aquellos definidos como criterios de enfermedad tuberculosa, por la Organización Mundial de la Salud de 2015 (121) y para la enfermedad por micobacterias no tuberculosas por la American Thoracic Society / Infectious Diseases Society of America de 2007 (18).

Las fuentes de datos fueron la historia clínica electrónica de Galicia (IANUS®), los datos del Programa Gallego de Tuberculosis (SITUB®) y los obtenidos a través del sistema informático del Servicio de Microbiología (Openlab®).

Mediante Openlab® obtuvimos los datos de todos los aislamientos de micobacterias, y el número total de muestras procesadas para estudio. Los casos clínicos diagnosticados de enfermedad por *M.tuberculosis* complex se extrajeron de SITUB®, y los registros de las variables clínicas y demográficas de estos pacientes fueron facilitados por la Consellería de Sanidade. El uso de IANUS® nos permitió revisar la historia clínica de todos los pacientes con aislamientos de micobacterias no tuberculosas, para identificar los casos clínicamente significativos cumpliendo las normas de la ATS/IDSA de 2007 (18) y el registro de las variables demográficas y clínicas.

El procesamiento de las muestras clínicas se realizó mediante las técnicas ya descritas en los capítulos anteriores: tinción de auramina,

cultivo en medio líquido (MGIT, Bactec 960; Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos) durante 45 días y cultivo en medio sólido (Coletsos; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) durante 8 semanas. La identificación se realizó mediante Genotype Mycobacterium AS VER 1.0, Genotype Mycobacterium CM VER 1.0, y Genotype Mycobacterium MTBC VER 1.X (Hain Lifescience, Alemania) y reducción de nitratos. Para el análisis de las especies, tomaremos como *M. avium* complex las cepas identificadas como *M. avium* spp. , analizando de manera independiente como *M.intracellulare* aquellas cepas identificadas como *M.intracellulare/M.chimaera*.

El registro de los datos se realizó en la plataforma Microsoft Office 2010 (Washington, Estados Unidos) y el análisis mediante Stata 13 (StataCorp. 2013. *Stata Statistical Software: Release 13*. College Station, TX: StataCorp LP.)

Los resultados se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes en el caso de variables cualitativas, y en medias y desviación estándar en las variables cuantitativas.

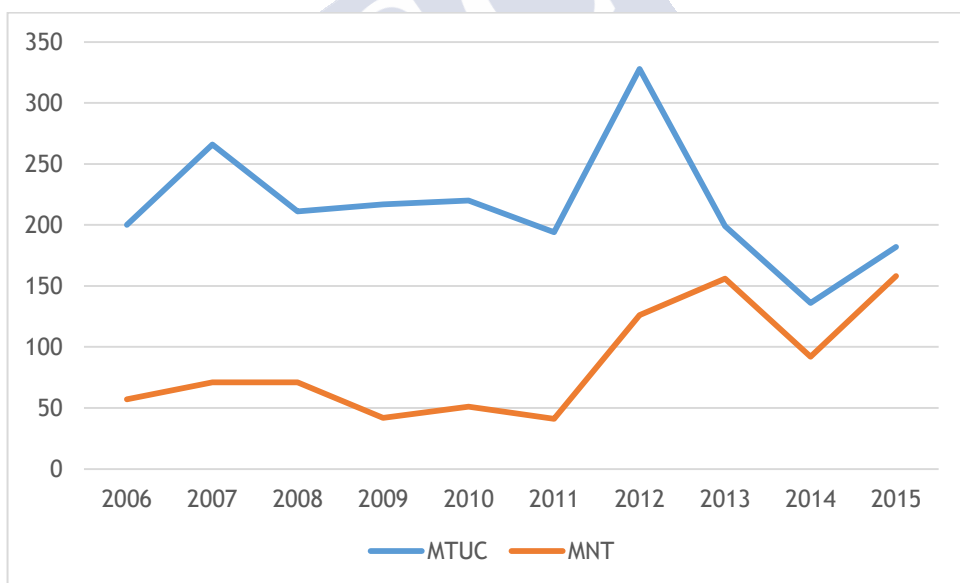
### **6.3. Resultados**

En este trabajo se procesaron un total de 63.360 muestras clínicas para estudio de micobacterias, aislándose 3.018. De estas, 2.153 se identificaron como *M.tuberculosis* complex (71,34%) y 865 como micobacterias no tuberculosas (28,66%). La evolución del número de aislamientos por año se detalla en la Figura 9 y la Tabla 15, observándose una disminución en el número de aislamientos de *M. tuberculosis* complex (MTUC) y un aumento en el de MNT.

Del total de las 865 de MNT identificadas corresponden 518 a hombres (59,88%) y 347 (40,12%) mujeres. La media de edad fue de 65 años (desviación estándar 17,89 años), 64 para los hombres y 67 para las mujeres; y la mediana de 68 años.

En el caso de los 2.153 aislamientos de *M. tuberculosis* complex 1.357 fueron hombres (63,06%) y 795 mujeres (36,94%). La media de edad fue 48 años (desviación estándar 20,33); 49 para los hombres y 45 para las mujeres. La mediana de edad fue 45 años.

Figura 9. Aislamientos de MNT y MTUC. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).



	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL
MNT	57	71	71	42	51	41	126	156	92	158	865
MTUC	200	266	211	217	220	194	328	199	136	182	2.153
<b>TOTAL</b>	257	337	282	259	271	235	454	355	228	340	3.113

En el total de micobacterias aisladas la localización pulmonar fue la más frecuente. Las MNT procedían en 783 casos (90,52%) de localización pulmonar, y 82 (9,48%) extrapulmonares. La muestra más frecuente fue el esputo (683 muestras; 78,96%), seguida del broncoaspirado (64 muestras; 7,40%). En las localizaciones extrapulmonares la muestra más frecuente fue la orina (40 muestras; 4,62%), seguida de la biopsia dérmica (11 muestras; 1,27%) y el ganglio linfático (9 muestras; 1,04%).

En el caso de *M. tuberculosis* complex, 1.854 (86,11%) muestras fueron de localización pulmonar, y 299 (13,89%) extrapulmonares. Las muestras más frecuente fueron también el esputo (1.519 muestras, 70,55%) y el broncoaspirado (179 muestras, 8,31%). En localizaciones extrapulmonares, el ganglio linfático fue la muestra más frecuente (76 muestras, 3,53%), y la orina la segunda (57 muestras, 2,65%). Estos datos se presentan con detalle en la Tabla 15.

Tabla 15. Aislamientos de micobacterias según el tipo de muestra. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

Tipo de muestra	<i>M. tuberculosis</i> complex		Micobacterias no tuberculosas	
	Número	%	Número	%
BAL (Lavado broncoalveolar)	52	2,42	6	0,69
BAS (Broncoaspirado)	179	8,31	64	7,40
Biopsia dérmica	2	0,09	11	1,27
Biopsia/Tejido otras	34	1,58	6	0,69
Biopsia/Tejido respiratorio	19	0,88	3	0,35
Esputo	1.519	70,55	683	78,96
Exudados	20	0,93	6	0,69
Ganglio linfático	76	3,53	9	1,04
Heces	2	0,09	3	0,35
Jugo gástrico	22	1,02	3	0,35
Líquido cefalorraquídeo	15	0,70	1	0,12
Líquido pleural	70	3,25	4	0,46
Medula ósea	6	0,28	0	0
Orina	57	2,65	40	4,62
Otros líquidos estériles	15	0,70	2	0,23
Secreciones bronquiales	65	3,02	24	2,77
<b>Total</b>	<b>2.153</b>	<b>100</b>	<b>865</b>	<b>100</b>

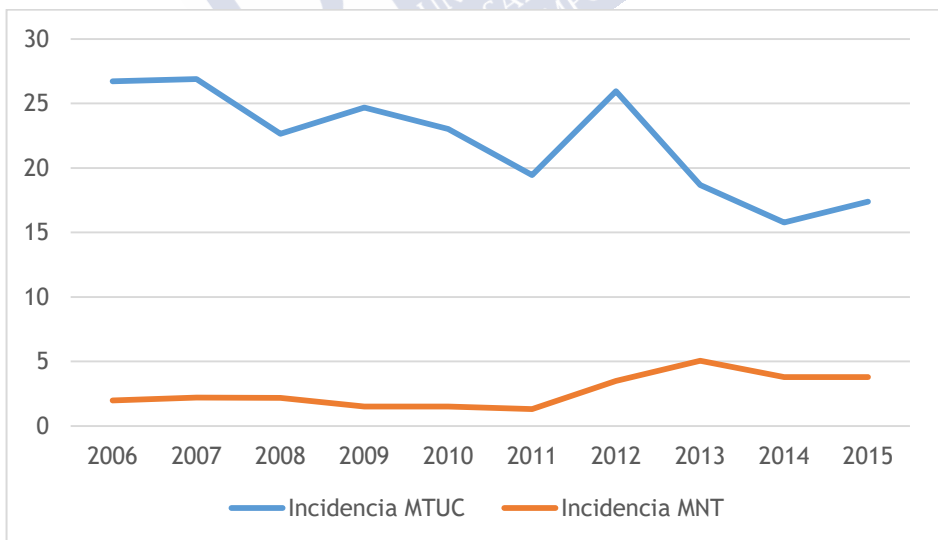
Se aislaron 22 especies de micobacterias no tuberculosas (ver Tabla 16), siendo la más frecuente *M. avium* complex (301 cepas; 34,80%), seguida de *M. intracellulare* (155 cepas; 17,92%) y *M. xenopi*. (99 cepas; 11,45%). Estas tres especies suman el 64,17% de todos los aislamientos. En el caso de *M. tuberculosis* complex se aislaron 2.118 cepas de *M. tuberculosis* (98,37%), 33 *M. bovis* (1,53%) y 2 *M. africanum* (0,09%).

Tabla 16. Especies de MNT. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS	NÚMERO	(%)
<i>Mycobacterium abscessus</i>	52	6,01
<i>Mycobacterium avium</i> complex	301	34,8
<i>Mycobacterium celatum</i>	1	0,12
<i>Mycobacterium chelonae</i>	61	7,05
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	30	3,47
<i>Mycobacterium genevense</i>	2	0,23
<i>Mycobacterium gordonae</i>	65	7,51
<i>Mycobacterium interjectum</i>	6	0,69
<i>Mycobacterium intermedium</i>	1	0,12
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	155	17,92
<i>Mycobacterium kansasii</i>	5	0,58
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	31	3,58
<i>Mycobacterium malmoense</i>	5	0,58
<i>Mycobacterium marinum</i>	8	0,92
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1	0,12
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	4	0,46
<i>Mycobacterium phlei</i>	1	0,12
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	13	1,5
<i>Mycobacterium simiae</i>	1	0,12
<i>Mycobacterium</i> spp.	19	2,2
<i>Mycobacterium szulgai</i>	4	0,46
<i>Mycobacterium xenopi</i>	99	11,45
<b>Total</b>	<b>865</b>	<b>100</b>

En el periodo de estudio constatamos 1.013 casos de enfermedad por *M.tuberculosis* complex, de 1.008 pacientes diferentes; y 122 casos de enfermedad por micobacterias no tuberculosas, de 110 pacientes diferentes. La incidencia de ambas enfermedades calculada por 100.000 habitantes entre los años 2006 y 2015 se muestra en la Figura 10. Observamos que la incidencia de la enfermedad tuberculosa alcanzó su máximo en 2007, con un valor de 26,90 por cien mil habitantes, y mostró una tendencia descendente, alcanzando un valor mínimo en 2014 de 15,77. La enfermedad por micobacterias no tuberculosas muestra por el contrario una tendencia ascendente, a partir de 2012, a un valor máximo de incidencia en 2013 de 5,05 casos por cien mil habitantes. .

Figura 10. Incidencia de enfermedad por micobacterias. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

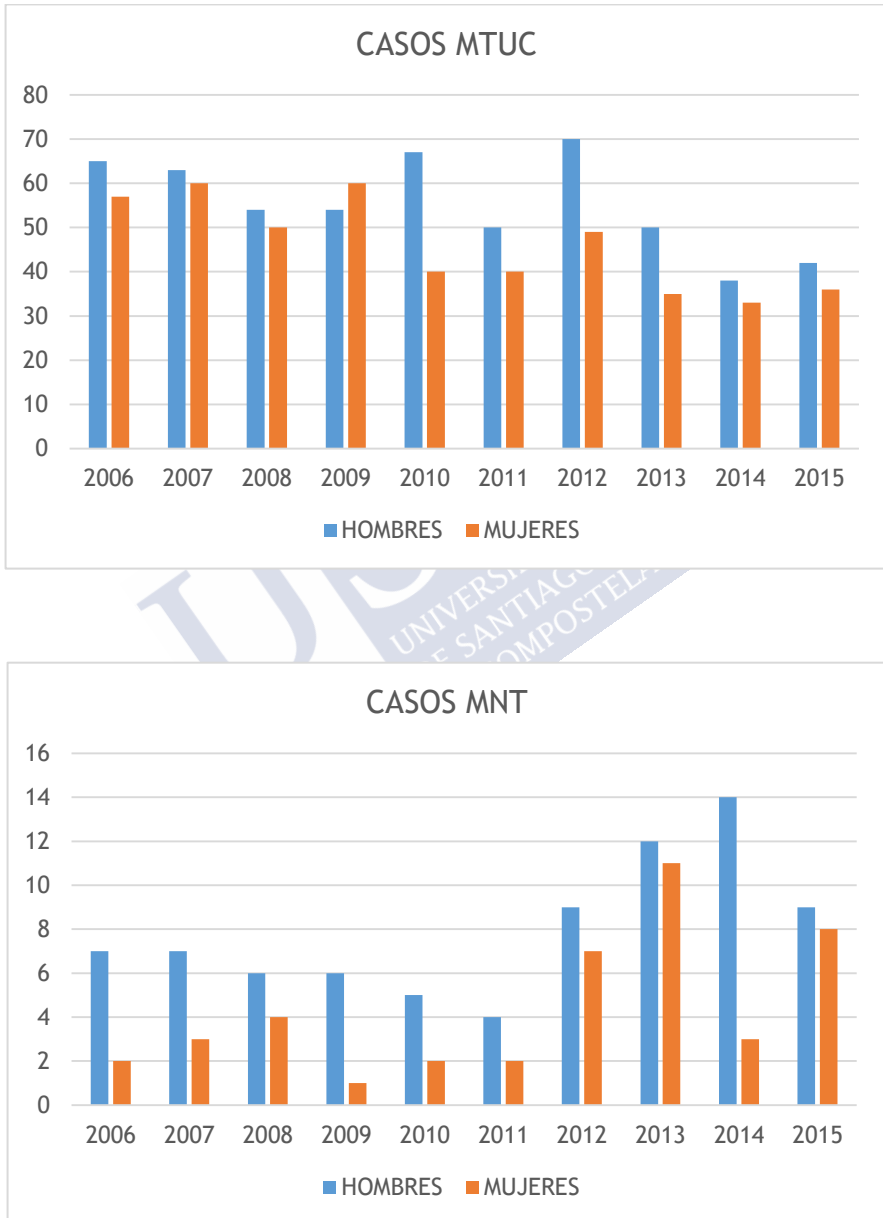


Año	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	Micobacterias no tuberculosas	Micobacterias no tuberculosas	Población
	Casos	Incidencia	Casos	Incidencia	
2006	122	26,72	9	1,97	456.661
2007	123	26,90	10	2,19	457.213
2008	104	22,65	10	2,18	459.245
2009	114	24,68	7	1,52	462.001
2010	107	23,02	7	1,51	464.874
2011	90	19,44	6	1,30	462.873
2012	119	25,95	16	3,49	458.565
2013	85	18,68	23	5,05	455.112
2014	71	15,77	17	3,78	450.136
2015	78	17,39	17	3,79	448.608

En la enfermedad tuberculosa, la media de edad fue 45 años con una desviación estándar (DS) de 24,46; 47 en los hombres y 43 en mujeres. La mediana de edad fue 44 años. En la distribución por sexos 553 pacientes fueron hombres (54,59%), y 460 mujeres (45,41%). En el periodo de estudio, fue predominante la afectación en hombres (excepto en el año 2009), observándose una mayor diferencia entre sexos en los años 2010 y 2012.

En los casos de enfermedad por micobacterias no tuberculosas, la media de edad fue 62,88 años (DS 22,07); siendo 62 para los hombres y 64 para las mujeres. La mediana de edad fue 68 años. En la distribución por sexos, 79 casos fueron hombres (64,75%) y 43 mujeres (35,25%). Durante el periodo de estudio los casos fueron mayoritariamente en hombres, mostrando menor diferencia en la distribución por sexos en los años 2012, 2013 y 2015. Estos datos se muestran en la Figura 11.

Figura 11. MTUC/MNT: Número de casos por año y distribución por sexos. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).



AÑO	Tuberculosis		Micobacterias no tuberculosas	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
2006	65	57	7	2
2007	63	60	7	3
2008	54	50	6	4
2009	54	60	6	1
2010	67	40	5	2
2011	50	40	4	2
2012	70	49	9	7
2013	50	35	12	11
2014	38	33	14	3
2015	42	36	9	8
Total	553	460	79	43

La distribución por localizaciones de los casos de enfermedad por micobacterias se muestra en la Tabla 17. En ambos grupos predominó la afectación pulmonar frente a la extrapulmonar: en micobacterias no tuberculosas 91 (74,59%) casos de afectación pulmonar frente a 31 (25,41%) extrapulmonar, y en tuberculosis 671 (66,24%) de afectación pulmonar frente a 342 (33,76%) extrapulmonar.

Las localizaciones extrapulmonares más frecuentes fueron en micobacterias no tuberculosas la cutánea (13 casos, 10,66%) y la ganglionar (6; 4,92%). En tuberculosis la ganglionar (137 casos; 13,52%) y pleural (97; 9,58%).

Tabla 17. Localización de los casos de enfermedad por micobacterias. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

Localización	Tuberculosis		Micobacterias no tuberculosas	
	Casos (nº)	%	Casos (nº)	%
Cutánea	20	1,97	13	10,66
Ganglionar	137	13,52	6	4,92
Genital	3	0,3	-	-
Intestinal-peritoneal	17	1,68	1	0,82
Miliar	1	0,1	-	-
Ocular	5	0,49	1	0,82
Pericárdica	8	0,79	-	-
Pleural	97	9,58	4	3,28
Pulmonar	671	66,24	91	74,59
Sistema nervioso central	21	2,07	-	-
Tiroides	1	0,1	-	-
Urinaria	15	1,48	2	1,64
Osteoarticular	17	1,68	4	3,28
<b>Total</b>	<b>1,013</b>	<b>100</b>	<b>122</b>	<b>100</b>

En los 1.013 casos de tuberculosis, presentaron cultivo positivo para *M.tuberculosis* complex 702 pacientes (69,30%), cultivo negativo 143 (14,12%) y no consta el resultado en 168 (16,58%).

Un caso (0,14%) estuvo causado por *M. africanum*, de localización pulmonar. Hubo 25 casos (3,56%) causados por *M. bovis*: 15 de localización pulmonar (60%) y 10 extrapulmonares (40%). De estos casos extrapulmonares 7 (70%) corresponden a formas

ganglionares, 2 (20%) y 1 pleural (10%). Los restantes 676 casos (96,30%) con cultivo positivo se identificaron como *M.tuberculosis*.

En micobacterias no tuberculosas, la mayoría de los casos estuvieron causados por *M. avium* complex (46 casos, 37,70%), siendo el 80,43% de localización pulmonar (37/46). En segundo lugar *M. intracellulare*, con 20 casos (16,39%), con 95% (19/20) de localización pulmonar y 5% (1/20) pleural. A continuación se encuentra *M. chelonae* (17 casos, 13,93%), también con predominio de localización pulmonar con un 52,94% (9/17), seguida de la cutánea con 29,41% de los casos (5/17). Por último destacar *M. xenopi*, con 14 casos (11,48%), todos ellos de localización pulmonar.

En cuanto a las localizaciones y los aislamientos de micobacterias no tuberculosas en casos clínicamente significativos, cabe destacar que en la patología cutánea la más frecuente es *M. marinum* con 53,85% de los casos (7/13), en la localización ganglionar es *M. avium* complex en el 50% (3/6), siendo esta última micobacteria también la más frecuente en localización pulmonar como ya comentamos y en localización urinaria (2/2). Estos datos se encuentran en la Tabla 18.

MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU RELACIÓN CON LA TUBERCULOSIS (2006-2015)

Tabla 18. Aislamientos y localización de MNT en casos clínicamente significativos. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

MICOBACTERIA NO TUBERCULOSA	CUTÁNEA (N, %)	GANGLIONAR (N, %)	INTESTINAL (N, %)	OCULAR (N, %)	PLEURAL (N, %)	PULMONAR (N, %)	URINARIA (N, %)	OSTEOARTICULAR (N, %)	TOTAL (N, %)
<i>M. abscessus</i>	0	0	0	0	0	4 (4,40%)	0	1 (25%)	5-(4,10)
<i>M. avium complex</i>	1 (7,69%)	3 (50%)	1 (100%)	0	2 (50%)	37 (40,66%)	2 (100%)	0	46-(37,70)
<i>M. chelonae</i>	5 (38,46%)	0	0	1 (100%)	0	9 (9,89%)	0	2 (50%)	17-(13,93)
<i>M. fortuitum</i>	0	0	0	0	0	2 (2,20%)	0	0	2-(1,64)
<i>M. intermedium</i>	0	1 (16,67%)	0	0	0	0	0	0	1-(0,82)
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	1 (25%)	19 (20,88%)	0	0	20-(16,39)
<i>M. kansasii</i>	0	0	0	0	0	1 (1,10%)	0	0	1-(0,82)
<i>M. lentiflavum</i>	0	1 (16,67%)	0	0	0	0	0	0	1-(0,82)
<i>M. malmoeense</i>	0	1 (16,67%)	0	0	0	1 (1,10%)	0	0	2-(1,64)
<i>M. marinum</i>	7 (53,85%)	0	0	0	0	0	0	1 (25%)	8-(6,56)
<i>M. scrofulaceum</i>	0	0	0	0	0	1 (1,10%)	0	0	1-(0,82)
<i>Mycobacterium spp.</i>	0	0	0	0	1 (25%)	3 (3,30%)	0	0	4-(3,28)
<i>M. xenopi</i>	0	0	0	0	0	14 (15,38%)	0	0	14-(11,48)
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>91</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>122</b>

En los casos de tuberculosis, al analizar la distribución de los casos en franjas de edad y sexo, observamos que en los hombres el mayor número de casos se producen entre los 50 y los 59 años (94 casos), seguido de la franja de edad entre 40 y 49 años (93 casos). La tendencia es el aumento del número de casos según avanza la edad, hasta alcanzar el máximo descrito, y comienza a descender el número de casos a partir de los 60 años. La única excepción a esta tendencia es que el número de casos en la primera década de la vida (31) es casi el doble que en la segunda (18).

En mujeres, el mayor número de casos aparecieron en la franja de edad de 30 a 39 años (88 casos), seguido por los 20-29 años (83 casos). Al igual que en los hombres, los casos en la segunda década de la vida (27) son inferiores que en la primera (34) pero sin mostrar tanta diferencia. A partir de los 40 años disminuye progresivamente el número de casos, exceptuando entre los 70 y 79 años que se produce un incremento. Estos datos aparecen en la Figura 12.

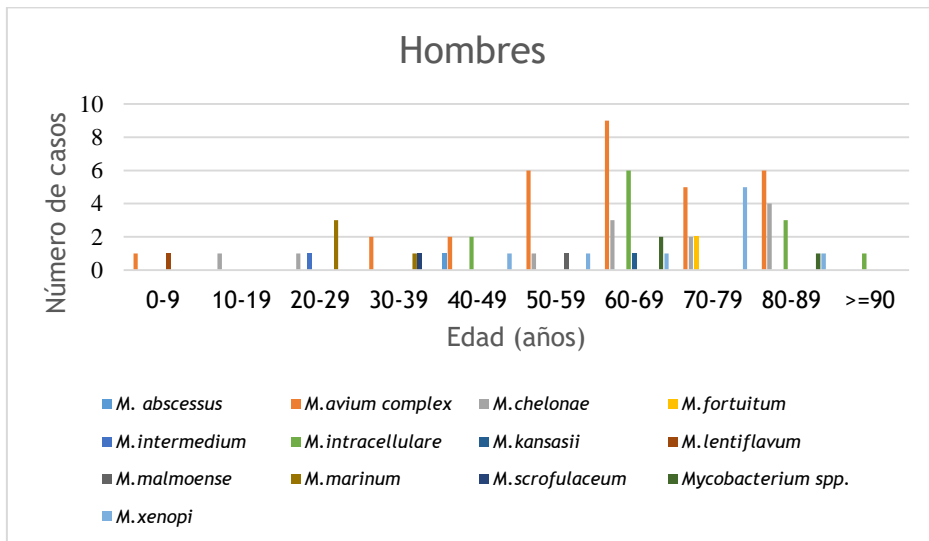
En micobacterias no tuberculosas, los 122 casos tienen cultivo positivo, debido a que los casos se localizaron a través de la base de datos del sistema informático de microbiología. De ellos, 79 ocurrieron en hombres (64,75%), aislándose trece especies de micobacterias no tuberculosas diferentes. El mayor número de casos, 22, fueron en la franja de edad entre los 60 y 69 años. El número de casos fue incrementándose progresivamente hasta esta edad, a partir de la cual comienza de nuevo a disminuir. Entre los 60 y 89 años se agrupan casi dos tercios (64,56%; 51/79) de todos los casos. En el caso de dos especies observamos que se aislaron a edades más tempranas: *M.marinum* ocurriendo los cuatro casos entre los 20 y 39

años; y el único caso de *M.lentiflavum* que pertenece a la franja de edad que corresponde a la primera década de la vida. Se aisló con más frecuencia *M.avium* complex con 31 casos (31/79; %), seguido por *M.chelonae* y *M.intracellulare* con 12 casos en ambas (12/79; %); sumando entre la el 69,62% de los casos del total (55/79).

En mujeres se produjeron 43 casos, aislándose solamente ocho especies diferentes de micobacterias no tuberculosas. El número de casos fue incrementándose de manera progresiva con la edad, hasta alcanzar un máximo de 15 (15/43; 34,88%) en la franja de edad entre los 80 y 89 años, sumando un tercio de los casos. Al igual que en el caso de los hombres, entre los 60 y 89 años encontramos aproximadamente dos tercios de los casos (29/43; 67,44%). Cabe destacar que en mujeres se aisló en cuatro casos *M.abscessus* frente a un solo caso en hombres, y que el único aislamiento de *M.malmoense* ocurrió en la primera década de la vida. *M.avium* complex se aisló en la mayor parte de los casos con 15 aislamientos (15/43; 34,88%), seguida por *M.intracellulare* con 8 casos (8/43; 18,60%) y *M.xenopi* con 5 (5/43; 11,63%).

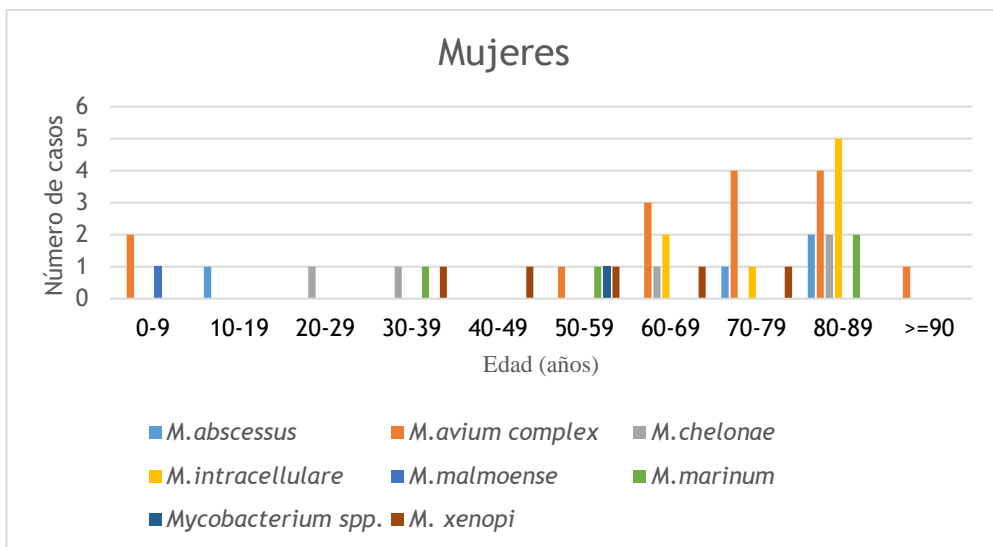
Estos datos aparecen en la Figura 12.

Figura 12. Casos de micobacterias no tuberculosas (por sexo y franja de edad). Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).



MNT	Edad (años)										Total
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	>=90	
<i>M. abscessus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>M. avium complex</i>	1	0	0	2	2	6	9	5	6	0	31
<i>M. chelonae</i>	0	1	1	0	0	1	3	2	4	0	12
<i>M. fortuitum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>M. intermedium</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	2	0	6	0	3	1	12
<i>M. kansasii</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>M. lentiflavum</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. malmoense</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>M. marinum</i>	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	4
<i>M. scrofulaceum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Mycobacterium spp.</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	3
<i>M. xenopi</i>	0	0	0	0	1	1	1	5	1	0	9
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>22</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>79</b>

MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU RELACIÓN CON LA TUBERCULOSIS (2006-2015)



MNT	Edad (años)										Total
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	>=90	
<i>M. abscessus</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0	4
<i>M. avium complex</i>	2	0	0	0	0	1	3	4	4	1	15
<i>M. chelonae</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	2	0	5
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	0	0	2	1	5	0	8
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. marinum</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	4
<i>Mycobacterium spp.</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>M. xenopi</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	5
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>43</b>

Los factores de riesgo/comorbilidad más destacables en los casos de tuberculosis y micobacterias no tuberculosas aparecen en la Tabla 19. En los 1.013 casos clínicos de tuberculosis cabe destacar que hasta en 588 (588/1013; 58,05%) no se identificó ningún factor de riesgo, y el factor más frecuente fue el tabaquismo con 50 casos (50/1013; 4,94%). En el periodo de estudio se documentó infección por VIH en 16 casos (1,58%), con una media de edad de 50,57 años (IC 95% 37,31-63,83; DS 24,89; mediana 48,43), y con un 75% de casos en hombres (12/16).

En los casos de enfermedad por micobacterias no tuberculosas destaca la presencia de alguna enfermedad pulmonar de base como la fibrosis quística (FQ), bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la silicosis en el 57,38% de los casos (70/122). A continuación destaca el tabaquismo con 34,43% (42/122) y haber padecido una tuberculosis previa con 17,21%. Los casos correspondientes a pacientes VIH positivos fueron 5 (4,1%), con una media de edad de 44,14 (IC 95% 31,17-57,11; DS 10,44; mediana 47,27) y todos en hombres. Al analizar los datos por especies, observamos que en *M.avium* complex predominan enfermedad pulmonar de base, EPOC y tabaquismo. En esta misma especie se encuentran más de la mitad de los casos con tuberculosis previa, neoplasias y diabetes mellitus. En *M.intracellulare* predominan los tres factores de riesgo/comorbilidad relacionados con enfermedad pulmonar. En el único caso de fibrosis quística se aisló *M.xenopi*. Por último, los cinco casos de localización cutánea por *M.chelonae* estuvieron asociados a la realización de tatuajes.

Tabla 19. Tuberculosis: factores de riesgo/ comorbilidad. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

<b>TUBERCULOSIS</b>	<b>Número de casos (Total n=1013)</b>	<b>%</b>
Alcohol	54	5,33
Diabetes mellitus	40	3,95
Inmigración	32	3,16
Neoplasias	78	7,7
Tabaquismo	50	4,94
VIH	16	1,58
Ausencia factores de riesgo	588	58,05

Tabla 20. MNT: factores de riesgo/comorbilidad. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

<b>MNT (n=122)</b>	<b>Nº casos</b>	<b>%</b>
Enfermedad pulmonar de base	70	57,38
EPOC	42	34,43
Fibrosis quística	1	0,82
Inmunodepresión	11	9,02
Neoplasias	19	15,57
Diabetes mellitus	15	12,3
Trasplante	2	1,64
VIH	5	4,1
Tabaquismo	42	34,43
Alcohol	10	8,2
TB previa	21	17,21
Inmigración	1	0,82
Sin factores de riesgo	22	18,03

Tabla 21. Especies de MNT: factores de riesgo/comorbilidad. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015).

MNT	<i>M. abscessus</i> (n=5)	<i>M. avium</i> complex (n=46)	<i>M. chelonae</i> (n=17)	<i>M. intracellulare</i> (n=20)	<i>M. marinum</i> (n=8)	<i>M. xenopi</i> (n=14)	Otras MNT (n=12)	TOTAL (n=122)
Enfermedad pulmonar de base	4	27	9	18	0	7	5	70
EPOC	2	15	6	13	0	3	3	42
FQ	0	0	0	0	0	1	0	1
Inmunodepresión	1	6	2	1	0	1	0	11
Neoplasias	1	10	0	4	1	1	2	19
DM	0	8	1	0	1	3	2	15
Trasplante	1	0	0	0	0	0	1	2
VIH	0	4	0	0	0	1	0	5
Tabaquismo	0	15	5	10	0	9	3	42
Alcohol	0	4	0	3	0	2	1	10
TB previa	0	11	4	2	0	4	0	21
Inmigrante	0	0	0	0	0	1	0	1
Sin factores de riesgo	1	5	4	2	6	1	5	22

En cuanto a la evolución clínica, en los casos de tuberculosis iniciaron tratamiento el 99,01% de los pacientes (1003/1013), y se completó en el 86,48% de los casos (876/1013). La curación bacteriológica fue registrada en 31 casos (3,06%). Se documentaron 85 fallecimientos, 4 (0,39%) debidos a la tuberculosis y 81 (8%) por otras causas.

En el caso de las micobacterias no tuberculosas se inició tratamiento en 54 de los 122 casos (44,26%), y en 68 casos (55,74%) no se realizó tratamiento o no consta el dato en la historia clínica. En el 92,59% de los casos se completó el tratamiento (50/54), que tuvo en su mayoría una duración de 12 meses (21 casos), con un rango entre 1 y 15 meses. En el 59,23% (32/54) de los casos tratados se emplearon 3 fármacos; en el 18,52 % (10/54) se emplearon dos fármacos; en el 14,81% (8/54) no consta el tratamiento en la historia clínica; y por último, en el 7,40% (4/54) se trató solamente mediante procedimientos quirúrgicos. En los 48 pacientes en los que se registró la duración del tratamiento, en 28 (58,33%) la duración fue mayor o igual a un año, con una media del total de 9,93 meses de tratamiento. Se documentó cura bacteriológica en el 53,70% (29/54) de los pacientes, y en el 11,11% (6/54) persistencia de los aislamientos a pesar del tratamiento. Fallecieron 26 del total de los 122 pacientes (21,31%), por complicaciones de su enfermedad de base.

#### **6.4. Discusión**

Durante los diez años del estudio, en Santiago de Compostela aumentaron los aislamientos de micobacterias no tuberculosas casi hasta el triple (se multiplicaron por 2,75), y la incidencia aumentó casi

el doble (se multiplicó por 1,92). Al mismo tiempo disminuyeron los aislamientos de *M. tuberculosis* complex, en un 9%, y la incidencia de tuberculosis en 9,33%. Estos resultados son semejantes a otros estudios en distintas autonomías españolas, como Asturias y Cataluña (123,130–132), y también estudios en países europeos como Escocia (133,134) y Portugal (135,136).

En nuestro estudio, en Santiago de Compostela, el incremento en el número de aislamientos de MNT y la disminución de MTUC fue de manera progresiva; pasando de 57 aislamientos de MNT en 2006 a 158 en 2015, y de 200 aislamientos de MTUC en 2006 a 182 en 2015.

Con respecto a los casos clínicos, en MNT aumentaron de 9 en 2006 (incidencia de 1,97 por 100.000 habitantes) a 17 casos en 2015 (incidencia de 3,79 por 100.000 habitantes). Este aumento fue también progresivo, estabilizándose alrededor de los 17 casos anuales desde 2012. La tasa media fue de 2,66 casos por 100.000 habitantes, similar a la de Asturias (2,46 por 100.000 habitantes, periodo 2005-2012) (123), Escocia ( 2,43 episodios por 100.000 habitantes, periodo 2000-2010) (133) y Nueva York (2,7 por 100.000 habitantes, periodo 2000-2003) (137); e inferiores a Ontario (9,8 por 100.000 habitantes en 2010, Canadá) (138) y Oregón (8,6 casos por 100.000 habitantes, 2005-2006) (139).

En tuberculosis pasamos de 122 casos en 2006 (incidencia de 26,72 por 100.000 habitantes) a 78 casos en 2015 (incidencia de 17,39 por 100.000 habitantes). A pesar de esta disminución, la incidencia de tuberculosis en Santiago se encuentra por encima de la media nacional. En España la incidencia en 2014 fue de 10,80 casos por 100.000 habitantes (140), disminuyendo un 5,3% como media la

incidencia desde 2005 (141). España está considerada un país de baja incidencia según el Centro Europeo para Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), que incluye en este grupo a aquellos países con tasas inferiores a 20 casos por 100.000 habitantes (142). En la Unión Europea, la mayoría de los países están por debajo de esta cifra de incidencia, con una media de 12,7 casos por 100.000 habitantes en 2016, con una disminución media por año del 4,1% entre 2007 y 2016. Son excepciones Bulgaria (27 por 100.000 habitantes), Letonia (37 por 100.000 habitantes), Lituania (53 por 100.000 habitantes) y Rumanía (74 por 100.000 habitantes) según el informe conjunto del ECDC y la OMS del año 2018 (143).

En lo referente a la distribución por sexos, en MNT los casos en hombres casi duplicaron el número de casos en mujeres (se multiplicaron por 1,84). Estos datos son similares a otros estudios, como en Asturias, donde los casos en hombres triplicaban los casos en mujeres (123), en Cataluña donde se multiplicaron por 2,65 (130) y en Escocia se multiplicaron por 1,08 (133). Sin embargo contrastan con los datos de otros países, donde predominan los casos en mujeres. En Alemania, en el período de estudio entre los años 2009 y 2014 no encontraron diferencias en la distribución por sexos (144) En Japón, los casos en mujeres multiplicaron por 1,09 los de los hombres (145), y en Estados Unidos por 1,04 (146). En tuberculosis, los casos en hombres fueron también superiores a los casos en mujeres, multiplicando su valor por 1,20. Estos datos son semejantes a los de Portugal (los casos en hombres fueron 1,78 veces superiores) (136), y Asturias (los casos en hombres duplicaron los casos en mujeres) (132). Coinciden también con los datos de la media nacional, donde la

razón hombre/mujer fue de 1,7 en el periodo comprendido entre 2012 y 2017 (147).

La media de edad de los casos de MTN fue 63 años, con una mediana de 68 años; datos similares a los de Asturias (123) y Estados Unidos (146). Entre los 60 y 89 años de edad encontramos dos tercios de los casos totales de MNT. Estos resultados coinciden con los de Asturias (123), Escocia (134) y Alemania (144). En Japón la media de edad fue más elevada (73 años), encontrándose más del 95% de los casos en mayores de 60 años y el 86,6% en mayores de 70 años (145). En Portugal la mediana de edad fue inferior, de 46 años, pero la mayoría de los casos aumentaron en función de la edad (135). La media de edad en tuberculosis fue 18 años inferior a la de MNT, 47 en hombres y 43 en mujeres; con una mediana de 44. Son datos similares a la media nacional (147), mientras que en Portugal fue superior, de 50 años (136).

La localización de los casos fue en su mayoría pulmonar, tanto para MNT (74,59%) como para tuberculosis (66,24%). Estos datos coinciden con lo documentado en la literatura. En MNT, Escocia presentó un resultado algo inferior (68,1%) (133), y un estudio mundial realizado en el año 2015 también presentó este predominio (148). En tuberculosis coincide con los datos de la media autonómica (66,8%) (57), la nacional, de 70, 91%, en el periodo 2012-2017 (147) y los datos del informe del año 2016 del ECDC (143) .

*M. avium* complex fue la MNT aislada en mayor número de casos, y la causante de más casos clínicamente significativos, en su mayoría de localización pulmonar. El complejo incluye *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M.*

*colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. vulneris*, y *M. yongonense* (149). Dentro del complejo solamente se identificó *M. intracellulare* / *M. chimaera* por separado, y no presentó diferencias en edad, distribución por sexos, localización de la enfermedad ni en los factores de riesgo. Fue la MNT más aislada a nivel mundial en un estudio reciente (150), también en estudios a nivel nacional como Asturias (123), Cataluña (130), y en otros países como Portugal (135) Escocia (133), Estados Unidos (146), China (151), Japón (145) y Corea (152). El interés ha crecido debido al incremento de la enfermedad pulmonar en pacientes aparentemente inmunocompetentes, sin VIH, con enfermedad pulmonar de base, o incluso en pacientes sin patología pulmonar. En nuestro estudio, la mayoría de los pacientes son hombres, con una edad comprendida entre los 60-69 años. Los principales factores de riesgo fueron la enfermedad pulmonar de base, en su mayoría EPOC, tabaquismo, y haber padecido una tuberculosis previa. Solamente 4 casos corresponden a pacientes con VIH. La enfermedad pulmonar de base, sobre todo EPOC, asma, bronquiectasias y tuberculosis previa se han relacionado con la enfermedad pulmonar en *M. avium* complex y otras MNT cuando afectan a la localización pulmonar (153,154). En las series publicadas en Estados Unidos la mayoría de los pacientes son mujeres, de edad avanzada, sin patología pulmonar de base (salvo bronquiectasias) en ocasiones, caucásicas y no fumadoras, con asociación a una mutación única en el gen CFTR (149). Presentan un fenotipo concreto, llamado “Síndrome de Lady Windermere”. Son altas, delgadas, con asociación a escoliosis y prolapso de la válvula mitral superior a la población general o a un grupo control con tuberculosis (155,156). En Escocia, los resultados son similares a los

obtenidos en nuestra población (133). En Portugal, el porcentaje de pacientes con VIH fue muy superior (el 66,4% de participantes en el estudio) (135), y en Cataluña el número de aislamientos de *M. avium complex* se relacionaron con la disminución de *M. kansasii* y con el control del VIH (130).

A continuación, la MNT con mayor número de casos de enfermedad fue *M. chelonae*. Presentamos cinco casos de enfermedad pulmonar por *M. chelonae*, superior a lo publicado en otras series (157,158). Los cinco casos de localización cutánea estuvieron asociados a la realización de tatuajes, siendo la posible fuente de infección el agua empleada para diluir la tinta o los recipientes en los que se hizo la mezcla (159). Esta asociación con los tatuajes aparece también en otros estudios (160,161).

*M. xenopi*, en cuarto lugar, es similar a otros estudios, que lo encuentran más frecuente en determinadas áreas geográficas, concretamente, más en el Sur que en el Norte de Europa y con predominio de localización pulmonar (21,162). En nuestro estudio la mayoría de los casos son hombres, y de edad avanzada, con factores de riesgo de enfermedad pulmonar de base, coincidiendo con otras series con baja prevalencia de VIH en su población (solamente uno de los cinco pacientes con VIH del estudio presentó enfermedad por esta MNT) (163).

Solamente presentamos un caso por *M. kansasii*. En España se ha descrito más en Comunidad Valenciana (164) y Bilbao (165). En Cataluña, disminuyeron mucho los aislamientos de *M. kansasii*. En Barcelona, desde la introducción del tratamiento antirretroviral frente

al VIH, ha disminuido el número de casos, ocupando su lugar *M. avium* complex y *M. abscessus* (130).

Todos los aislamientos de *M. marinum* fueron en casos clínicamente significativos, coincidiendo con otras series (166,167). Los factores de riesgo relacionados fueron relacionados con acuarios, limpieza de pescado, y en un caso solamente tenemos el antecedente del agua de un balneario en un paciente con una herida previa. Solamente en un caso la afectación llegó a ser osteoarticular. Estos datos son similares a otros estudios (124).

El único aislamiento de *M. intermedium* cumplió criterios de patogenicidad según la ATS/IDSA (18) Esta MNT se describió en 1993, y es muy poco frecuente (168). Se han descrito casos de bronquitis, dermatitis y algunas infecciones pulmonares (169). En nuestro caso hace referencia a una adenopatía submaxilar, que presentó BAAR en el frotis de auramina, y se aisló solamente en medio sólido. El tratamiento fue la exéresis quirúrgica.

De los 31 aislamientos de *M. lentiflavum*, solamente en un caso causó patología, adenitis cervical en un paciente pediátrico, coincidiendo con la literatura (170).

El único caso de enfermedad por *M. scrofulaceum* es de localización pulmonar, sin ningún factor de riesgo documentado. Es un agente causal infrecuente de patología, pero se puede aislar en múltiples localizaciones diferentes (171). Los factores que se asocian habitualmente a esta patología son la silicosis y la tuberculosis pulmonar previa (150).

Presentamos dos casos que cumplen criterios de enfermedad pulmonar por *M. fortuitum*. Es un número de casos inferior al de otras series (172). Entre los factores de riesgo figuran patología estructural pulmonar, y alteraciones del esófago como la acalasia o los vómitos crónicos (173). Habitualmente causa colonización, o estados de infección transitoria; en los que sin recibir tratamiento específico la enfermedad no progresa y los cultivos se negativizan (172). Nuestros dos pacientes presentaban uno bronquiectasias y el otro una neumonía previa.

Los dos casos de *M. malmoense* son uno de localización pulmonar y otro ganglionar. En la literatura la mayor parte de los casos están documentados en el Norte de Europa, sobre todo en Reino Unido y Escandinavia, siendo la enfermedad pulmonar la más frecuente, y la ganglionar la forma extrapulmonar más común (153). En Reino Unido, en un estudio publicado en el año 2001, el 48% de la enfermedad pulmonar por MNT estuvo causado por *M. malmoense*, por delante de *M. avium* complex, que representó solamente un tercio de los casos (174). El número de casos de nuestro estudio es muy inferior, al igual que en Estados Unidos y Francia (175,176). La presentación de la enfermedad pulmonar puede ser similar a la tuberculosis, predominando en hombres, teniendo como factores de riesgo más habituales la enfermedad pulmonar de base, particularmente EPOC, y también algún grado de inmunosupresión como puede ser el VIH o el uso de esteroides. En nuestro caso, presentamos un paciente varón con el único antecedente de un trasplante renal, y una paciente pediátrica con linfadenitis, coincidiendo con las series publicadas (177).

Solamente tenemos cinco casos de enfermedad por *M. abscessus*, siendo 4 pulmonares y 1 de afectación osteoarticular. La mayoría de casos son de localización pulmonar, como en otros estudios (178); pero el número total de casos pulmonares es muy inferior a otras series (130,133,179). Los cuatro pacientes de enfermedad pulmonar presentaban factores de riesgos conocidos, como la inmunosupresión por una neoplasia y la enfermedad pulmonar de base, sin ningún caso de fibrosis quística (178). El caso de afectación osteoarticular es un paciente politraumatizado con múltiples intervenciones quirúrgicas que llevaba ingresado en nuestro centro cuatro meses en el momento del aislamiento de la micobacteria; la cirugía y el traumatismo cutáneo pueden haber sido el factor de riesgo de la infección (124,180).

En el caso de la tuberculosis, la mayoría de los aislamientos se identificaron como *M. tuberculosis*, coincidiendo con los datos autonómicos (57) y nacionales (147).

Con respecto a los factores de riesgo, en MNT el más importante fue la enfermedad pulmonar de base, en el 57,38% de los casos, al igual que en otros estudios (179,181). Hasta en un 18,03% de los pacientes no se identificó ningún factor de riesgo, coincidiendo con otras series, lo que sugiere un factor de exposición ambiental o susceptibilidad genética (137).

En tuberculosis, los factores de riesgo habituales son el VIH, silicosis, DM, insuficiencia renal crónica y/o hemodiálisis, silicosis, gastrectomía, neoplasias, fármacos inmunosupresores, inmigración, uso de drogas, tabaquismo y trasplante de órgano sólido (88,182). En nuestro estudio los factores de riesgo fueron similares a los publicados en Galicia, observándose un porcentaje menor de tabaquismo (4,94%

en nuestro estudio, 22,2% en Galicia), DM (3,95% en nuestro estudio, 7,8% en Galicia), y de inmigración (3,16 % en nuestro estudio y 7% en Galicia) (57).

En relación al tratamiento de las MNT, la duración es similar a otros estudios, pero el número y tipo de fármacos presenta heterogeneidad a pesar de formar parte de la misma área sanitaria (23,183). Los datos de tratamiento de tuberculosis son superponibles a los de Galicia (57).

En Galicia, dada su situación epidemiológica, en los pacientes con sospecha clínica de enfermedad pulmonar por micobacterias se consideraba indicativa de enfermedad tuberculosa la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

En nuestro estudio hemos detectado, en el área sanitaria de Santiago de Compostela, un cambio epidemiológico en la enfermedad por micobacterias, con un incremento tanto en el número de aislamientos de MNT, especialmente en varones a partir de los 60 años, como en el número de casos clínicamente significativos desde el inicio del estudio hasta el año 2012, momento a partir del cual la incidencia se estabilizó. Estos datos nos han llevado, en una labor multidisciplinar desde la Unidad de Tuberculosis, a realizar una valoración exhaustiva de cada caso con el objeto de utilizar pruebas complementarias en el diagnóstico microbiológico que discriminen entre *M.tuberculosis* complex y micobacterias no tuberculosas. Estas técnicas son la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en los pacientes bacilíferos o con alta sospecha de enfermedad: GeneXpert MTB/RIF®, y Anyplex® plus MTB/NTM que nos ofrece la ventaja de poder identificar micobacterias no tuberculosas.

7

**LEPRA EN EL ÁREA SANITARIA  
DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**



## 7. LEPRA EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### 7.1. Introducción

La lepra, o enfermedad de Hansen (EH), es una enfermedad granulomatosa crónica causada por *Mycobacterium leprae* y el recientemente descubierto *Mycobacterium lepromatosis* (2). Estas bacterias se multiplican muy despacio y el periodo promedio de incubación de la enfermedad es de cinco años. En algunos casos los síntomas pueden aparecer en 1 año, pero también pueden tardar hasta 20 años. Si no se trata, la lepra puede causar lesiones progresivas y permanentes en la piel, los nervios, las extremidades y los ojos (184). Si se trata en las primeras fases, se puede evitar la discapacidad. La lepra no es una enfermedad altamente contagiosa, y la exposición a las secreciones nasales de un paciente infectado es el principal mecanismo conocido de transmisión (185). Además se ha descrito la transmisión zoonótica por el contacto del armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) exclusivamente en Estados Unidos, que son los únicos reservorios no humanos conocidos de la enfermedad.

Sin embargo, la tipificación “multilocus” de las cepas de *M. leprae* sugiere que fueron de origen humano, es probable que el animal primero adquiriera el organismo de manera incidental de los primeros exploradores estadounidenses (25). Desafortunadamente, esta

transmisión incidental se mantuvo en la población de armadillos, y ahora se transmite a los humanos (186).

La eliminación de la lepra como problema de salud pública a nivel mundial (menor de 1 caso por 10.000 habitantes), se consiguió en el año 2000. A partir de ese momento se llevaron a cabo varias estrategias desde la OMS: la estrategia del impulso definitivo para eliminar la lepra como problema de salud pública (2000-2005), la estrategia mundial para reducir la carga de la lepra y sostener acciones de control (2006-2010), y la estrategia mundial mejorada para una mayor reducción de la carga mundial por lepra (2011-2015) (187).

En España y otros países que han eliminado la lepra se ha documentado un aumento en el número de casos importados, sobre todo del Sur de África y América del Sur. En el año 2016, en España se detectaron 11 casos incidentes y 30 prevalentes. En ocho de los casos incidentes el país de origen de los pacientes fue diferente a España: Paraguay (4), Brasil (3), y Egipto (1) (188).

El diagnóstico de la lepra es clínico, y está basado en tres signos fundamentales establecidos por la OMS: lesiones en la piel parcheadas hipopigmentadas o eritematosas con disminución de la sensibilidad, engrosamiento de los nervios periféricos y la demostración de BAAR en una baciloscopia o biopsia de piel. Disponemos además de la intradermorreacción con lepromina, pruebas serológicas para determinar los anticuerpos antiglicolípido fenólico-1 (PGL-1) y reacción en cadena de la polimerasa. La PCR emplea distintas dianas de amplificación; genes que codifican Ag 36-kDa, Ag 18 k-Da, Ag 65k-Da, y parece más sensible que la baciloscopia en las biopsias cutáneas (184,189) (190).

Según la OMS podemos clasificar para su tratamiento y seguimiento la lepra en paucibacilar y multibacilar.

La lepra paucibacilar comprende la lepra indeterminada y tuberculoide con frotis negativo (clasificación de Madrid); lepra tuberculoide polar y tuberculoide borderline con frotis negativos (clasificación de Ridley y Jopling). Se caracteriza por la presencia de escasos BAAR en la microscopía, lesiones cutáneas hipopigmentadas con disminución de la sensibilidad.

La lepra multibacilar comprende la lepra lepromatosa y borderline (clasificación de Madrid), lepra lepromatosa polar, lepromatosa borderline y semiborderline (clasificación de Ridley y Jopling); y los casos en los que se observan BAAR en los restantes tipos de lepra. Este tipo de lepra sucede cuando existe un déficit en la inmunidad celular. Las lesiones cutáneas son rugosas y nodulares, y existe afectación del nervio (189,191).

La evolución clínica se puede ver afectada por dos cuadros de origen inmunológico, que aparecen con mayor frecuencia en pacientes que han recibido tratamiento antibiótico, llamadas reacción de tipo I o inversión y reacción de tipo II o eritema nodoso leproso (26).

El tratamiento se basa en la administración de antibióticos, y el trabajo multidisciplinar de expertos en oftalmología, ortopedia y fisioterapia. Según las recomendaciones de la OMS, en la lepra multibacilar se emplean tres fármacos: dapsona, rifampicina y clofacimina, durante al menos dos años, y en aquellos casos en los que sea posible la vigilancia se mantienen hasta la negativización de los frotis. En la lepra paucibacilar se emplean habitualmente dapsona y

rifampicina durante seis meses. Al finalizar el tratamiento, se mantiene en revisión durante cinco años a los pacientes con lepra multibacilar, y durante dos años a los afectados por lepra paucibacilar (26,192,193).

Nuestro objetivo es estudiar los casos confirmados mediante diagnóstico microbiológico y/o histopatológico en el área sanitaria de Santiago de Compostela (456.874 habitantes de media; mínimo 448.608 en 2015 y máximo 464.874 en 2010), sus características clínicas, microbiológicas y epidemiológicas.

## **7.2. Material y métodos**

Se trata de un estudio descriptivo retrospectivo realizado entre los años 2006-2015. Las fuentes de datos fueron el sistema informático de microbiología (Openlab®) y la historia clínica electrónica de Galicia (IANUS) y los casos diagnosticados desde el Servicio de Anatomía Patológica. La técnica microbiológica para el diagnóstico fue la baciloscopia del raspado de la mucosa nasal, linfa obtenida lóbulo de la oreja y/o lesiones en piel, empleando la tinción de Ziehl-Nielsen y la tinción de Kinyoun modificada (5). El resultado se interpretó utilizando la escala logarítmica de Ridley o índice bacteriológico.

## **7.3. Resultados / Casos clínicos**

En el periodo de estudio se documentaron cinco casos de enfermedad de Hansen en el área sanitaria de Santiago de Compostela. En todos los casos el índice bacteriológico fue 1 +, y solamente en el segundo caso se observaron bacilos en acúmulo o “Globis”.

### 7.3.1. Caso 1

Mujer natural de Brasil, de 34 años, que reside en ese momento desde 11 años antes en España. En el año 2015 acude al Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Santiago por la aparición de lesiones cutáneas dolorosas en brazos y piernas. En sus antecedentes familiares, figura un tío con enfermedad de Hansen. Además, la paciente refiere un episodio similar de lesiones cutáneas dos años antes, coincidiendo con una visita a su país de origen, localizadas en miembros superiores e inferiores, y algunas aisladas en tronco. Presentaba también edema en miembros inferiores y dolor en el trayecto óseo tibial, que aumentaba al palpar las lesiones. Se diagnosticó en Brasil de enfermedad de Hansen multibacilar, tras la realización de baciloscopia. Le pautaron tratamiento durante un año con rifampicina 600mg/mes, clofacimina 300 mg/mes, sulfona 100 mg/día y clofacimina 100 mg/día; con rápida resolución de las lesiones cutáneas y sin control con baciloscopia al finalizar el tratamiento. Realiza la última visita a su país en 6 meses antes del episódico actual. En el momento que acude a nuestro centro no está tomando ningún tratamiento, y las lesiones se describen como pápulas eritematosas, dolorosas a la palpación, distribuidas en cara extensora de brazos y piernas. Presenta también lesiones nodulares dolorosas en la zona más distal del brazo, codo izquierdo y tercio distal de extremidades inferiores. La paciente es derivada al Servicio de Dermatología para valoración, y se tomaron biopsias para cultivo y estudio histológico. El frotis fue BAAR positivo en una lesión cutánea, con bacterias con coloración débil y aspecto irregular; y se confirmó con la tinción de Kinyoun modificada. En la histopatología de las lesiones del brazo se observó una proliferación difusa granulomatosa en el interior de la cual había bacilos positivos a la tinción de Fite-Faraco, que orientaron al diagnóstico de una forma subpolar de lepra lepromatosa. En la biopsia de la pierna los hallazgos son similares a éstos, y en la del pabellón auricular se describe una reacción inmunológica con abundantes linfocitos y polimorfonucleares neutrófilos

similar a la del eritema nudoso leproso. Todos estos resultados confirmaron el diagnóstico de enfermedad de Hansen. Se inició tratamiento con rifampicina 600 mg/mes, clofacimina 300 mg/mes y 100 mg/día, sulfona 100 mg/día e ibuprofeno 600 mg /12 horas. Ante la persistencia del dolor y la aparición de nuevas lesiones (dorso de pies, pabellones auriculares y dorso nasal), se añadieron corticoides por vía oral, con mejoría inicialmente de la clínica. Posteriormente se decidió el ingreso ante la clínica sensitiva en extremidades inferiores, y se realizó interconsulta al Servicio de Neurología y se confirmó el diagnóstico de neuropatía sensitiva. Al cabo de 10 días de control del dolor y ausencia de presentación de nuevas lesiones se decidió el alta hospitalaria; manteniendo el tratamiento descrito. Al cabo de un año se suspendió el tratamiento. Actualmente está en seguimiento en las consultas de Dermatología, presentando en la última revisión en marzo de 2019 solamente algunas máculas hiperpigmentadas en región anterior de ambas piernas, probablemente en relación con eritema nodoso leproso; y continuará con revisiones anuales.

### **7.3.2. Caso 2.**

Paciente mujer de 35 años, natural de Brasil, que en el año 2009, debut de la enfermedad, lleva tres años residiendo en España. La paciente acude al Servicio de Urgencias por lesiones cutáneas dolorosas de quince días de evolución, que afectan a las dos mejillas, la zona extensora del brazo derecho y la parte distal de ambas extremidades inferiores. Las lesiones se describen como placas eritematosas, y además nódulos en extremidades inferiores. Como antecedente de interés, destaca que trabajó con pacientes afectos de enfermedad de Hansen entre 1992 y 1996. En las biopsias para estudio microbiológico no se observaron BAAR. En el estudio histopatológico de la biopsia de la piel se diagnostica de lepra de tipo tuberculoide. La paciente ingresa para recibir tratamiento según la pauta OMS. Al alta es remitida al Servicio de Neurología, donde es diagnosticada

de neuropatía por enfermedad de Hansen. En la revisión del año 2014 en las consultas de Dermatología, presentó algunas máculas hipopigmentadas con discreta hipoestesia, sin lesiones nodulares, subcutáneas ni atrofiaciones musculares. Continúa en seguimiento anual.

### **7.3.3. Caso 3.**

Mujer de 19 años, natural de Brasil, residente desde hace dos años en España y embarazada de dos meses. Ingresó en el Servicio de Dermatología en el año 2009 para el estudio de lesiones hipopigmentadas generalizadas. Entre los antecedentes de interés está una hermana de su abuela con enfermedad de Hansen. La paciente refiere que un año antes de venir a España apareció una lesión en la mejilla derecha asintomática. Esta lesión permaneció estable hasta su llegada a nuestro país, momento en que aparecieron nuevas lesiones, primero en las extremidades inferiores, a continuación la espalda. Al inicio eran pruriginosas, y pasaron a ser asintomáticas. En ese momento refiere aumento de sensibilidad a la palpación en las lesiones, nuevas lesiones en la cara; sin cambios desde el embarazo. A la exploración las lesiones en la cara se describen como manchas hipopigmentadas no palpables, de límites netos, bilaterales con tendencia a la simetría. Afectación de la región ciliar sin pérdida de cola de cejas, mejillas y mentón; sin infiltración de pabellones auriculares. En espalda y cuello lesiones similares, sin descamación. La exploración neurológica de las lesiones muestra una disminución de la sensibilidad termoalgésica de las lesiones de mayor tamaño de la espalda. Se realizó estudio microbiológico, que en el raspado de la mucosa nasal y la linfa del pabellón auricular mostraron BAAR en la tinción de Kinyoun modificada. El estudio histopatológico de una lesión de la espalda diagnosticó una lepra lepromatosa border-line. El inicio del tratamiento según la pauta OMS se retrasó dos semanas tras consultar al Servicio de Obstetricia,

para dar por finalizada la fase de embriogénesis. Se completó el tratamiento sin complicaciones durante el embarazo y el parto. Continúa a seguimiento en consultas de Dermatología.

#### **7.3.4. Caso 4.**

Paciente varón de 51 años, diagnosticado en el año 2006 de enfermedad de Hansen desde el Servicio de Neurología. En el momento del diagnóstico el paciente presenta debilidad progresiva e hipotrofia de la extremidad inferior izquierda, afectando también a la otra extremidad inferior y a la extremidad superior izquierda. Dificultad a la deambulación, sensación de torpeza para manipular objetos pequeños. En la actualidad presenta cuadro clínico en extremidades, debilidad facial bilateral y ectropión. Como antecedentes de interés, destacan viajes a países en vías de desarrollo. En los estudios microbiológicos del tabique nasal derecho e izquierdo no se observaron BAAR. En el estudio histopatológico de la biopsia de nervio, se diagnosticó de polineuropatía desmielinizante crónica compatible con origen infeccioso por lepra. Finalmente se diagnosticó de lepra lepromatosa regresiva. No consta tratamiento frente a la enfermedad de Hansen, falleciendo en 2016 por problemas cardíacos.

#### **7.3.5. Caso 5.**

Paciente varón de 39 años diagnosticado en 1979 de lepra lepromatosa. El paciente no refiere ningún viaje de interés, y es natural de Galicia. Entre sus antecedentes destaca la presencia de un familiar que trabajó en la antigua leprosería de Santiago de Compostela. Ha presentado numerosas recidivas, a varias pautas de tratamiento. A consecuencia de la enfermedad y la toxicidad farmacológica presenta como secuela ceguera bilateral; precisó evisceración del ojo izquierdo en 1999, y en el ojo derecho queratoplastia penetrante y trasplante de membrana amniótica en el año 2000. A nivel cutáneo se

observan lesiones tróficas en ambas piernas y padece una polineuropatía desmielinizante. En la actualidad tanto los estudios microbiológicos como histológicos no evidencian enfermedad. El último ciclo de tratamiento con sulfona finalizó en mayo del año 2019.

#### **7.4. Discusión**

La enfermedad de Hansen sigue siendo una realidad, en 2017 se registraron 211.009 nuevos casos de lepra a nivel mundial, según cifras oficiales provenientes de 159 países de cada una de las regiones de la OMS. Sobre la base de los 193.118 casos finales de 2017, la tasa de detección de casos es de 0,3/10.000. Es obvio que la lepra sigue siendo un problema de salud pública mundial y que es necesario poner el foco no solo en el diagnóstico y tratamiento precoz, sino también en la detección sistemática de los contactos.

En nuestro estudio describimos cinco casos de lepra, cuatro de ellos importados y uno que a falta de mayores datos es autóctono.

Los tres primeros casos presentan varios factores de riesgo que nos pueden hacer sospechar el diagnóstico de enfermedad de Hansen. Todos son residentes en España que tienen como lugar de origen Brasil, que junto con la India son los países con mayores tasas de lepra endémica. Además, uno de los casos relata un cuadro de lepra previamente diagnosticado en Brasil. Dos de los casos presentan un antecedente epidemiológico en Brasil: un caso trabajó con enfermos de lepra, y otro tenía un familiar afecto de la enfermedad.

El cuarto caso es un paciente nacido en Galicia que presenta como factor de riesgo el antecedente de viajes a países en vías de desarrollo.

La presentación fue muy diferente a los otros casos, ya que la clínica predominante era la evolución de la lesión neurológica.

El quinto caso consta de menos datos recogidos en su historia clínica, y niega haber salido nunca de Galicia. El único factor de riesgo documentado es un familiar que trabajó con enfermos de lepra en Santiago.

A pesar de que solamente hemos documentado cinco casos en los diez años del estudio, en nuestra experiencia resalta la importancia de considerar el país de origen, el historial de viajes y el contacto con pacientes o personal que trabaja con enfermos de lepra. En otros estudios de áreas no endémicas aparecen estos factores de riesgo, y además se describen otros, como el contacto con emigrantes de áreas endémicas, los distintos lugares de residencia y valorar la transmisión a través del armadillo en determinadas áreas de Estados Unidos (185).

El tratamiento con el régimen de múltiples fármacos es eficaz, aunque se requiere una decisión cuidadosa sobre la elección del tratamiento. Los clínicos deben considerar que, a pesar de que la lepra es una enfermedad tratable; los retrasos en el diagnóstico y el tratamiento adecuado pueden aumentar el riesgo de progresión a discapacidades asociadas con la lepra (194).

Se precisa investigar más, tanto desde el punto de vista del diagnóstico y el tratamiento, dado que no contamos con nuevas técnicas ni fármacos, así como la epidemiología y de transmisión para lograr eliminar esta enfermedad (187).

A pesar de la disminución del número de casos de enfermedad en nuestro entorno, es importante sensibilizar al personal sanitario para

sospechar la enfermedad, sobre todo en originarios de países donde la lepra es endémica y en los contactos cercanos de los enfermos diagnosticados. Los clínicos deben conocer esta enfermedad para realizar el diagnóstico, y tratar de evitar incapacidades y detener la cadena de transmisión; siendo muy importante la colaboración entre los clínicos, microbiólogos y patólogos para llegar al diagnóstico etiológico.





8

**CONCLUSIONES**





## 8. CONCLUSIONES

- Primera.-** En Galicia, entre los años 2006-2013, el número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex resistentes a isoniazida y multirresistentes fue bajo.
- Segunda.-** En las cepas con resistencia a isoniazida no multirresistentes, el análisis genotípico mediante el test MTBDRplus® presentó una baja sensibilidad (62,5%); encontramos una relación estadísticamente significativa entre las cepas en las que no se detecta mutación y la resistencia a alta concentración. La baja sensibilidad en este grupo de cepas limita el posible uso de esta técnica en el diagnóstico directo de resistencias a isoniazida.
- Tercera.-** El análisis genotípico mediante el test MTBDRplus® detectó el 100% de las cepas multirresistentes. Todas presentaron mutaciones en el gen *rpoβ*, el 46,15% en S531L, el 38,5 % en *inhA*, y el 53,8% en *katG*; el 7,7% presentaban delección del gen *katG*. Excepcionalmente, una cepa presentó doble mutación en los genes que codifican resistencia a isoniazida.
- Cuarta.-** Las tres técnicas moleculares de detección directa de tuberculosis: Anyplex® MTB / NTM, BioGX *Mycobacterium tuberculosis* Complex Open System Reagents™ y Xpert MTB/RIF®, presentaron buenos

resultados globales de exactitud y capacidad diagnóstica, lo que los hace útiles en el diagnóstico microbiológico rápido. Estos buenos resultados pueden estar en relación a su manejo por personal entrenado y a la preparación de las muestras con concentración previa.

**Quinta.-** La espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) es una técnica altamente fiable para la identificación de micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido. La concordancia con el método de referencia, la secuenciación parcial del gen *rpoB*, fue del 100% cuando se consideraron valores de puntuación de la espectrometría superiores a 1,85. Con respecto al sistema genotípico GenoType®, mejora la capacidad de diferenciar las especies de *M. fortuitum* complex. Se trata, además, de una técnica simple, rápida y asociada a un bajo coste.

**Sexta.-** En nuestro estudio, el análisis filogenético se tradujo en una mayor precisión y exactitud a la hora de clasificar las distintas especies de micobacterias.

**Séptima.-** En el periodo 2006-2015, en el área de Santiago de Compostela los aislamientos de micobacterias no tuberculosas prácticamente se triplicaron y su incidencia casi se duplicó; al mismo tiempo disminuyeron los aislamientos de *M. tuberculosis* complex en un 9%, y la incidencia de tuberculosis en 9,33%. Con respecto a los casos clínicos, se incrementó la incidencia de micobacterias no tuberculosas desde el 1,97 por 100.000

habitantes en 2006 hasta el 3,79 por 100.000 habitantes en 2015; este aumento fue progresivo, estabilizándose desde el año 2012. La tasa media fue de 2,66 casos por 100.000 habitantes.

**Octava.-** La mayoría de los casos clínicos causados por micobacterias no tuberculosas se diagnosticaron en hombres, con predominio de la enfermedad pulmonar. *M. avium* complex fue responsable del mayor número de casos, mayoritariamente en varones con una edad comprendida entre los 60 y 69 años; los principales factores de riesgo asociados fueron el EPOC y/o haber padecido una tuberculosis previa, no encontramos relación con el VIH.

**Novena.-** La lepra sigue siendo una realidad en nuestro medio. En diez años de estudio se han documentado cinco casos, cuatro en relación con países de alta endemia y uno autóctono.



9

**BIBLIOGRAFÍA**





## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina Moreno T, Valverde Cobacho A, Saiz Vega P, Jiménez Pajares MS. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2009;27(9):496–502. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-aplicacion-metodos-moleculares-identificacion-las-S0213005X09001803?referer=buscador>
2. Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2008 Jan 12;130(6):856–64. Available from: <https://doi.org/10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM>
3. Parrish N. An Update on Mycobacterial Taxonomy, 2016–2017. Kraft CS, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019 May 1;57(5):e01408-18. Available from: <http://jcm.asm.org/content/57/5/e01408-18.abstract>
4. Cercenado Emilia CR. Procedimientos en Microbiología Clínica [Internet]. Seimc.Org. 2008. 40 p. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
5. Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Press A, editor. Washington, DC; 2011.
6. WHO (2015) Global tuberculosis report 2015. World Health Organization, Geneva. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665>

- /191102/1/9789241565059\_eng.pdf?ua=1. Accessed 25 July 2016.
7. WHO | The Stop TB Strategy [Internet]. Who.int. 2019 [cited 20 July 2019]. Available from: [https://www.who.int/tb/strategy/stop\\_tb\\_strategy/en/](https://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/en/).
  8. WHO End TB Strategy [Internet]. Who.int. 2019 [cited 20 July 2019]. Available from: [https://www.who.int/tb/post2015\\_strategy/en/](https://www.who.int/tb/post2015_strategy/en/).
  9. WHO Global Tuberculosis report 2018. Available from: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
  10. J.A. Caminero, A. Van Deun, P.I. Fujiwara, I. Monedero, C.Y. Chiang, H.L. Rieder, et al. Guidelines for clinical and operational management of drug-resistant tuberculosis. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, (2013), pp. 2013.
  11. Caminero JA, Cayla JA, García-García J-M, García-Pérez FJ, Palacios JJ, Ruiz-Manzano J. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. Arch Bronconeumol [Internet]. 2017;53(9):501–9. Available from: <https://www.archbronconeumol.org/es-diagnostico-tratamiento-tuberculosis-con-resistencia-articulo-S0300289617300509>
  12. Alcaide F. Diagnóstico microbiológico actual de la tuberculosis Current microbiological diagnosis of tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2017;35(7):399–402. Available from: [www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)
  13. Muñoz L, Moure R, Porta N, Gonzalez L, Guerra R, Alcaide F, et al. GeneXpert® for smear-negative pulmonary tuberculosis: does it play a role in low-burden countries? Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2013;75(3):325–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889312004944>
  14. Pérez del Molino ML, Barbeito-Castiñeiras G, Mejuto B,

- Alonso P, Fernández A, González-Mediero G, et al. The genotypic study of *Mycobacterium tuberculosis* complex resistant to isoniazid: Galicia, Spain (2008–2013). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(11).
15. Camarena Miñana JJ, González Pellicer R. Micobacterias atípicas y su implicación en patología infecciosa pulmonar. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2011;29(SUPPL. 5):66–75. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70046-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70046-5)
  16. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli MR, et al. Respiratory Outbreak of *Mycobacterium abscessus* Subspecies *massiliense* in a Lung Transplant and Cystic Fibrosis Center. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2012 Jan 15;185(2):231–2. Available from: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.185.2.231>
  17. Altet Gómez N. Micobacterias no tuberculosas: ¿Una infección emergente? *An Pediatr*. 2009;71(3):185–8.
  18. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367–416.
  19. van der Werf MJ, Ködmön C, Katalinić-Janković V, Kummik T, Soini H, Richter E, et al. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14:62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3922012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  20. Chanda-Kapata P, Kapata N, Klinkenberg E, Mulenga L, Tembo M, Katemangwe P, et al. Non-tuberculous mycobacteria (NTM) in Zambia: prevalence, clinical, radiological and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015;15(1):500. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=463>

- 6841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
21. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Ängeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013;42(6):1604–13.
  22. Chiang C-Y, Yu M-C, Yang S-L, Yen M-Y, Bai K-J. Surveillance of Tuberculosis in Taipei: The Influence of Nontuberculous Mycobacteria. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(11):e0142324. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0142324>
  23. Esteban J, Navas E. Tratamiento de las infecciones producidas por micobacterias no tuberculosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(9):586–92.
  24. Han XY, Silva FJ. On the age of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Feb 13;8(2):e2544–e2544. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551248>
  25. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the Origin of Leprosy. *Science* (80- ) [Internet]. 2005 May 13;308(5724):1040 LP – 1042. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/308/5724/1040.abstract>
  26. Fleta Zaragozano J. Lepra: aspectos clínicos y tratamiento. *Med Integr* [Internet]. 2001;38(7):309–14. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-lepra-aspectos-clinicos-tratamiento-13022408>
  27. World Health Organization. (2011). Surveillance of drug resistance in leprosy : 2010 : Introduction = Surveillance de la pharmacorésistance de la lèpre : 2010 : Introduction. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 86 (23).
  28. Kar HK, Gupta R. Treatment of leprosy. *Clin Dermatol* [Internet]. 2015;33(1):55–65. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X14>

001497

29. World Health Organization. Guidelines for Global Surveillance of Drug Resistance in Leprosy. SEA-GLP-2009.2.
30. Global Leprosy Strategy: Accelerating towards a leprosy-free world. ISBN 978-92-9022-509-6. World Health Organization 2016.
31. Horsburgh CR, Barry CE, Lange C. Treatment of Tuberculosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Nov 25;373(22):2149–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1413919>
32. Sloan DJ, Lewis JM. Management of multidrug-resistant TB: novel treatments and their expansion to low resource settings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Mar;110(3):163–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755422/>
33. Programa Galego de Prevención e Control da Tuberculose (2003) Documentos Técnicos en Saúde Pública: Serie B. In: de Galicia X (ed) Consellería de Sanidade e Servizos Sociais. N.º. 35. Dirección Xeral de Saúde Pública, Santiago.
34. Cruz-Ferro Elena, Ursúa-Díaz MI, Taboada-Rodríguez JA, Hervada-Vidal X, Anibarro L, Túnñez V. Epidemiology of tuberculosis in galicia, spain, 16 years after the launch of the galician tuberculosis programme. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(2):134–40.
35. World Health Organization (2008) Anti-tuberculosis drug resistance in the World. Report no.4. The WHO /IUATLD Global Project on Anti- Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007. World Health Organization, Geneva, Switzerland, WHO/HTM/2008.394.
36. World Health Organization (2004) Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report no.3. The WHO /IUATLD Global Project on Anti- Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002. WHO, Geneva, Switzerland, pp 1-129.

ISBN 92 4 156285-4.

37. Huyen MNT, Cobelens FGJ, Buu TN, Lan NTN, Dung NH, Kremer K, et al. Epidemiology of Isoniazid Resistance Mutations and Their Effect on Tuberculosis Treatment Outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2013 Aug 14;57(8):3620–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719713/>
38. Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High Prevalence of KatG Ser315Thr Substitution among Isoniazid- Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Northwestern Russia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1417–24.
39. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O’Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2008;177. Available from: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200709-1436OC>
40. Richter E, Weizenegger M, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Jun 12;41(6):2672–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC156502/>
41. Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2635–40.
42. Emergency AG. Geno Type MTBDR plus 12. 2011;
43. Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(3):686–96.

44. No Title. World Heal Organ Anti-tuberculosis drug Resist world Rep no3 WHO/IUATLD Glob Proj Anti- Tuberc Drug Resist Surveill 1999-2002 WHO, Geneva, Switzerland, pp 1-129 ISBN 92 4 156285-4.
45. World Health Organization. Informe mundial sobre la tuberculosis. 2014;[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/g](http://www.who.int/tb/publications/global_report/g).
46. Nikam C, Patel R, Sadani M, Ajbani K, Kazi M, Soman R, et al. Redefining MTBDRplus test results: what do indeterminate results actually mean? [Internet]. Vol. 20, The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. p. 154–9. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtld/2016/00000020/00000002/art00006>
47. Evans J, Stead MC, Nicol MP, Segal H. Rapid genotypic assays to identify drug-resistant Mycobacterium tuberculosis in South Africa. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2009 Jan 1;63(1):11–6. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/63/1/11.abstract>
48. Torres JN, Paul L V, Rodwell TC, Victor TC, Amallraja AM, Elghraoui A, et al. Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical M. tuberculosis isolates. Emerg Microbes Infect [Internet]. 2015 Jul 15;4:e42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2015.42>
49. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2011 May 1;55(5):2032–41. Available from: <http://aac.asm.org/content/55/5/2032.abstract>
50. Müller B, Streicher EM, Hoek KGP, Tait M, Trollip A, Bosman ME, et al. inh A promoter mutations : a gateway to

- extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa ? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(3):344–51.
51. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Molecular Investigation of Resistance to the Antituberculous Drug Ethionamide in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* . *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Jan 25;55(1):355–60. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019671/>
  52. Vilchèze C, Jacobs WR. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014 Aug 4 [cited 2016 Feb 2];2(4):MGM2-0014–2013. Available from:  
<http://www.asmscience.org/content/view.action>
  53. CHRYSSANTHOU E, ÄNGEBY K. The GenoType® MTBDRplus assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Sweden. *APMIS* [Internet]. 2012;120(5):405–9. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02845.x>
  54. Pym AS, Cohen K a., Bishai WR. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014;2(3):1–16. Available from:  
<http://www.asmscience.org/content/journal/cm/10.1128/microbiolspec.MGM2-0036-2013>
  55. da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7):1417–30.
  56. Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* . *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2006 Aug 26;50(8):2640–9. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1538650/>
57. Dirección Xeral de Saúde Pública. Informe da tuberculose en Galicia. Características dos casos de tuberculose de Galicia no ano 2017. Evolución do período 1996-2017 [monografía en internet]. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia, Consellería de Sanidad. 2019; Available from: <http://www.sergas.es/Saude-publica/Vixilanciaepidemiologica-%0Ada-TB-en-Galicia>
  58. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2.
  59. González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamento y prevención de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(5).
  60. Lewinsohn DM, Leonard MK, Lobue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American Thoracic Society / Infectious Diseases Society of America / Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines : Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. 2016;(Xx Xxxx).
  61. Technologies L. MTB/NTM Real-time Detection (V2.0).
  62. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):229–37.
  63. Hain-Lifescience. GenoType Mycobacterium CM VER 1.0 Instructions for Use IFU-299-22.
  64. Hain-Lifescience. Geno Type Mycobacterium AS. Ifu-298-14 [Internet]. 2011;1:1–8. Available from: [www.hain-lifescience.de](http://www.hain-lifescience.de)
  65. Ver X. Geno Type MTBC. 2010;1–14.
  66. Only U. Mycobacterium tuberculosis Complex Open System

- Reagents for BD MAX™ Mycobacterium tuberculosis Complex Open System Reagents for BD MAX™. 2016;34:4–9.
67. Conditions C. Tuberculosis tuberculosis , and measures for its [Internet]. London; 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97852/>
  68. Doménech Massons JM. Fundamentos de Diseño y estadística. UD 14. Medida del cambio: Análisis de diseños con medidas intrasujeto. 14th ed. Gràfica SI, editor. Barcelona; 2013. 51–60 p.
  69. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. Tripathy S, editor. PLoS One [Internet]. 2008 Feb 6;3(2):e1536. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212137/>
  70. Parsons LM, Somoskövi Á, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor Countries: Challenges and opportunities. Clin Microbiol Rev. 2011;24(2):314–50.
  71. Murray, E. J. Baron JH, Jorgensen, M. L. Landry and MAP. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. p. 543–572.
  72. Samper S, González-Martin J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por el género Mycobacterium. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2018;36(2):104–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X17303695>
  73. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on

- diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* [Internet]. 2006;61(9):783–90. Available from: <http://thorax.bmj.com/cgi/doi/10.1136/thx.2005.054908>
74. JM D. Fundamentos de Diseño y Estadística. UD3. Teoría y cálculo de probabilidades. Pruebas diagnósticas. 14th ed. Signo, editor. Barcelona; 2013.
75. Lyra JMA de, Maruza M, Verza M, Carneiro MM, Albuquerque M de FM de, Rossetti ML, et al. Evaluation of four molecular methods for the diagnosis of tuberculosis in pulmonary and blood samples from immunocompromised patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2014;109(6):805–13. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762014000600805&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000600805&lng=en&tlng=en)
76. Richeldi, L., S. Barnini and CS. Molecular diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J Suppl*. 1995;20689–700.
77. Hajian-Tilaki K. Receiver operating characteristic (roc) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Casp J Intern Med* [Internet]. 2013;4(2):627–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009950>
78. Florkowski CM. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. *Clin Biochem Rev* [Internet]. 2008 Aug;29 Suppl 1(Suppl 1):S83–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852864>
79. Deeks JJ. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *Bmj* [Internet]. 2004;329(7458):168–9. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.329.7458.168>
80. Aznar-Oroval E, Mancheño-Alvaro A, García-Lozano T, Sánchez-Yepes M. Razón de verosimilitud y nomograma de

- Fagan: 2 instrumentos básicos para un uso racional de las pruebas del laboratorio clínico. *Rev Calid Asist* [Internet]. 2013;28(6):390–1. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-calidad-asistencial-256-articulo-razon-verosimilitud-nomograma-fagan-2-S1134282X13000523> ER
81. Hayden SR, Brown MD. Likelihood Ratio: A Powerful Tool for Incorporating the Results of a Diagnostic Test Into Clinical Decisionmaking. *Ann Emerg Med* [Internet]. 1999 May 1;33(5):575–80. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(99\)70346-X](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(99)70346-X)
  82. Fagan TJ. Letter: Nomogram for Bayes theorem. *N Engl J Med*. 1975;293:257.
  83. Silva Fuente-Alba C, Molina Villagra M. Likelihood ratio (razón de verosimilitud): definición y aplicación en Radiología. *Rev Argentina Radiol* [Internet]. 2013;28(6):204–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-radiologia-383-articulo-likelihood-ratio-razon-verosimilitud-definicion-S0048761916301910>
  84. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PMM. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2018 Mar 17;56(11):1129–35. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0895-4356\(03\)00177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0895-4356(03)00177-X)
  85. Moons KG, van Es GA, Deckers JW, Habbema JD GD. Limitations of sensitivity, specificity, likelihood ratio, and bayes' theorem in assessing diagnostic probabilities: a clinical example. *Epidemiology*. 1997;8(1):12–7.
  86. Donis JH. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica ( Assessment of the validity and reliability of a diagnostic test ) Resumen Introducción. *Av en Biomed* [Internet]. 2012;1(2):73–81. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/3313/331328015005.pdf>

87. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Heal Technol Assess* [Internet]. 2007;11((3)):1–196. Available from: <https://www.journalslibrary.nihr.ac.uk/hta/hta11030#/abstract>
88. 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. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2010;46(5):255–74. Available from: <http://www.archbronconeumol.org/es/documento-consenso-sobre-diagnostico-tratamiento/articulo/S0300289610000785/>
89. Viñuelas-Bayón J, Vitoria MA, Samper S. Diagnóstico rápido de la tuberculosis. Detección de mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(8):520–8.
90. McGrath EE, Anderson PB. Increased prevalence of non-tuberculous mycobacteria infection. *Lancet* [Internet]. 2007 Feb 6;370(9581):28. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61044-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61044-7)
91. Tortoli E. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2014 Oct;27(4):727–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187642/>
92. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2013 Jul;26(3):547–603. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719498/>
93. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Dec 16;41(12):5699–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308974/>

94. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* [Internet]. 2017 Feb 6;17(1):37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>
95. Deutsch S. Geno Type ® Mycobacterium CM VER 2.0. 2016;29–42.
96. Inactivation IO. Standard Operating Procedure Mycobacteria Extraction ( MycoEX ) Method MALDI Biotyper. 2014;3(January):3–6.
97. Adékambi T, Colson P, Drancourt M, Ade T. *rpoB* -Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria *rpoB* -Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. 2003;41(12):5699–708.
98. Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25(7):1253–6.
99. Street G, Kingdom U. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches : A Fast , Accurate ., 2006;55(4):539–52.
100. Russo C, Tortoli E, Menichella D. Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species. 2006;44(2):1769–75.
101. Mediavilla-Gradolph MC, De Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, García-Martínez M de LÁ, Ortega-Torres M, Montiel Quezel-Guerraz N, et al. Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:854078. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106617>
102. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to: Identify non-tuberculous Mycobacterium

- species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2018;10–4.
103. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Ruiz A, Timke M, Kostrzewa M, Bouza E. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. Land GA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 Apr 1;54(4):1144 LP – 1147. Available from: <http://jcm.asm.org/content/54/4/1144.abstract>
  104. Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2013 Sep;51(9):2875–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804379>
  105. Lee M-R, Sheng W-H, Hung C-C, Yu C-J, Lee L-N, Hsueh P-R. Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 Sep;21(9):1638–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4550155/>
  106. David E. Griffith , Barbara A. Brown-Elliott JLB and RJWJ. Mycobacterium abscessus. “Pleased to Meet You, Hope You Guess My Name...”. *Ann Am Thorac Soc* [Internet]. 2015;12(3):436–9. Available from: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201501-015OI>
  107. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(3):545–82.
  108. Rubio M, March F, Garrigó M, Moreno C, Español M, Coll P. Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the Mycobacterium abscessus Complex. Floto AR, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Oct 8;10(10):e0140166. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4598034/>

109. Nie W, Duan H, Huang H, Lu Y, Bi D, Chu N. Species identification of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* using *rpoB* and *hsp65*, and susceptibility testing to eight antibiotics. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2017 Feb 13;25:170–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.014>
110. Macheras E, Roux A- L, Ripoll F, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Gaillard J- L, et al. Inaccuracy of Single-Target Sequencing for Discriminating Species of the *Mycobacterium abscessus* Group. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009;47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00037-09>
111. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, et al. Cohort Study of Molecular Identification and Typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 Jul 6;47(7):1985–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708513/>
112. Tan JL, Khang TF, Ngeow YF, Choo SW. A phylogenomic approach to bacterial subspecies classification: proof of concept in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics* [Internet]. 2013;14(1):879. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-879>
113. Fangous M-S, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, et al. Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014;52(9):3362–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25009048>
114. Lotz A, Ferroni A, Beretti J-L, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, et al. Rapid Identification of *Mycobacterial* Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-

- Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010 Dec 1;48(12):4481 LP – 4486. Available from: <http://jcm.asm.org/content/48/12/4481.abstract>
115. Han XY, Dé I, Jacobson KL. Rapidly Growing Mycobacteria Clinical and Microbiologic Studies of 115 Cases. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2007 Oct 1;128(4):612–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1309/1KB2GKYT1BUEYLB5>
116. Simmon KE, Kommedal Ø, Saebo Ø, Karlsen B, Petti CA. Simultaneous Sequence Analysis of the 16S rRNA and rpoB Genes by Use of RipSeq Software To Identify Mycobacterium Species. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010 Sep 7;48(9):3231–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937733/>
117. Zelazny AM, Calhoun LB, Li L, Shea YR, Fischer SH. Identification of Mycobacterium Species by secA1 Sequences. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Mar 8;43(3):1051–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1081289/>
118. Dai J, Chen Y, Dean S, Morris JG, Salfinger M, Johnson JA. Multiple-Genome Comparison Reveals New Loci for Mycobacterium Species Identification. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 Jan 3;49(1):144–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3020452/>
119. Slany M, Pavlik I. Molecular Detection of Nontuberculous Mycobacteria: Advantages and Limits of a Broad-Range Sequencing Approach. *J Mol Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2012;22(4):268–76. Available from: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000342517>
120. Buchan BW, Riebe KM, Timke M, Kostrzewa M, Ledebøer NA. Comparison of MALDI-TOF MS With HPLC and Nucleic Acid Sequencing for the Identification of Mycobacterium

- Species in Cultures Using Solid Medium and Broth. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2014 Jan 1;141(1):25–34. Available from: <https://doi.org/10.1309/AJCPBPUBUDEW2OAG>
121. No Title. WHO Glob Tuberc Rep 2015 World Heal Organ Geneva [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 25 July 2016.
  122. European Centre for Disease Prevention and Control. Vigilancia y control de la tuberculosis en Europa 2012, Resumen. 2012;4. Available from: <http://ecdc.europa.eu/es/publications/Publications/1203-Annual-TB-Report.pdf>
  123. Martínez S, Cano A, Alfonso L, Yoldi S, María J, García G, et al. Micobacterias no tuberculosas. ¿Una amenaza emergente? *Arch Bronconeumol*. 2017;53(10):554–60.
  124. García-Martos P, García-Agudo L. Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2016;34(03):192–200. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-infecciones-por-micobacterias-crecimiento-rapido-90118269>
  125. Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(11):1370–7.
  126. Wilson L. The historical decline of tuberculosis in Europe and America: its causes and significance. *J Hist Med Allied Sci*. 1990;45(3):366–96.
  127. JO F. Non-tuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* [Internet]. 2002;23(3):529–51. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(02)00014-X)
  128. Da Mata Jardín O, Hernández-Pérez R, Corrales H, Cardoso-

- Leao S, de Waard JH. Seguimiento de un brote de infección en tejido blando causado por *Mycobacterium abscessus* posterior a la mesoterapia en Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010;28(09):596–601. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-seguimiento-un-brote-infeccion-tejido-13184022>
129. Ohkusu K, Bermudez LE, Nash KA, MacGregor RR, Inderlied CB. Differential Virulence of *Mycobacterium avium* Strains Isolated from HIV-Infected Patients with Disseminated *M. avium* Complex Disease. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Oct 1;190(7):1347–54. Available from: <https://doi.org/10.1086/424488>
130. Santin M, Barrabeig I, Malchair P, Gonzalez-Luquero L, Benitez MA, Sabria J, et al. Pulmonary Infections with Nontuberculous *Mycobacteria*, Catalonia, Spain, 1994-2014. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2018 Jun;24(6):1091–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004863/>
131. Anna Rodés Monegal MMLE i MGL. Informe anual 2016 Situació epidemiològica i tendència de l' endèmia tuberculosa a Catalunya Prevenió i control de la tuberculosi a Catalunya [Internet]. Barcelona: Agència de Salut Pública de Catalunya. Departament de Salut.; 2016. Available from: [http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/contingut\\_responsiu/salutAZ/T/tuberculosi/documents\\_prof/arxius/informe\\_anual\\_tuberculosi\\_2016.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/contingut_responsiu/salutAZ/T/tuberculosi/documents_prof/arxius/informe_anual_tuberculosi_2016.pdf)
132. María Dolores Pérez Hernández; Ana Penedo Pallarés; Andrea García Bernardo; Juan José Palacios Gutiérrez. Informe Epidemiológico Tuberculosis en Asturias 2015 [Internet]. Oviedo: Servicio de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad del Principado de Asturias; 2015. p. 1–88. Available from: [www.asturias.es/portal/site/astursalud](http://www.asturias.es/portal/site/astursalud)

133. Russell CD, Claxton P, Doig C, Seagar A-L, Rayner A, Laurenson IF. Non-tuberculous mycobacteria: a retrospective review of Scottish isolates from 2000 to 2010. *Thorax* [Internet]. 2014 Jun 1;69(6):593 LP – 595. Available from: <http://thorax.bmj.com/content/69/6/593.abstract>
134. McDonald E, Johnston F, Walsh L, Smith M, Laurenson I, Seagar L, et al. Enhanced Surveillance of Mycobacterial Infections (ESMI) in Scotland: 2018 tuberculosis annual report for Scotland. 2018; Available from: <https://www.hps.scot.nhs.uk/web-resources-container/enhanced-surveillance-of-mycobacterial-infections-esmi-in-scotland-2018-tuberculosis-annual-report-for-scotland/>
135. Ruas R, Abreu I, Nuak J, Ramos A, Carvalho T, Ribeiro M, et al. Nontuberculous mycobacteria in a tertiary Hospital in Portugal: A clinical review. *Int J Mycobacteriology* [Internet]. 2017 Oct 1;6(4):344–8. Available from: <http://www.ijmyco.org/article.asp?issn=2212-5531>
136. Programa Nacional para a Tuberculose. Tuberculose em Portugal. Port Ministério da Saúde Direção-Geral da Saúde Tuberc em Port Desafios e Estratégias 2018 [Internet]. 2018; Available from: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=2ahUKEwiOxeyj4YLjAhVwAWMBHTZPBHkQFjACegQIABAC&url=https%3A%2F%2Fwww.dgs.pt%2Fportal-da-estatistica-da-saude%2Fdiretorio-de-informacao%2Fdiretorio-de-informacao%2Fpor-serie-963780-pdf.aspx%3Fv%3D11736b14-73e6-4b34-a8e8-d22502108547&usg=AOvVaw2Go77SRpG5qUSbggLt4II1>
137. Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, Schluger NW, Saiman L. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008 Mar;14(3):390–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325252>
138. Marras TK, Mendelson D, Marchand-Austin A, May K,

- Jamieson FB. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998-2010. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2013 Nov;19(11):1889–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210012>
139. Henkle E, Hedberg K, Schafer S, Novosad S, Winthrop KL. Population-based Incidence of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease in Oregon 2007 to 2012. 2015;12(5).
140. Nacional C, Iii SC. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España . 2014;1–30.
141. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2014. Madrid, 2015. Available from: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwjE-ITOG4rjAhUTHcAKHdtzDWUQFjAAegQIBBAC&url=http%3A%2F%2Fwww.isciii.es%2FISCIIE%2Fes%2Fcontenidos%2Ffd-servicios-cientifico-tecnicos%2Ffd-vigilancias-alertas%2Ffd-enfermedades%2Fpdf\\_2015%2FTB\\_Informe\\_2014.pdf&usg=AOvVaw1khnC4gqhzwUplQGBu8l8](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwjE-ITOG4rjAhUTHcAKHdtzDWUQFjAAegQIBBAC&url=http%3A%2F%2Fwww.isciii.es%2FISCIIE%2Fes%2Fcontenidos%2Ffd-servicios-cientifico-tecnicos%2Ffd-vigilancias-alertas%2Ffd-enfermedades%2Fpdf_2015%2FTB_Informe_2014.pdf&usg=AOvVaw1khnC4gqhzwUplQGBu8l8)
142. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2015. 2015.
143. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2018 – 2016 data.
144. Ringshausen FC, Wagner D, de Roux A, Diel R, Hohmann D, Hickstein L, et al. Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease, Germany, 2009-2014. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2016 Jun;22(6):1102–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191473>

145. Morimoto K, Hasegawa N, Izumi K, Namkoong H, Uchimura K, Yoshiyama T. A Laboratory-based Analysis of Nontuberculous Mycobacterial Lung. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(1):49–56.
146. Spaulding AB, Lai YL, Zelazny AM, Olivier KN, Kadri SS, Prevots DR, et al. Geographic Distribution of Nontuberculous Mycobacterial Species. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(11):1655–61.
147. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Tuberculosis Vigilancia 2012 a 2017. Madrid 2019. 2017; Available from: [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf\\_2019/RENAVE\\_TBC\\_2017.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2019/RENAVE_TBC_2017.pdf)
148. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med* [Internet]. 2014/11/06. 2015 Mar;36(1):13–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25676516>
149. Daley C. Mycobacterium avium Complex Disease. *Microbiol Spectr*. 2017;5(TNMI7-0045-2017.).
150. Stout JE, Koh W, Wai W. International Journal of Infectious Diseases Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2016;45:123–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.006>
151. Tan Y, Su B, Shu W, Cai X, Kuang S, Kuang H, et al. Epidemiology of pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria in Southern China, 2013–2016. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2018 Nov;18(1):168. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0728-z>
152. Yoon HJ, Choi HY, Ki M. Nontuberculosis mycobacterial

- infections at a specialized tuberculosis treatment centre in the Republic of Korea. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2017 Jun;17(1):432. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2532-4>
153. Field SK, Cowie RL. Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria. *Chest* [Internet]. 2006 Jun 1;129(6):1653–72. Available from: <https://doi.org/10.1378/chest.129.6.1653>
154. Marras TK, Campitelli MA, Kwong JC, Lu H, Brode SK, Marchand-Austin A, et al. Risk of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease with obstructive lung disease. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 Sep 1;48(3):928 LP – 931. Available from: <http://erj.ersjournals.com/content/48/3/928.abstract>
155. Kim RD, Greenberg DE, Ehrmantraut ME, Guide S V, Ding L, Shea Y, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease: prospective study of a distinct preexisting syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2008/08/14. 2008 Nov 15;178(10):1066–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703788>
156. Reich JM, Johnson RE. Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease Presenting as an Isolated Lingular or Middle Lobe Pattern: The Lady Windermere Syndrome. *Chest* [Internet]. 1992 Jun 1;101(6):1605–9. Available from: <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1605>
157. Goto T, Hamaguchi R, Maeshima A, Oyamada Y, Kato R. Pulmonary Resection for *Mycobacterium Chelonae* Infection. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;18(2):128–31.
158. Ko Y, Kim W, Shin BS, Yoo H, Eom JS, Lee JH, et al. Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease Caused by *Mycobacterium chelonae*: A Case Report. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* [Internet]. 2013/04/30. 2013 Apr;74(4):191–4. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678362>
159. Rodríguez-blanco I, Fernández LC, Manuel J, Peñaranda S, Luisa M, Almagro M. *Mycobacterium chelonae* Infection Associated with Tattoos. *Acta Derm Venereol*. 2011;91(61):106.
  160. Kennedy BS, Bedard B, Younge M, Tuttle D, Ammerman E, Ricci J, et al. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* Infection Associated with Tattoo Ink. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Aug 22;367(11):1020–4. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205114>
  161. Binić I, Janković A, Ljubenović M, Gligorijević J, Jančić S, Janković D. *Mycobacterium chelonae* Infection Due to Black Tattoo Ink Dilution. *Am J Clin Dermatol* [Internet]. 2011;12(6):404–6. Available from: <https://doi.org/10.2165/11589500-000000000-00000>
  162. Andréjak C, Lescure F-X, Pukenyte E, Douadi Y, Yazdanpanah Y, Laurans G, et al. *Mycobacterium xenopi* pulmonary infections: a multicentric retrospective study of 136 cases in north-east France. *Thorax* [Internet]. 2009 Apr 1;64(4):291 LP – 296. Available from: <http://thorax.bmj.com/content/64/4/291.abstract>
  163. van Ingen J, Boeree MJ, de Lange WCM, Hoefsloot W, Bendien SA, Magis-Escurra C, et al. *Mycobacterium xenopi* clinical relevance and determinants, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008 Mar;14(3):385–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325251>
  164. Casabona N, Roselló J. *Micobacterias ambientales en España: aislamientos en el periodo 1976-1996*. *Med Clin (Barc)*. 2000;115:663–70.
  165. Leal M, Gaafar A, Unzaga M, Crespo J, Cisterna R, García F. Estudio clinicoepidemiológico de la enfermedad por *Mycobacterium kansasii* en el área urbana de Bilbao. *Arch*

- Bronconeumol. 2005;41:189–96.
166. Sander MA, Isaac-Renton JL, Tyrrell GJ. Cutaneous Nontuberculous Mycobacterial Infections in Alberta, Canada: An Epidemiologic Study and Review. *J Cutan Med Surg*. 2018;22(5):479–83.
  167. Bartralot R, Pujol R, García-Patos V, Sitjas D, Martín-Casabona N, Coll P, et al. Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria : histopathological review of 28 cases . Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. *J Cutan Pathol*. 2000;124–9.
  168. Amresh Kumar Singh, Rungmei S. K.Marak, Anand Kumar Maurya M Das, Nag VL, Dhole TN. *Mycobacterium intermedium* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1993;43(2):204–9.
  169. Singh AK, Marak RSK, Maurya AK, Das M, Nag VL, Dhole TN. Mixed Cutaneous Infection Caused by *Mycobacterium szulgai* and *Mycobacterium intermedium* in a Healthy Adult Female: A Rare Case Report. *Case Rep Dermatol Med* [Internet]. 2015/02/18. 2015;2015:607519. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789180>
  170. Miqueleiz-zapatero A, Olalla-peralta CS, Guerrero-torres MD, Carde L. *Mycobacterium lentiflavum* como causa principal de linfadenitis en población pediátrica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(10):640–3.
  171. Wilson JW, Jagtiani AC, Wengenack NL. *Mycobacterium scrofulaceum* disease: experience from a tertiary medical centre and review of the literature. *Infect Dis (Auckl)* [Internet]. 2019 Jul 2;1–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1634281>
  172. Park S, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ, Lee KS, et al. Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens. *Respir Med* [Internet].

- 2008;102(3):437–42. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0954611107004076>
173. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ. Clinical feature of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1993;147. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/147.5.1271>
174. Society. RC of the BT. First randomised trial of treatments for pulmonary disease caused by *M avium intracellulare*, *M malmoense*, and *M xenopi* in HIV negative patients: rifampicin, ethambutol and isoniazid versus rifampicin and ethambutol. *Thorax* [Internet]. 2001 Mar 1;56(3):167 LP – 172. Available from: <http://thorax.bmj.com/content/56/3/167.abstract>
175. Lapierre SG, Fellag M, Magan C, Drancourt M. *Mycobacterium malmoense* pulmonary infection in France: a case report. *BMC Res Notes* [Internet]. 2017;10(1):436. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2753-z>
176. Abston E, Farber H. Pulmonary Cavity From *Mycobacterium malmoense* in an HIV-Infected Patient: Complicated by Bronchopleural Fistula. *Open forum Infect Dis* [Internet]. 2018 Jan 24;5(2):ofy023–ofy023. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29450215>
177. Dekhuijzen PNR, Soolingen D Van. The rising incidence and clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* : a review of the literature. 2008;12(February):987–93.
178. Sfeir M, Walsh M, Rosa R, Aragon L, Liu SY, Cleary T, et al. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections: A Retrospective Cohort Study. *Open forum Infect Dis* [Internet]. 2018 Feb 9;5(2):ofy022–ofy022. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29450214>
179. Adelman MH, Addrizzo-Harris DJ. Management of

- nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2018;24(3). Available from: [https://journals.lww.com/co-pulmonarymedicine/Fulltext/2018/05000/Management\\_of\\_nontuberculous\\_mycobacterial.3.aspx](https://journals.lww.com/co-pulmonarymedicine/Fulltext/2018/05000/Management_of_nontuberculous_mycobacterial.3.aspx)
180. Alcaide F, Esteban J. Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010;28:46–50. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-infecciones-cutaneas-partes-blandas-por-S0213005X10700082>
181. Lake MA, Ambrose LR, Lipman MCI, Lowe DM. “Why me, why now?” Using clinical immunology and epidemiology to explain who gets nontuberculous mycobacterial infection. *BMC Med* [Internet]. 2016 Mar;14(1):54. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0606-6>
182. Bermejo MC, Clavera I, Michel de la Rosa FJ, Marín B. Epidemiología de la tuberculosis . Vol. 30, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* . scieloes ; 2007. p. 7–19.
183. Ryu YJ, Koh W-J, Daley CL. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians’ Perspectives. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* [Internet]. 2016/03/31. 2016 Apr;79(2):74–84. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066084>
184. Eichelmann K, González SEG, Ocampo-candiani JCSJ. Lepra : puesta al día . Definición , patogénesis , clasificación , diagnóstico y tratamiento. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(7):554–63.
185. Aslam S, Peraza J, Mekaiel A, Castro M, Casanas B. Major risk factors for leprosy in a non-endemic area of the United States: A case series. *IDCases* [Internet]. 2019 May 9;17:e00557–e00557. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31193361>

186. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Apr 28;364(17):1626–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524213>
187. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial para la lepra 2016-2020 [Internet]. 2016. 70 p. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208824/9/9789290225195-SPA.pdf?ua=1>
188. Rodríguez E, Díaz O, Hernández G. Vigilancia de la lepra en España en 2012 y situación mundial. *Boletín epidemiológico Sem* [Internet]. 2013;21(1):1–4. Available from: <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/779/887>
189. Wolff K, Fitzpatrick T, Johnson R. Atlas en color y sinopsis de dermatología clínica. Madrid, etc.: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
190. Martínez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006 Sep;44(9):3154–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954241>
191. [Internet]. 2019 [cited 21 July 2019]. Available from: <https://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5513s/3.html>.
192. [Internet]. Who.int. 2019 [cited 21 July 2019]. Available from: [https://www.who.int/lep/resources/Guide\\_S.pdf](https://www.who.int/lep/resources/Guide_S.pdf).
193. 7. [Internet]. 2019 [cited 21 July 2019]. Available from: <https://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5513s/3.html>.
194. Leprosy [Internet]. Who.int. 2019 [cited 20 July 2019]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>.

## 10. ANEXOS

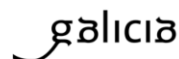




## 10.1. ANEXO I: COMITÉ DE ÉTICA



Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel. 881 546425; ceic@sergas.es



### DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

#### CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 19/07/2016 o estudo:

**Título:** Enfermedades por micobacterias en Santiago de Compostela: características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas (2006-2015)

**Promotor:** Gema Barbeito Castiñeiras

**Tipo de estudo:** Outros

**Código do Promotor:** MNT/MTB

**Código de Rexistro:** 2016/367

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así como os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así como os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
C.H. Universitario de Santiago	Gema Barbeito Castiñeiras

En Santiago de Compostela, a 19 de xullo de 2016  
O secretario

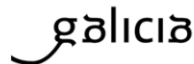


Juan M. Vázquez Lago



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



Juan M. Vázquez Lago, Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo,

**FAI CONSTAR QUE:**

23. O Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo cumpre tanto na súa composición coma nos seus PNTs os requisitos legais vixentes (R.D 1090/2015 de ensaios clínicos, e a Lei 14/2007 de Investigación Biomédica).

24. A composición actual do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo é:

**Carlos Rodríguez Moreno (Presidente)**. Médico especialista en Farmacología clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago.

**Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta)**. Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.

**Juan M. Vázquez Lago (Secretario)**. Médico especialista en Medicina Preventiva e Saúde Pública. Área de Xestión Integrada de Santiago.

**Lorenzo Armenteros del Olmo**. Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.

**Francisco Campos Pérez**. Investigador. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

**Rosana Castelo Domínguez**. Farmacéutica Atención Primaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.

**Daniel De La Iglesia García**. Médico especialista en Dixestivo. Área de Xestión Integrada de Santiago.

**Ricardo García Martínez**. Licenciado en Dereito. Área de Xestión Integrada de Lugo.

**Victor Herrán Carreira**. Paciente, DIL-Asociación de Diabéticos Lucense.

**María Jesús Lamas Díaz**. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.

**María Isabel Loza García**. Licenciada en Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela.

**Guillermo José Prada Ramallal**. Médico especialista en Farmacología clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago. Fundación "Ramón Domínguez". Santiago

**María Jesús Wandosell Picatoste**. Diplomada en Enfermería. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Para que conste onde proceda, e a petición do promotor / investigador, en Santiago de Compostela, a 19 de xullo de 2016.

O Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago Lugo,



Juan M. Vázquez Lago

## 11. INDICES COMPLEMENTARIOS

### 11.1. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 495 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018..... 117
- Figura 2. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 593 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018..... 118
- Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial *Mycobacterium rpoB* 612 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018..... 119
- Figura 4. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 80%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 384 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018..... 120
- Figura 5. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 317 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018..... 121
- Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud (GTR más I más G; aLRT > 80%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 529 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018..... 122
- Figura 7. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de *Mycobacterium rpoB* 274 nucleótidos.

Adaptada de Costa-Alcalde et al. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin.</i> 2018. ....	123
Figura 8. Árbol de máxima verosimilitud (GTR plus I plus G; aLRT > 90%) gen parcial de <i>Mycobacterium rpoB</i> 274 nucleótidos. Adaptada de Costa-Alcalde et al. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin.</i> 2018. ....	124
Figura 9. Aislamientos de MNT y MTUC. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	133
Figura 10. Incidencia de enfermedad por micobacterias. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	137
Figura 11. MTUC/MNT: Número de casos por año y distribución por sexos. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	139
Figura 12. Casos de micobacterias no tuberculosas (por sexo y franja de edad). Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	146

## 11.2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Resistencia de <i>M. tuberculosis</i> complex a los fármacos de primera línea, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016). ....	48
Tabla 2.	Distribución anual de la resistencia a isoniazida en relación al ensayo GenoType MTBDRplus, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016). ....	49
Tabla 3.	Distribución anual de cepas multirresistentes en relación al ensayo GenoType MTBDRplus, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016). ....	50
Tabla 4.	Distribución anual de las cepas con alto nivel de resistencia a isoniazida con relación al ensayo GenoType MTBDRplus. 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016).....	51
Tabla 5.	Distribución anual de cepas no MDR resistentes a isoniazida y rifampicina en relación al ensayo GenoType MTBDRplus, 2008-2013. Adaptada de Pérez del Molino et al, Eur J Clin Microbiol Infect Disease (2016).....	51
Tabla 6.	Resultados de los estudios microbiológicos. ....	64
Tabla 7.	Capacidad diagnóstica tomando el cultivo como referencia. ....	68
Tabla 8.	Capacidad diagnóstica tomando la técnica de cultivo como referencia: resultados estratificados por baciloscopia. ....	69
Tabla 9.	Capacidad diagnóstica tomando el diagnóstico de enfermedad tuberculosa pulmonar como referencia.....	70
Tabla 10.	Capacidad diagnóstica tomando el diagnóstico de enfermedad tuberculosa pulmonar como referencia: resultados estratificados por el resultado de la baciloscopia. ....	71
Tabla 11.	Secuencias de referencia del gen <i>rpoβ</i> . Adaptada de Costa-Alcalde et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018. ....	99

Tabla 12. Muestras clínicas, identificación con GenoType®, análisis filogenético, BLAST, % similitud con BLAST, identificación con MALDI-TOF y puntuación de MALDI-TOF. Adaptada de Costa-Alcalde et al. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin.</i> 2018.....	112
Tabla 13. Identificación por secuenciación parcial de <i>rpoβ</i> . Amplitud del amplicón <i>rpoβ</i> y porcentaje de similitud con las secuencias de GenBank. Adaptada de Costa-Alcalde et al. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin.</i> 2018. ....	115
Tabla 14. Identificación mediante secuenciación parcial de <i>rpoβ</i> con cepas de referencia obtenidas de GenBank. Adaptada de Costa-Alcalde et al. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin.</i> 2018 .....	116
Tabla 15. Aislamientos de micobacterias según el tipo de muestra. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	135
Tabla 16. Especies de MNT. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	136
Tabla 17. Localización de los casos de enfermedad por micobacterias. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	141
Tabla 18. Aislamientos y localización de MNT en casos clínicamente significativos. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	143
Tabla 19. Tuberculosis: factores de riesgo/ comorbilidad. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	149
Tabla 20. MNT: factores de riesgo/comorbilidad. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	149
Tabla 21. Especies de MNT: factores de riesgo/comorbilidad. Área sanitaria de Santiago de Compostela (2006-2015). ....	150