

## MESA: Microbiología

**Moderadores:** **Fernando Alcaide.** *Microbiólogo. Hospital Universitario de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.*  
**Griselda Tudó.** *Microbióloga Hospital Clínic-ISGLOBAL. Barcelona.*

### Caracterización molecular de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes aisladas en el Hospital Vall d'Hebron

**M<sup>a</sup> Teresa Tórtola Fernández**

*Microbióloga. Unidad de Salud Internacional-TB Drassanes. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.*

Correspondencia:

M<sup>a</sup> Teresa Tórtola

E-mail: ttortola@vhebron.net

La tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública mundial. Para un buen control de la tuberculosis se debe realizar el diagnóstico y la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* rápidamente para evitar la propagación de la tuberculosis entre la población. El aislamiento de cepas resistentes de *M.tuberculosis* y especialmente el aislamiento de cepas multirresistente (MDR-TB) son un reto importante para el control y el tratamiento de los pacientes con tuberculosis.

La epidemiología molecular de *M.tuberculosis* ha permitido un mejor conocimiento de la patogenia y transmisión de la enfermedad tuberculosa y ha demostrado tener una gran utilidad en el control de la tuberculosis. Desde la perspectiva de salud pública, el tipado molecular de *M. tuberculosis* facilita la detección de brotes no sospechados y la identificación de cadenas de transmisión y casos secundarios de infección.

Dentro de las técnicas moleculares para el estudio de *M. tuberculosis* se encuentra la técnica basada en la detección del número variable de repeticiones en tándem (VNTR) aplicado a elementos genéticos denominados unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRU), de ahí la denominación MIRU-VNTR. El MIRU-VNTR es una técnica de referencia para la caracterización genética de *M. tuberculosis*. La tipificación por MIRU-VNTR se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con ella se detecta y compara la variación del tamaño (polimorfismo) de cada uno de los *loci* estudiados. Con la técnica de MIRU-VNTR se pueden estudiar 24 *loci* o 15 *loci* según se quieran realizar estudios filogenéticos o estudios epidemiológicos respectivamente.

Se han estudiado 9 aislamientos de *M.tuberculosis* multirresistentes aislados en el Hospital Universitario Vall d'Hebron entre los años 1996-2018. Estos aislamientos se obtuvieron de 9 pacientes, con las siguientes nacionalidades: 4 españoles, 2 ecuatorianos, 1 peruano, 1 boliviano y 1 pakistaní.

Se realizó la técnica de tipificación molecular MIRU-VNTR de 15 *loci* descrita por Supply<sup>1</sup>. A cada aislamiento de *M.tuberculosis* se le realizaron quince PCR simples, una por cada locus. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 2%. Como colorante del ADN se empleó el reactivo SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). Para determinar el tamaño de los amplicones analizados se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (ROCHE). Para la asignación del número de repeticiones en tándem en función del peso molecular de los amplicones obtenido para cada *loci* se utilizó la tabla descrita por Supply<sup>1</sup>. El código numérico obtenido con los datos de los quince *loci* estudiados en cada aislamiento de *M.tuberculosis* se introdujo en la base de datos on-line MIRU-VNTRplus<sup>2</sup>, con ello pudimos comparar los aislados de *M.tuberculosis* estudiados con las cepas de referencia presentes en dicha base.

Obtuvimos diferentes mirutipos lo que sugiere gran variabilidad genética entre los aislados de *M. tuberculosis* e indicaría que la mayoría de los casos de tuberculosis multirresistente estudiados pueden ser atribuibles a reactivaciones endógenas.

## Bibliografía

1. Supply P. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide 2005. [https://](https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf)

[www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf](https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf)

2. MIRU-VNTRplus. <https://www.miru-vntrplus.org>

---

# Impact of Human Lung Environment in *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis

**Jordi B. Torrelles**

Microbiólogo. Population Health Program, Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, Texas, USA.

### Correspondencia:

Jordi B. Torrelles

E-mail: [Jtorrelles@txbiomed.org](mailto:Jtorrelles@txbiomed.org)

WHO estimates that, using current tuberculosis (TB) disease management, up to 36 million people will die of TB annually and cost the global economy \$16.7 trillion by 2035<sup>1</sup>. TB is a respiratory disease and as such, the critical first interaction between inhaled *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) and the host is in environment of the alveolar space<sup>2</sup>. The outcome of this interaction is infection leading to latency, active disease or possibly aborted infection/ or clearance.

During infection, *M.tb* is deposited in the lung where it is exposed to different environments over time. First, *M.tb* encounters the alveolar space, where it is in direct contact with the lung mucosa (defined as Alveolar Lining Fluid or ALF) for an unknown period (from minutes to hours/days). Alterations in innate and adaptive immune function can dictate the outcome between control of primary *M.tb* infection and reactivation yet little is known about how human ALF soluble components contribute to this process. We and others have demonstrated that components of human ALF [e.g. Surfactant protein-A (SP-A) and -D (SP-D), homeostatic hydrolases, lipids, and the complement system, among others) significantly contribute to the innate immune response against *M.tb* infection (Figure 1). Our published studies support the concept that humans differ in their local lung tissue environment, where differences in ALF composition and function are found<sup>3</sup>.

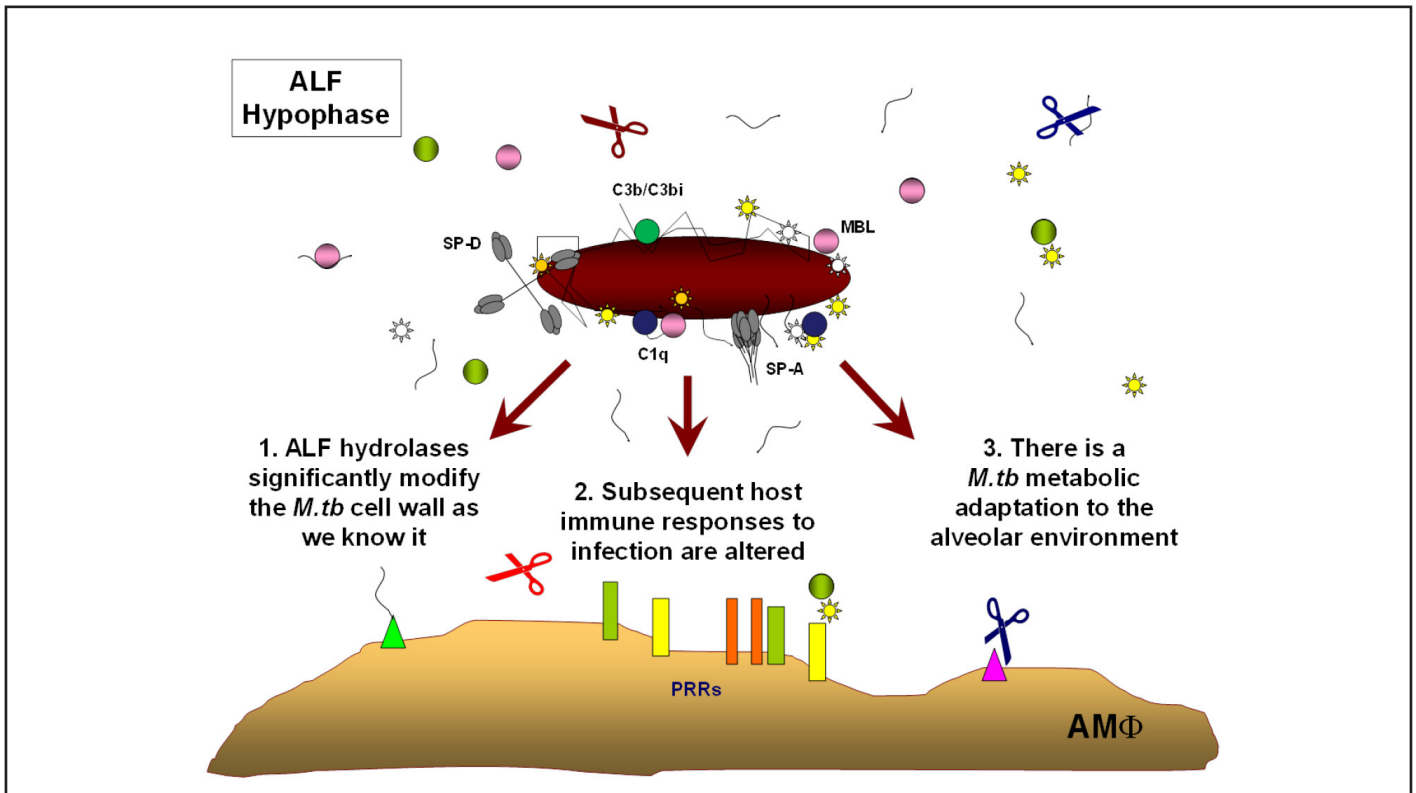
Human ALF is important in determining the outcome of *M.tb* infection. We have shown that exposure of *M.tb* to human

ALF significantly reduces the content of mannose-capped lipopolysaccharide (ManLAM) and trehalose dimycolate (TDM), two major *M.tb* virulence factors implicated in *M.tb* intracellular survival, on the *M.tb* cell wall surface<sup>4</sup>. Our recent studies demonstrate that exposure of *M.tb* to human ALF also alters host immune responses both *in vitro* and *in vivo*. Our data also indicate a potential direct correlation among the oxidative status of human ALF, function of ALF components, and modulation of *M.tb* growth within host cells.

Based on our current data, we have identified two well-differentiated types of human ALF: ones that upon exposure drive exacerbation of *M.tb* infection, and others that drive better control of *M.tb* infection *in vitro* and *in vivo*. We define these as H-ALF (upon exposure increases the *M.tb* growth rate during infection) and L-ALF (upon exposure slows the *M.tb* growth rate during infection). Thus, for the first time we demonstrate that human ALF-induced changes on the *M.tb* cell wall, that occur upon the first contact of *M.tb* with ALF during its natural path of infection, can determine the capacity of the host to control *M.tb* infection. These results support the concept that the status, composition and function of the human pulmonary environment can determine mucosal immune responses critical for control or exacerbation of pulmonary infections in humans.

Importantly, when we studied TB comorbidities such as the elderly<sup>5</sup>, HIV co-infection and diabetes, we observed that ALF from people having these co-morbidities accelerates *M.tb*

**Figure 1. Impact of the human lung mucosa in *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) pathogenesis.** *M.tb* exposure to the human alveolar environment alters its cell wall composition, as we know it, and subsequently alters the interaction of other soluble immune mediators present in the alveolar lung mucosa (or alveolar lining fluid, ALF) with the *M.tb* cell wall (e.g. differential opsonization). This drives a differential interaction of *M.tb* with host cells [with professional (macrophages, neutrophils) and non-professional (alveolar epithelial cells) host cells], which could result in a better control of the infection (e.g. clearance) or to a faster *M.tb* replication state within host cells (e.g. development of active TB disease). C1q, C3b/C3bi (components of the complement system shown to interact with the *M.tb* cell wall surface), SP-A-D (surfactant proteins A and D), MBL (mannose binding lectin). Scissors represent homeostatic hydrolytic enzymes (hydrolases) present on ALF, which function is to assist the host organism to recycle ALF in their lungs every 18 h. These hydrolases are capable to modify the cell envelope of *M.tb* during infection determining how the bacterium will interact with host cells during infection.



infection and its intracellular growth within the cells *in vitro* and *in vivo*.

In summary, we define the lung mucosa as critical in driving better control and/or clear *M.tb* infection, and consequently, our results will allow for future translational studies in *M.tb* infection prevention, and/or the prevention of *M.tb*-infected individuals in developing active TB and subsequent transmission of infection. Knowledge gained from our proposed studies could change concepts, where we must consider that the first interaction with the lung mucosa determines the *M.tb* outcome. Indeed, our findings could have broader applications to prevent infections by other respiratory mucosal pathogens, and the development of inflammatory pulmonary diseases affecting humans.

## References

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2019;1-262 (WHO Organization, Geneva, 2019).
2. Torrelles JB, Schlesinger LS. Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. *Trends Microbiol.* 2017;25:688-97. doi:10.1016/j.tim.2017.03.007.
3. Moliva JI, Rajaram MVS, Sidiki S, Sasindran SJ, Guirado E, Jeff Pan X, et al. Molecular composition of the alveolar lining fluid in the aging lung. *Age (Dordr.)* 2014;36:9633. doi:10.1007/s11357-014-9633-4 [doi].
4. Arcos J, Sasindran SJ, Fujiwara N, Turner J, Schlesinger LS, Torrelles JB. Human Lung Hydrolases Delineate Mycobacterium tuberculosis-Macrophage Interactions and the Capacity to Control Infection. *J. Immunol.* 2011;187:372-81.
5. Moliva JI, Duncan MA, Olmo-Fontánez A, Akhter A, Arnett E, Scordo JM, et al. The Lung Mucosa Environment in the Elderly Increases Host Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Infect Dis.* 2019;220:514-23. doi:10.1093/infdis/jiz138.

# Clinical evaluation of LIAISON XL for the performance of the QuantiFERON-TB Gold Plus assay in a low-incidence tuberculosis area

Miguel Fernández-Huerta, Erika-Inés García de Cara, Neus Vila-Olmo, Fernando Alcaide

Microbiology Department. Bellvitge University Hospital. University of Barcelona. Barcelona, Spain.

Correspondencia:

Miguel Fernández

E-mail: miguelferhuer@gmail.com

The QuantiFERON-TB® Gold Plus assay (QFT-Plus; Qiagen, Germany) is frequently used for the *in vitro* diagnosis of latent tuberculosis infection<sup>1</sup>. This interferon- $\gamma$  release assay (IGRA), based on the stimulation of the T-cell-mediated immune response by antigens specific to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, is commonly performed using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Recently, the LIAISON® XL analyzer (DiaSorin, Italy), using chemiluminescent (CLIA) detection, became available for the implementation of the QFT-Plus test in laboratory routine<sup>2</sup>. In this study, we evaluate the clinical and analytical performance of the CLIA analyzer LIAISON® XL for the detection of IFN- $\gamma$  in the diagnosis of latent tuberculosis in a low-incidence setting.

Between February and April 2020, 333 heparin blood samples were collected for the routine performance of the QFT-Plus test at the Bellvitge University Hospital in Barcelona, Spain. During the

study period, specimens were prospectively and simultaneously analyzed using the QFT-Plus ELISA assay (Qiagen, Germany) on the DS2 automated platform (Dynex, USA), and the LIAISON® XL instrument. Results were interpreted according to the manufacturer's criteria (positivity threshold 0.35 IU/mL). Ethical approval for the study was obtained from the Bellvitge University Hospital Ethics Committee (approval number PR083/20). Statistical analyses were performed with Stata (StataCorp, USA). The Cohen's kappa statistic ( $\kappa$ ) was used to evaluate the agreement between both assays, and 95% confidence intervals (CI) were calculated by exact methods. The Pearson correlation coefficient ( $r$ ) was also calculated.

The level of concordance between both ELISA and CLIA methods was 95.5% (95% CI, 92.7%-98.9%), with a kappa value of 0.872 (95% CI, 0.809-0.935). The quantitative analytical evaluation

**Table. Comprehensive clinical and analytical analysis of QuantiFERON-TB Gold Plus discrepant cases.**

Type of disagreement	Case	Age	Gender	Result	QFT CLIA (IU/mL)				Result	QFT ELISA (IU/mL)				Relevant clinical history
					NIL	TB1-NIL	TB2-NIL	MIT-NIL		NIL-NIL	TB1-NIL	TB2-NIL	MIT-NIL	
Major	1	49	M	P	0.03	0.10	0.42	10.00	N	0.03	0.04	0.04	8.78	Unknown
Major	2	47	F	P	0.15	0.25	0.57	10.00	N	0.10	0.11	0.30	7.86	Multiple sclerosis
Minor	3	56	F	I	9.07	10.00	10.00	10.00	N	7.58	1.03	1.03	1.03	None
Minor	4	54	M	N	0.01	0.10	0.16	0.55	I	0.03	0.00	0.00	0.36	COVID-19
Minor	5	70	M	N	0.02	-0.01	-0.01	0.63	I	0.06	-0.04	-0.04	0.31	COVID-19
Minor	6	81	F	N	0.05	-0.00	-0.00	1.09	I	0.03	0.00	0.00	0.43	COVID-19
Minor	7	47	F	N	0.00	0.00	0.11	0.56	I	0.03	-0.01	0.00	0.28	Renal transplant
Major	8	23	F	P	0.24	0.78	0.98	10.00	N	0.08	0.21	0.30	6.22	Tuberculous pleurisy
Major	9	76	M	P	0.01	0.30	0.39	1.24	N	0.02	0.19	0.15	0.68	COVID-19
Minor	10	73	M	N	0.03	0.00	0.01	0.56	I	0.03	-0.01	-0.01	0.49	COVID-19
Minor	11	64	F	N	0.02	0.06	-0.00	0.64	I	0.01	0.00	0.00	0.37	None
Major	12	65	F	P	0.10	0.40	0.53	10.00	N	0.03	0.15	0.23	7.57	Psoriasis, pleuropulmonary tuberculosis contact
Minor	13	42	M	N	0.00	0.01	0.01	0.78	I	0.01	0.00	0.00	0.47	COVID-19
Minor	14	56	F	N	0.02	0.02	0.02	0.50	I	0.03	0.00	0.00	0.13	SLE
Major	15	53	F	P	0.04	0.38	0.20	10.00	N	0.04	0.27	0.13	10.00	Unknown

Abbreviations: IU, international units; CLIA, chemiluminescent immunoassay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MIT, mitogen; M, male; F, female; P, positive; N, negative; I, indeterminate; SLE, systemic lupus erythematosus.

of QFT-Plus results (data not shown) indicates a great correlation between techniques for the detection of IFN- $\gamma$  in both TB1 and TB2 tubes ( $r$ ; 0.959 and 0.958, respectively); also within the equivocal range defined between 0.2 and 0.7 IU/mL ( $r$ ; 0.906 and 0.890, respectively)<sup>3</sup>. On the other hand, a comprehensive analysis of the discrepant cases is presented in the table. Overall, most of them (53.3%) corresponded to indeterminate results with the ELISA (mitogen <0.5 IU/mL) that analyzed with the CLIA analyzer LIAISON® XL reverted to interpretable analyses. Also, interestingly, in one case (number 8 in the table) a major disagreement between both IGRA methods (being positive with CLIA and negative -but borderline- with ELISA) occurred in a female patient with tuberculous pleurisy.

In conclusion, the CLIA analyzer LIAISON® XL performs well for the detection of IFN- $\gamma$  in the clinical diagnosis of latent tuberculosis in our settings. Furthermore, the presumably greater sensitivity of the LIAISON® XL for the detection of IFN- $\gamma$  may decrease the rate of indeterminate results in QFT-Plus tests. The

analytical variability of both ELISA and CLIA methods, especially around the standardized 0.35 IU/mL positivity threshold, may suggest the need to refine the interpretative algorithm by utilizing an adjusted equivocal range for QFT-Plus results. Finally, the fully-automated CLIA platform LIAISON® XL presents some key technical advantages in comparison to the ELISAs. Thus, based on a continuous-load system, the performance of QFT-Plus tests with the LIAISON® XL analyzer is simple, efficient and potentially less expensive; providing prompt results that are important for the clinical management of infected individuals.

## References

1. Sotgiu G, *et al.* QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2019;79:444-53.
2. Maertelaere ED, *et al.* Evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus on Liaison XL in a Low-Tuberculosis-Incidence Setting. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00159-20.
3. Brown J, *et al.* Frequency and significance of indeterminate and borderline Quantiferon Gold TB IGRA results. *Eur Respir J.* 2017;50:1701267.

## Metodología para evaluar pruebas de diagnóstico de una enfermedad sin *gold standard* a propósito de la TB pediátrica

Rosa Abellana

Unitat de Bioestadística. Departament de Fonaments Clínics. Universitat de Barcelona.

Correspondencia:

Rosa Abellana

E-mail: rabellana@ub.edu

Una prueba o test diagnóstico es un instrumento importante en la práctica y la investigación clínica porque es una herramienta para tomar una decisión médica sobre el estado de salud de un paciente. El conocimiento del funcionamiento o la calidad de los test de diagnóstico es de vital importancia. Esta calidad se evalúa mediante los parámetros de validez y seguridad. La validez del test de diagnóstico es el grado con que un test detecta la enfermedad y se mide mediante los parámetros de sensibilidad y especificidad. Y la seguridad es la certeza con que un test predice la presencia o ausencia de la enfermedad en un paciente.

En el paradigma clásico, la evaluación de la validez y seguridad de un test se realiza comparando los resultados del test de diagnóstico con un test de referencia considerado *gold stan-*

*ard* (test con sensibilidad y especificidad del 100%). Pero hay enfermedades en las que no hay un test de referencia perfecto o la verificación mediante el test de referencia es impracticable debido a los costes, accesibilidad o riesgo de la prueba. En estas situaciones cuando el test de referencia no refleja la verdad de manera adecuada, es decir, es un test imperfecto, la validez y la seguridad del test están sujetos a errores.

En la última década, en el campo de la medicina y veterinaria se ha aplicado el análisis de clase latente (ACL) para estimar la sensibilidad y especificidad de un test o varios test en ausencia de *gold standard*. En estos análisis el estado real de salud del paciente es un dato latente (Formann and Kolmann, 1996). Y particularmente, ACL modelan la condición no observable como una variable latente categórica. La problemática de los ACL es

que tenemos más parámetros a estimar que los grados de libertad de los datos necesarios para poder estimar estos parámetros. Des del punto de vista de máxima verosimilitud se debe imponer restricciones a los parámetros para poder ser estimados, como, por ejemplo, asumir que la sensibilidad o la especificidad de uno de los dos test es conocida, o que las especificidades son conocidas. Las estimaciones del resto de parámetros se calculan condicionadas a estos valores y no se podrá ni estimar ni conocer la incertidumbre de los parámetros que hayan sido fijados. Dado que usualmente todos los parámetros son desconocidos las restricciones impuestas serán a menudo arbitrarias. Una posible solución para evitar la imposición de restricciones de los parámetros es utilizar aproximaciones bayesianas y concretamente asignar una distribución de probabilidad a los parámetros a estimar, conocidas como distribuciones *a priori*. La información de los datos, a través de la función de verosimilitud y la combinación de la distribución *a priori* se obtiene la distribución posterior de los parámetros, que nos va permitir obtener la estimación puntual y por intervalo de la prevalencia y la sensibilidad y especificidad de los test (Joseph *et al.*, 1995).

## Caso ejemplo

Se realizó un estudio transversal para calcular la prevalencia de la infección tuberculosa latente y determinar la exactitud y la validez del test *Tuberculin Skin Test* (TST) y *Quantiferon-TB Gold In-Tube Assay* (QFT) (Perez-Porcuna *et al.*, 2016). El estudio incluye una muestra de 29 niños menores de 6 años sin ningún contacto reciente conocido con TB y otro grupo de 92 niños con contacto a un caso índice en los 12 últimos meses. Fueron excluidos del análisis 16 niños porque presentaron un resultado indeterminado con QFT. El reclutamiento de los datos se realizó en la Policlínica Cardoso Fontes y en la Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dorado, Manaus (Brasil) entre marzo del 2009 a febrero del 2010. Todos los casos índices adultos tenían esputo y cultivo positivo. Los individuos que recibieron tratamiento o profilaxis de TB fueron excluidos.

Para estimar la prevalencia y la sensibilidad y especificidad de ambos test se asumió para la prevalencia una distribución *a priori* no informativa y basándonos en la literatura de LTBI, se

consideró que la sensibilidad y la especificidad de los dos test se encuentran dentro del rango 50%–100 %.

Treinta y cuatro niños (32.7 %) mostraron resultado positivo con el QFT y treinta y tres (31.4 %) con el TST, pero sólo 19 niños (23,9%) dieron positivos para ambos test. Los dos test mostraron una baja concordancia de 0,364 ( $p < 0,001$ ). La prevalencia de la infección en el grupo de niños sin contacto con un caso índice fue de 0,04 (95 % Intervalo de Credibilidad (ICr) [0,00; 0,20], siendo de 0,50 en niños con contacto con un caso índice (95 % ICr [0,28; 0,81]). La sensibilidad del QFT fue de 0,58 (95 % ICr [0,41; 0,78]) y 0,75 (95 % ICr [0,49; 0,94]) para el TST. La especificidad del QFT fue de 0,79 (95 % ICr [0,67; 0,91]) y 0,92 (95 % ICr [0,78; 0,98]) para el TST. En el grupo de niños con el contacto con un caso índice, la probabilidad de que un niño diagnosticado como positivo realmente este infectado fue de 0,74 (95 % ICr [0,47; 0,95]) para QFT y 0,91 (95 % CrI [0,61; 0,99]) para TST. Por otra parte, la probabilidad de que un niño diagnosticado como negativo realmente no este infectado fue de 0,65 (95 % CrI [0,27; 0,88]) para QFT y 0,79 (95 % CrI [0,31; 0,96]) para TST.

## Conclusión

La estimación de la prevalencia de una enfermedad y los parámetros (sensibilidad, especificidad y valores predictivos) de los test utilizados para estudiar la presencia de una enfermedad en ausencia de *gold standard* es un importante avance para la evaluación de test de diagnóstico. Esto es de especial relevancia en el actual contexto epidemiológico y diagnóstico del estudio de la infección por *Mycobacterium Tuberculosis* en la que es imposible determinar si un individuo está realmente infectado o si esta persona presenta respuesta inmune a una infección previa.

## Bibliografía recomendada

- Formann AK, Kohlmann T. Latent class analysis in medical research. *Statistical Methods in Medical Research*. 1996;5(2):179-211.
- Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *American Journal of Epidemiology*. 1995;141(3):263-72.
- Perez-Porcuna TM, Doyle Pereira-da-Silva H, Ascaso C, Malheiro A, Bührer S, Martinez-Espinosa F, *et al.* Prevalence and Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Young Children in the Absence of a Gold Standard. *PLoS One*. 2016;11(10) p. e0164181.