

## MESA: Microbiología

**Moderadores:** **Fernando Alcaide.** Servicio de Microbiología. Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.  
**Montserrat Garrigó.** Servicio de Microbiología. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

### Actividad de combinaciones de antibióticos y agentes antibiofilm frente a *M. avium complex*

**Julià Gonzalez Martin y Grupo de investigación en micobacterias de H. Clínic de Barcelona.**

Servicio de Microbiología. Hospital Clínic. Barcelona.

Correspondencia:

Julià Gonzalez

E-mail: gonzalez@clinic.cat

*M. tuberculosis* es la micobacteria que causa más muertes en el mundo. Sin embargo, las micobacterias no tuberculosas (MNT) son una causa creciente de morbilidad, principalmente en pacientes con patología pulmonar crónica. Al no ser de declaración obligatoria no se conoce con exactitud su incidencia. Algunas estimaciones indican de 1 a 6 pacientes/10<sup>5</sup> h. Aunque comparativamente a TB no parece alta, suelen causar infecciones de evolución tórpida que no se resuelven fácilmente, sobre todo las formas pulmonares.

Centrándonos en la afectación pulmonar, los patógenos más comunes son el complejo *M. avium* (MAC) y el complejo *M. abscessus*. (MAB). Suelen afectar a pacientes con patología pulmonar crónica, como bronquiectasias o EPOC. El diagnóstico es complejo ya que son especies ambientales, sin transmisión entre personas, y no es fácil diferenciar los estados de colonización y de infección.

Así mismo, el tratamiento presenta una serie de dificultades. Por una parte, debe decidirse cuando está indicado, ya que será de larga duración, con efectos tóxicos asociados a los fármacos y hay pocos criterios objetivos que permitan evaluar su eficacia. Se decide tratar cuando se observa progresión y empeoramiento clínico y lesiones radiológicas extensas o cavitadas. A diferencia de *M. tuberculosis*, no existe una pauta universal de elevada eficacia ni tampoco una duración predefinida. Las guías clínicas aconsejan el uso de combinaciones de 2 o 3 fármacos en los que

debe incluirse claritromicina o azitromicina si son sensibles en el antibiograma. Los fármacos más importantes son macrólidos, amikacina y rifamicinas en MAC y amikacina, tigeciclina y claritromina o imipenem en MAB.

Hay una pobre respuesta al tratamiento y las reinfecciones y las recaídas son frecuentes. A menudo los tratamientos son largos, de meses y pueden ser causa de efectos indeseables importantes. La patología subyacente, con bronquiectasias y otras disfunciones pulmonares, favorece la cronicidad de la infección. A ello contribuye en parte la capacidad de desarrollar un entorno de biofilm por parte de las micobacterias en el lugar de la colonización e infección. Esta capacidad les proporcionará protección frente a los antibióticos y la inmunidad local, dificultando el tratamiento.

Existen numerosas incógnitas no resueltas en el plano microbiológico: 1. Ausencia de indicadores claros de infección que permitan diferenciarla de la colonización. Los aislamientos en muestras clínicas suceden en ambas situaciones. Al igual que en otros patógenos potenciales, una carga bacteriana alta, que puede expresarse con el tiempo de crecimiento en los cultivos (TTD), está más relacionada con infección que con colonización. No obstante, sólo tiene un valor orientativo. 2. Escasa correlación in vivo/in vitro para la sensibilidad a los antibióticos. Posiblemente es la dificultad más importante. En diferentes estudios clínicos desarrollados en el pasado no se

ha observado una correlación clara entre la sensibilidad *in vitro* a través del antibiograma y la respuesta clínica. Se admite en general que la correspondencia únicamente es óptima para los macrólidos y en determinadas situaciones para rifamicinas y aminoglucósidos. 3. Resistencias de origen desconocido. Muchos de los antibióticos que se testan frente a las micobacterias no tuberculosas presentan porcentajes de resistencia elevados. Los mecanismos de resistencia no son debidos a mutaciones cromosómicas conocidas y no se conocen en general, exceptuando los macrólidos en los que están asociados a alteraciones en el gen *erm* y en algunos casos a los aminoglucósidos.

Una posible explicación de la falta de correlación entre la clínica y las pruebas de sensibilidad a los antibióticos es que, debido a la formación de biofilm y a la acción protectora del moco, la concentración de los fármacos a nivel de los tejidos debe ser muy superior a la que hay en suero.

El objetivo de la presentación es demostrar que actuaciones frente a biofilm desarrollado por micobacterias puede mejorar la respuesta *in vitro* a combinaciones de antibióticos.

Existe literatura que muestra la capacidad de las micobacterias de producir biofilm en condiciones *in vitro*. Se han usado diversas técnicas para analizar la producción de biofilm bacteriano. Las más conocidas son los métodos de cristal violeta y de Calgary, ambos basados en incubar las bacterias en presencia de materiales plásticos que estimulan la producción de biofilm y posteriormente demostrar su presencia mediante tinción o espectrofotometría. Se trata de métodos sencillos, basados en cultivo, que han alcanzado amplia difusión. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal también son útiles para evidenciar la viabilidad metabólica de las bacterias en el entorno de biofilm i el efecto de los antibióticos sobre ellas. Aunque la aplicación de estas técnicas en micobacterias es más limitada, existen diversos estudios que demuestran su utilidad. Son especialmente interesantes cuando reflejan la interacción con antibióticos y la evidencia de que las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) para las micobacterias que están en la matriz de biofilm pueden ser 2-3.000 veces superiores. En nuestro entorno es destacable la contribución de los trabajos del grupo de investigación de la Fundación Jiménez Díaz, sobre todo en micobacterias de crecimiento rápido.

### Desarrollo de biofilm en *Mycobacterium avium complex*

No existe una metodología uniforme para estudiar el desarrollo *in vitro* de biofilm en micobacterias. Nuestro grupo ha estudiado diversas condiciones, llegando a la conclusión que para las especies del complejo *M. avium*, las condiciones más

óptimas son cultivar las cepas en placas de poliestireno durante 4 semanas, a temperatura de 42°C para *M. avium* y a 37°C para *M. intracellulare*. El revelado posterior se efectuaría con el método de cristal violeta. Con este procedimiento, alrededor del 70-75% de las cepas se muestran capaces de producir biofilm de forma intensa o moderada.

Nuestro grupo ha desarrollado un modelo para estudiar la actividad de antibióticos, solos y en combinación, frente a cepas de *M. avium complex* que han desarrollado biofilm. El método se basa en desarrollar la formación de biofilm en placas de microdilución, adicionar antibióticos y después de una incubación adecuada, subcultivar de forma cuantitativa. De esta forma se puede establecer un índice equivalente a la concentración bactericida inhibitoria (MBC) que se ha denominado concentración mínima de erradicación de biofilm (MBEC) i concentración bactericida de biofilm (BBC).

### Potenciales agentes antibiofilm (PAA)

Existe una creciente literatura mostrando la potencialidad de utilizar compuestos, que genéricamente pueden denominarse agentes antibiofilm o potenciales agentes antibiofilm, que tendrían actividad frente a formas de biofilm, sobre todo en combinación con antibióticos. Se ha descrito para distintos tipos de bacterias, como *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, así como para *Candida* y otros hongos. Algunos de estos compuestos son fármacos, por ejemplo uno de los más descritos es el ácido acetil-salicílico y otros de uso analgésico-antiinflamatorio, como paracetamol o ibuprofeno; compuestos con actividad mucolítica, como N-acetil-L-cisteína o Tween 80; así como numerosos compuestos naturales y derivados de plantas, como son aceites esenciales del clavo, la canela, la castaña, el orégano, compuestos purificados del ajo u antioxidantes como el ácido gálico, contenido en numerosas plantas como el café, té, uva, arándanos, nueces, manzanas, etc. En micobacterias existen pocos estudios, centrados sobre todo en los mucolíticos N-acetil-L-cisteína o Tween 80, como los realizados por el grupo de la Fundación Jiménez Díaz.

### Aplicación del modelo de actividad de antibióticos y potenciales agentes antibiofilm frente a *Mycobacterium avium complex*

Hemos estudiado aplicado este modelo al estudio de la actividad de antibióticos solos, en combinación de dos y en combinación de tres frente a cepas de MAC. También lo hemos aplicado utilizando agentes antibiofilm, solos y en combinación con antibióticos.

Con combinaciones de dos antibióticos hemos estudiado los siguientes potenciales agentes antibiofilm (PAA): ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, N-acetil-L-cisteína, Tween 80, sulfuro de dialil. Observamos que los PAA no tienen actividad microbicida por sí solos, pero si potencian la actividad de las combinaciones. Así, por ejemplo, las combinaciones de Claritromicina-Amikacina o Amikacina-Moxifloxacino son sinérgicas frente a MAC cuando se añade a la combinación cualquiera de estos PAA.

Hemos estudiado esta actividad frente a 10 combinaciones distintas de tres fármacos que puedan aplicarse por vía oral, formadas a partir de los siguientes: claritromicina, etambutol, bedaquilina, rifabutina, rifampicina, moxifloxacino y clofazimina,

y combinándolos con ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, N-acetil-L-cisteína y sulfuro de dialil (derivado del ajo). Observamos que:

- La concentración necesaria de los fármacos individuales para ser activos frente a formas de biofilm aumenta de 4 a 7 veces la MIC frente a formas planctónicas, haciéndolos inviables.
- Que las combinaciones de tres fármacos mejoran 3-4 veces las concentraciones en comparación a los fármacos individuales, aunque siguen siendo concentraciones elevadas en relación a los niveles alcanzables con dosis habituales por vía oral o parenteral.
- Que las combinaciones unidas a PAA son sinérgicas y consiguen actividad a concentraciones cercanas a las consideradas sensibles en suero (Figura 1) (Tablas 1-3).

Figura 1. Diseño del prototipo utilizado.

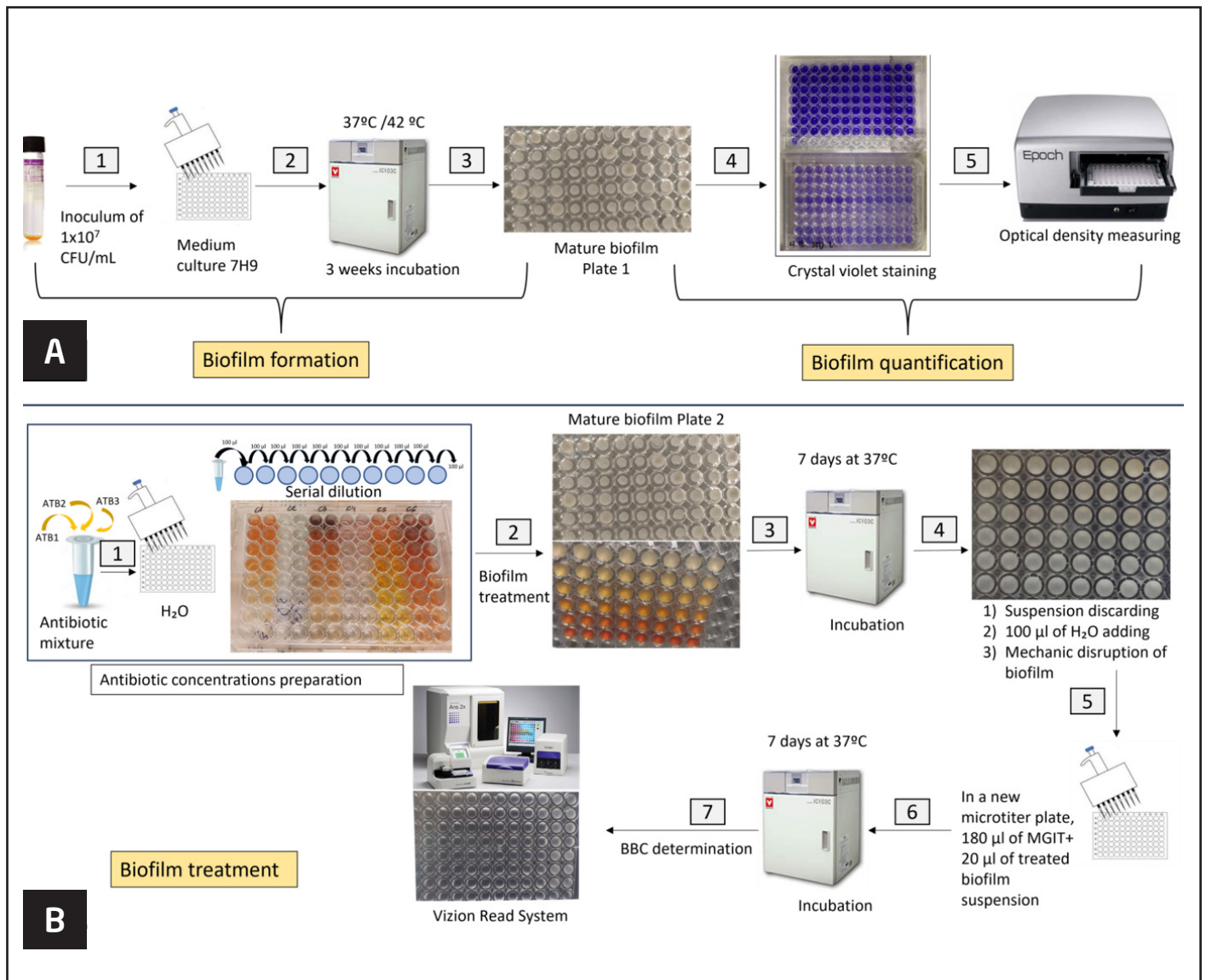


Tabla 1. Antibióticos frente a formas planctónicas y de biofilm.

Antibiotic	Planktonic form				Biofilm form	
	<i>M. avium</i>		<i>M. intracellulare</i>		<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
	MIC <sub>50</sub>	MBC <sub>50</sub>	MIC <sub>50</sub>	MBC <sub>50</sub>	BBC <sub>50</sub>	BBC <sub>50</sub>
CLA	4	16	2	32	256	256
MOX	4	32	2	4	512	512
BED	0,5	4	0,5	4	128	64
CLO	4	4	16	32	512	256
RB	0,25	4	0,25	0,5	32	512
RIF	0,25	4	0,5	1	256	512
EMB	8	8	2	32	2.048	2.048

MIC: minimum inhibitory concentration (µg/mL); MBC: minimum bactericidal concentration (µg/mL); BBC: bactericidal biofilm concentration (µg/mL); MAC: *Mycobacterium avium* complex; CLA: clarithromycin; MOX: moxifloxacin; BED: bedaquiline; CLO: clofazimine; RB: rifabutin; RIF: rifampicin; EMB: ethambutol.

Tabla 2. Rango de concentración bactericida de biofilm (BBC) de combinaciones de tres fármacos frente a formas de biofilm de mac.

Antibiotic combination	<i>M. avium</i>			<i>M. intracellulare</i>		
	BBC <sub>50</sub> (µg/mL)	FICI <sub>50</sub> range	% isolates showing synergistic activity <sup>1</sup>	BBC <sub>50</sub> (µg/mL)	FICI <sub>50</sub> range	% isolates showing synergistic activity <sup>1</sup>
CLA + BED + CLO	64	0,54 ≥ 4	25	64	0,31 - 1,75	50
CLA + BED + EMB	32	0,53 ≥ 4	25	64	0,22 - 1,38	50
CLA + CLO + EMB	256	0,52 ≥ 4	50	64	0,13 - 0,88	50
CLA + RB + EMB	16	1 ≥ 4	0	32	0,20 - 0,44	100
CLA + RF + EMB*	128	0,25 ≥ 4	25	64	0,20 - 0,53	100
MOX + BED + CLO	32	0,22 ≥ 4	25	64	0,31 - 1,63	75
MOX + BED + EMB	32	0,17 ≥ 4	50	64	0,22 - 3,23	50
MOX + CLO + EMB	128	0,43 ≥ 4	75	64	0,13 - 0,44	75
MOX + RB + EMB	64	1 ≥ 4	0	256	0,39 - 2,25	50
MOX + RF + EMB*	32	0,17 ≥ 4	25	64	0,25 - 3	75

BBC: bactericidal biofilm concentration (µg/mL); BF: biofilm form; FICI: fractional inhibitory concentration index; MAC: *mycobacterium avium* complex; <sup>1</sup>percentage of isolates showing synergistic activity with FIC values ≤0.75; CLA: clarithromycin; MOX: moxifloxacin; BED: bedaquiline; CLO: clofazimine; RB: rifabutin; RIF: rifampicin; EMB: ethambutol; \* recommended combinations.

## Discusión

El uso de sustancias con potencial actividad antibiofilm tiene una presencia creciente en la literatura científica. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual actúan, sobre todo potenciando la actividad de los antibióticos más que por una actividad antimicrobiana intrínseca. En mucolíticos o detergentes podrían tener un efecto disgregante, que actuase sobre la matriz del biofilm. En otros compuestos, por ejemplo ácido acetilsalicílico o el ácido gálico, se ha sugerido que interferirían la transmisión de señales entre bacterias a través del sistema *quorum sensing*,

inhibiendo la actividad de moléculas que participan en la formación o el mantenimiento de la matriz del biofilm. Aunque quedan aspectos de esta actividad por aclarar, los datos parecen sugerir que pueden tener un papel en el tratamiento de infecciones en las que la formación de biofilm es importante en su persistencia.

## Conclusiones

- La adición de potenciales agentes antibiofilm a combinaciones de antibióticos frente a *M. avium complex*, logra un efecto sinérgico de las combinaciones, alcanzando concentraciones

Tabla 3. Rango de BBC de combinaciones de tres antibióticos junto a potenciales agentes antibiofilm.

Antibiotic combination	<i>M. avium</i>							
	NAC		IBU		ASA		DDS	
	BBC <sub>50</sub>	FICI <sub>50</sub> Range	BBC <sub>50</sub>	FICI <sub>50</sub> Range	BBC <sub>50</sub>	FICI <sub>50</sub> Range	BBC <sub>50</sub>	FICI <sub>50</sub> Range
CLA + BED + CLO	2	0,007 - 0,16*	4	0,08 - 0,16*	2	0,08 - 0,13*	4	0,03 - 0,13*
CLA + BED + EMB	1	0,005 - 0,13*	1	0,005 - 0,07*	2	0,01 - 0,27*	1	0,005 - 0,27*
CLA + CLO + EMB	16	0,05 - 0,20*	32	0,08 - 0,20*	8	0,03 - 0,20*	8	0,05 - 0,41*
CLA + RB + EMB	4	0,03 - 0,26*	2	0,03 - 0,16*	2	0,03 - 0,13*	2	0,04 - 0,34*
CLA + RIF + EMB**	32	0,03 - 0,53*	8	0,03 - 0,22*	8	0,07 - 0,22*	8	0,03 - 0,17*
MOX + BED + CLO	4	0,08 - 0,14*	2	0,034 - 0,11*	4	0,034 - 0,11*	4	0,034 - 0,08*
MOX + BED + EMB	4	0,04 - 0,34*	4	0,04 - 0,69*	4	0,04 - 0,06*	4	0,04 - 0,34*
MOX + CLO + EMB	16	0,05 - 0,11*	8	0,03 - 0,14*	8	0,03 - 0,14*	8	0,03 - 0,22*
MOX + RB + EMB	1	0,08 - 0,55*	2	0,06 - 0,14*	2	0,07 - 0,55*	4	0,04 - 0,55*
MOX + RIF + EMB**	16	0,08 - 0,22*	8	0,04 - 0,44*	8	0,03 - 0,44*	8	0,03 - 0,44*

BBC: bactericidal biofilm concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); FICI: fractional inhibitory concentration index; PAA: potential antibiofilm agent; BF: biofilm form; NAC: N-acetyl L-cysteine; IBU: ibuprofen; ASA: acetyl salicylic acid; DDS diallyl disulfide; CLA: clarithromycin; MOX: moxifloxacin; BED: bedaquiline; CLO: clofazimine; RB: ribabutin; RIF: rifampicin; EMB: ethambutol; \*synergistic activity; \*\*recommended combinations.

de antibióticos que pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones pulmonares.

- Dado que los potenciales agentes antibiofilm son fármacos ya existentes, o productos derivados de plantas que tienen diversos usos en humanos, sería factible diseñar estudios que permitiesen corroborar o no su eficacia en el tratamiento de los pacientes con infecciones pulmonares por *M. avium* complex.

## Bibliografía recomendada

- Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ Jr, Andrejak C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Eur Respir J*. 2020 Jul 7;56(1):2000535. doi: 10.1183/13993003.00535-2020. PMID:32636299; PMCID: PMC8375621.
- Muñoz-Egea MC, Akir A, Esteban J. Mycobacterium biofilms. *Biofilm*. 2023 Feb 7;5:100107. doi: 10.1016/j.biofilm.2023.100107. PMID: 36798742; PMCID: PMC9925856.
- Portell-Buj E, González-Criollo C, López-Gavín A, Fernández-Pittol M, Busquets MA, Estelrich J, et al. Activity of Antibiotics and Potential Antibiofilm Agents against Biofilm-Producing Mycobacterium avium-intracellulare Complex Causing Chronic Pulmonary Infections. *Antibiotics* (Basel). 2022 Apr 27;11(5):589. doi: 10.3390/antibiotics11050589. PMID: 35625233; PMCID: PMC9137467.
- Batista S, Fernández-Pittol M, Nicolás LS, Martínez D, Rubio M, Garrigo M, et al. In Vitro Effect of Three-Antibiotic Combinations plus Potential Antibiofilm Agents against Biofilm-Producing Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare Clinical Isolates. *Antibiotics* (Basel). 2023 Sep 6;12(9):1409. doi: 10.3390/antibiotics12091409. PMID: 37760706; PMCID: PMC10526108
- Chakraborty P, Bajeli S, Kaushal D, Radotra BD, Kumar A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun*. 2021 Mar 11;12(1):1606. doi: 10.1038/s41467-021-21748-6. PMID: 33707445; PMCID: PMC7952908.



# Evaluación del Xpert MTB/Rif ultra en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar

**M. Teresa Tórtola**

Servicio de Microbiología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.

Correspondencia:

M. Teresa Tórtola

E-mail: mariateresa.tortola@vallhebron.cat

## Introducción

La tuberculosis extrapulmonar (TBEP) está producida por *Mycobacterium tuberculosis*. Una vez el bacilo de Koch infecta a los pulmones se disemina por vía hematogena en la infección tuberculosa primaria y posteriormente se puede desarrollar la enfermedad en cualquier localización anatómica. La TBEP supone entre el 10-25% de los casos de tuberculosis, siendo mayor esta proporción en niños y en pacientes inmunodeprimidos como los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>1,2</sup>.

El diagnóstico de la TBEP es difícil debido tanto a la toma de la muestra, según la localización de la enfermedad, como a que estas muestras tienen una carga bacilar muy baja. El *gold standard* para el diagnóstico de la tuberculosis (TB) es el cultivo, pero en los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares para mejorar el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa.

El Xpert MTB/RIF (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA) (Xpert) es un cartucho que detecta simultáneamente *M. tuberculosis* y la resistencia a rifampicina mediante una PCR a tiempo real generando un resultado semicuantitativo en 90 minutos. Este sistema fue recomendado por la OMS en el año 2011 para el diagnóstico de la TB pulmonar con sospecha de multiresistencia TBMDR y en pacientes con TB pulmonar infectados con VIH<sup>3</sup>. En el año 2013 la OMS recomendó el Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de la TBEP<sup>4</sup>. Por último, en el año 2017 la OMS recomendó la utilización del Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra), este sistema nuevo sigue utilizando una PCR a tiempo real para la detección del bacilo de la TB pero incorpora nuevas dianas, la IS1081 y la IS6110, lo que permite un límite de detección de bacilo de la TB de 15.6 CFU<sup>5</sup>. Con estas innovaciones se mejora la sensibilidad, especialmente en casos de TB con baciloscopias negativas, y el tiempo de respuesta es inferior a 80 minutos.

En nuestro laboratorio el Xpert se utilizó desde el año 2009 hasta el año 2019, a partir del año 2019 se utiliza el Ultra como técnica molecular para el diagnóstico de la TB.

El objetivo de este estudio es evaluar el Xpert MTB/RIF Ultra para el diagnóstico de la TBEP y su comparación con el Xpert MTB/RIF en las muestras extrapulmonares.

## Material y métodos

### Muestras

Desde 2014 hasta 2019, se han estudiado un total de 2186 muestras extrapulmonares obtenidas de 1924 pacientes, 231 pacientes pediátricos y 1693 pacientes adultos.

### Promiemento de las muestras

Las muestras clínicas se descontaminaron con N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sodio (NALC-NaOH) hasta una concentración final del 1%. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 3.000 g y el sedimento se resuspendió en 1,0 ml de tampón fosfato (pH 6,8). Del cono de descontaminación se realizó: 1) examen microscópico (tinción de auramina y Ziehl-Neelsen); 2) cultivo en medio sólido (Löwenstein-Jensen) y medio líquido, BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Maryland, EE. UU.) y 3) Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/RIF Ultra.

La identificación de las especies aisladas se realizó con el método GenoType MTBDR y CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El antibiograma para *M. tuberculosis* se realizó con el sistema BACTEC MGIT 960 utilizando el kit BD BACTEC MGIT 960 SIRE siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fármacos se trabajaron a una concentración final de: 1.0 µg/ml estreptomina, 0.1 µg/ml isoniazida, 1.0 µg/ml rifampicina, y 5.0 µg/ml etambutol.

### Ensayo Xpert MTB/RIF

El ensayo Xpert MTB/RIF se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE. UU.). El volumen utilizado del cono de descontaminación fue de 500 ml para Xpert

MTB/RIF y del 1 ml para Xpert MTB/RIF Ultra. Todas las muestras se inocularon en el reactivo de muestra (SR) del ensayo Xpert MTB/RIF en una proporción de 1:2. La mezcla se agitó dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos. En total, se transfirieron 2 ml de la mezcla al cartucho y luego se introdujeron en el instrumento GeneXpert. Los resultados del ensayo Xpert MTB/RIF se informaron automáticamente.

### **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* SPSS (versión 19.0). El porcentaje de positividad de la microscopía, cultivo y ensayo Xpert MTB/RIF se compararon mediante la prueba de  $\chi^2$ . Un valor de *p* inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Los valores de sensibilidad y especificidad se calcularon en el intervalo de confianza (IC) del 95%. También se estudió la concordancia entre las diferentes técnicas con el índice de kappa. Se utilizó el cultivo y las pruebas de sensibilidad a los fármacos como estándar de referencia.

## **Resultados**

### **Población y muestras de estudio**

La media de edad de los 1924 pacientes estudiados fue de 52 años, su distribución por sexo femenino y masculino fue el 39,2% y 60,7% respectivamente. La mediana de edad de los 231 pacientes pediátricos fue de 9 años, un 43,2% eran del sexo femenino y un 56,7% del sexo masculino. En cuanto a la población adulta, la media de edad de los 1693 pacientes fue de 58 años siendo el 38,7% del sexo femenino y el 61,2% del sexo masculino.

De las 2186 muestras extrapulmonares estudiadas las cinco localizaciones con el mayor número de muestras procesadas fueron: 775 biopsias ganglionares, 392 líquidos pleurales, 335 líquidos cefalorraquídeos, 113 líquidos pericárdicos y 101 biopsias cutáneas.

De las 2186 muestras con sospecha de TBEP, 1 muestra presentó contaminación y 1 detección Xpert MTB/RIF falló.

### **Comparación del ensayo Xpert y Ultra con el cultivo**

El porcentaje de positividad del ensayo Xpert MTB/RIF y del cultivo fue del 5,5% (121/2186), y 5,3% (116/2186), respectivamente. El porcentaje de positividad de la microscopía fue del 1,1% (25/2186). La comparación del ensayo Xpert y el Ultra con el cultivo mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$  en ambos ensayos).

La sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) del ensayo Xpert fue del 67,8% (57/84), 97,9% (1125/1148), 71,25% (57/80), 97,6% (1125/1152), y del ensayo Ultra fue de 81,25% (26/32), 98,37% (906/621), 63,4% (26/41), 99,2% (906/913) respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el Xpert y el Ultra ( $\chi^2=2,042$   $p=0,153$ ).

El índice Kappa del ensayo Xpert y el Ultra con el cultivo fue de 0,673 y 0,691, lo que indica una buena concordancia entre las técnicas moleculares y el cultivo.

### **Resistencia a la rifampicina**

Todas las cepas aisladas de *M.tuberculosis* fueron sensibles a la rifampicina, tanto en el cultivo (116) como las detectadas con el ensayo Xpert y el Ultra (121). La concordancia fue del 100%.

## **Conclusiones**

Con la prueba de Xpert MTB/RIF Ultra se obtienen mejores resultados de sensibilidad y especificidad que Xpert MTB/RIF para la detección de *M.tuberculosis* en muestras extrapulmonares cuando se compara con el cultivo, con la ventaja de que permite la detección de la resistencia a rifampicina en un tiempo muy corto. Debido a que son muestras paucibacilares además de las técnicas moleculares se debe realizar el cultivo de dichas muestras.

## **Bibliografía**

1. Jones BE, Young SM, Antoniskis D, et al. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:1292–7.
2. Nelson LJ, Wells CD. Global epidemiology of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:636–47.
3. World Health Organization (2011). Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system: policy statement. World Health Organization.
4. World Health Organization (2013). Xpert MTB/RIF System for the Diagnosis of Pulmonary and Extra-Pulmonary TB in Adults and Children. Policy Update. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
5. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, et al. The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio*. 2017;8:e00812-17.

# Aplicaciones de la secuenciación del genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis* para la predicción de resistencias a antibióticos en muestras de Mozambique

Carla Mariner-Llicer<sup>1</sup>, Belén Saavedra Cervera<sup>2,3</sup>, Edson Mambuque<sup>3</sup>, Neide Gomes<sup>3</sup>, Shilizia Munguambe<sup>3</sup>, Luis Villamayor<sup>4</sup>, Irving Cancino-Muñoz<sup>4,5</sup>, Manuela Torres-Puente<sup>1</sup>, Dinis Nguenha<sup>3,6</sup>, Durval Respeito<sup>3</sup>, Gustavo Tembe<sup>3</sup>, Mariana G. López<sup>1</sup>, Iñaki Comas<sup>1,7</sup>, Alberto L. García-Basteiro<sup>2,3,8</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia CSIC, Valencia, Spain. <sup>2</sup>ISGlobal, Hospital Clínic – Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM), Maputo, Mozambique. <sup>4</sup>FISABIO Public Health, Valencia, Spain. <sup>5</sup>I2SysBio, Universitat de València CSIC, Valencia, Spain. <sup>6</sup>Amsterdam Institute for Global Health & Development (AIGHD), Amsterdam, The Netherlands. <sup>7</sup>CIBER in Epidemiology and Public Health, Madrid, Spain. <sup>8</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Barcelona, Spain.

## Correspondencia:

Carla Mariner

E-mail: cmariner@ibv.csic.es

## Introducción

La tuberculosis (TB) sigue siendo un problema para la salud global debido al aumento de la incidencia de casos con resistencias a antibióticos. Tener técnicas de diagnóstico rápidas podría ser una buena estrategia para mejorar el control de casos resistentes. La técnica de referencia para la detección de casos resistentes es el test fenotípico de sensibilidad a antibióticos (DST). Esta prueba tiene como limitación el tiempo. El lento crecimiento de las micobacterias puede retrasar el diagnóstico hasta un mes, tiempo durante el que el paciente puede que no esté recibiendo el tratamiento más óptimo. En algunos países de alta carga de la enfermedad ya se están utilizando de forma rutinaria tests moleculares como el GeneXpert Ultra, que aparte de ser muy sensible para detectar *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), también detecta mutaciones conocidas que confieren resistencia a rifampicina (RIF). Estas pruebas diagnósticas se realizan a partir de muestras de esputo y son muy rápidas, pero evalúan un reducido espectro de mutaciones de resistencia, por lo que cepas resistentes con mutaciones poco comunes pueden escapar a ellos. Una buena alternativa es la secuenciación genómica (WGS) de MTB que no solo se está utilizando en investigación, sino que ya está siendo aplicada en sistemas de vigilancia de la enfermedad en países como Holanda o Reino Unido<sup>1</sup>. Esta herramienta permite establecer links epidemiológicos para estudiar la transmisión de la enfermedad y detectar mutaciones de resistencia conocidas o potenciales candidatas, información que podría ser utilizada para dar un tratamiento personalizado a los pacientes. Actualmente, incluye un paso de cultivo para obtener suficiente biomasa para la secuenciación, pero se desconoce si

supone un cuello de botella para la diversidad poblacional de la muestra diagnóstica y cómo puede afectar a la predicción de resistencias o a la inferencia epidemiológica. Por ello, en la última década ha habido un interés común en desarrollar técnicas de secuenciación directa a partir de muestras complejas como los esputos. La mayoría se han centrado en el diagnóstico y detección de mutaciones de resistencia, pocos han obtenido suficiente calidad como para evaluar la diversidad genética entre la muestra diagnóstica y su cultivo sacando conclusiones contradictorias por la falta de estandarización de protocolos<sup>2,3</sup>.

## Estudio 1: secuenciación de muestras diagnósticas y sus cultivos para comparar la diversidad genómica y ver cómo afecta a la predicción de resistencias

Uno de los objetivos era evaluar si el cultivo representa un cuello de botella en la diversidad genética que suponga un sesgo a la hora de obtener los resultados de la secuenciación por el hecho de que se pierdan aquellas poblaciones bacterianas que están menos adaptadas a crecer in vitro. Para ello se compararon 61 pares de esputos y cultivos. Para obtener suficiente ADN de MTB para secuenciar, se llevaron a cabo técnicas de enriquecimiento de los esputos. Se utilizó un protocolo de extracción de ADN basado en una lisis diferencial, para eliminar ADN contaminante. Se evaluó la cantidad de ADN de MTB con una qPCR (marcador específico Rv2341) y en aquellos esputos que presentaban menos de 200 copias genómicas se realizó un paso de captura de ADN de MTBC con sondas de ARN previo a la secuenciación. En total se capturaron 16 y se secuenciaron



45 esputos directos. En el análisis de todas las muestras, se clasificaron taxonómicamente las lecturas para descartar aquellas procedentes de humano y otros microorganismos. Las lecturas de MTB se mapearon contra el genoma de referencia y se realizó el llamado de variantes. Se evaluaron las fuentes de introducción de falsa variabilidad, descartando las variantes procedentes de errores de mapeado, genes conservados y familias génicas repetitivas. Tras comparar las variantes de alta confianza entre las muestras emparejadas se obtuvo una alta concordancia: 64% de las parejas no presentaban diferencias, el 28% presentaba de 1 a 5 mutaciones discrepantes en esputo y solo el 8% presentaba más de 5 mutaciones discrepantes. En cualquier caso, no se obtuvo ninguna mutación fijada discrepante. La concordancia fue del 100% en la predicción de resistencias y de linaje. Estos resultados sugieren que el cultivo representa la diversidad poblacional presente en el esputo, por tanto, para investigación, se puede secuenciar el cultivo, cuando el tiempo no sea un factor limitante, o el esputo para recuperar aquellas cepas que no crezcan in vitro. En el caso del diagnóstico, actualmente, la WGS de MTB directa de esputo requiere optimización a nivel computacional y económico para usarse en vigilancia.

## Estudio 2: aplicación de la secuenciación de muestras del sur de Mozambique para detectar mutaciones asociadas a resistencia que escapan al GeneXpert Ultra

El segundo objetivo era aplicar la WGS para evaluar las mutaciones asociadas a resistencia a antibióticos de las cepas de MTB que circulan por el sur de Mozambique. En el sur de África la monitorización de resistencia a RIF supone un desafío debido a la propagación de un clon de TB multirresistente (MDR) con una mutación de resistencia a RIF de bajo nivel, *rpoB*\_I4941F, que tampoco es detectada por el DST fenotípico ya que dificulta el crecimiento de la bacteria. Esta cepa generó un brote en Eswatini en el 2009 y luego en 2013 pasó a Sudáfrica<sup>4</sup>. En Mozambique, la última encuesta de vigilancia de resistencia a antibióticos se publicó en 2014 y las cifras estables, respecto a las encuestas anteriores, indican que se podría estar infraestimando la prevalencia de casos MDR (3.8% casos nuevos, 13% casos retratados). Para evaluar si esto se debe a la presencia de mutaciones de

resistencia que escapan a los tests diagnósticos, se analizaron dos conjuntos de secuencias de muestras de pacientes con TB procedentes de dos estudios realizados en la provincia de Manhiça, al sur de Mozambique. El primero era del 2013-2014 y presentaba 275 muestras<sup>5</sup>; y el segundo del 2018 contenía 337 muestras (no publicado). Se encontraron mutaciones RIF-R no incluidas en el Gene Xpert Ultra en tres cepas, la *rpoB*\_I491F en un caso de 2014, no relacionado con el brote de Eswatini; y la *rpoB*\_V170F en dos cepas del 2018. A pesar de no encontrar evidencia de propagación de la cepa MDR de Eswatini, sí que encontró transmisión transfronteriza después de analizar 10.000 secuencias procedentes de 30 países africanos. Además, se detectó un aumento de casos nuevos resistentes a isoniacida no MDR (7.6%) suponiendo un nuevo reto para el control de la TB. Estos resultados sugieren que aunque solo se hayan detectado mutaciones poco comunes en tres cepas de la región de Manhiça, como escapan de las técnicas diagnósticas actuales y hay una alta transmisión entre provincias, se podrían provocar brotes. Por tanto, el diseño de nuevos test moleculares o la combinación de estos con la secuenciación genómica podría ser la clave para detectar a tiempo cepas resistentes y dar a los pacientes tratamientos efectivos desde el primer momento para frenar la transmisión.

## Bibliografía

1. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, *et al.* Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:533-45.
2. Votintseva AA, Bradley P, Pankhurst L, Del Ojo Elias C, Loose M, Nilgiriwala K, *et al.* Same-Day Diagnostic and Surveillance Data for Tuberculosis via Whole-Genome Sequencing of Direct Respiratory Samples. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1285-98.
3. Shockey AC, Dabney J, Pepperell CS. Effects of Host, Sample, and in vitro Culture on Genomic Diversity of Pathogenic *Mycobacteria*. *Front Genet.* 2019;10:477.
4. Beckert P, Sanchez-Padilla E, Merker M, Dreyer V, Kohl TA, Utpatel C, *et al.* MDR M. tuberculosis outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era. *Genome Med.* 2020;12:104.
5. Saavedra Cervera B, López MG, Chiner-Oms Á, García AM, Cancino-Muñoz I, Torres-Puente M, *et al.* Fine-grain population structure and transmission patterns of *Mycobacterium tuberculosis* in southern Mozambique, a high TB/HIV burden area. *Microb Genom.* 2022;8. doi:10.1099/mgen.0.000844

## Microbiological aspects and biomarkers for TB cure

Juan Espinosa

Unidad de Salud Internacional y Medicina Tropical del Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Barcelona.

Correspondence:

Juan Espinosa

E-mail: [juan.espinosa.pereiro@vhir.org](mailto:juan.espinosa.pereiro@vhir.org)

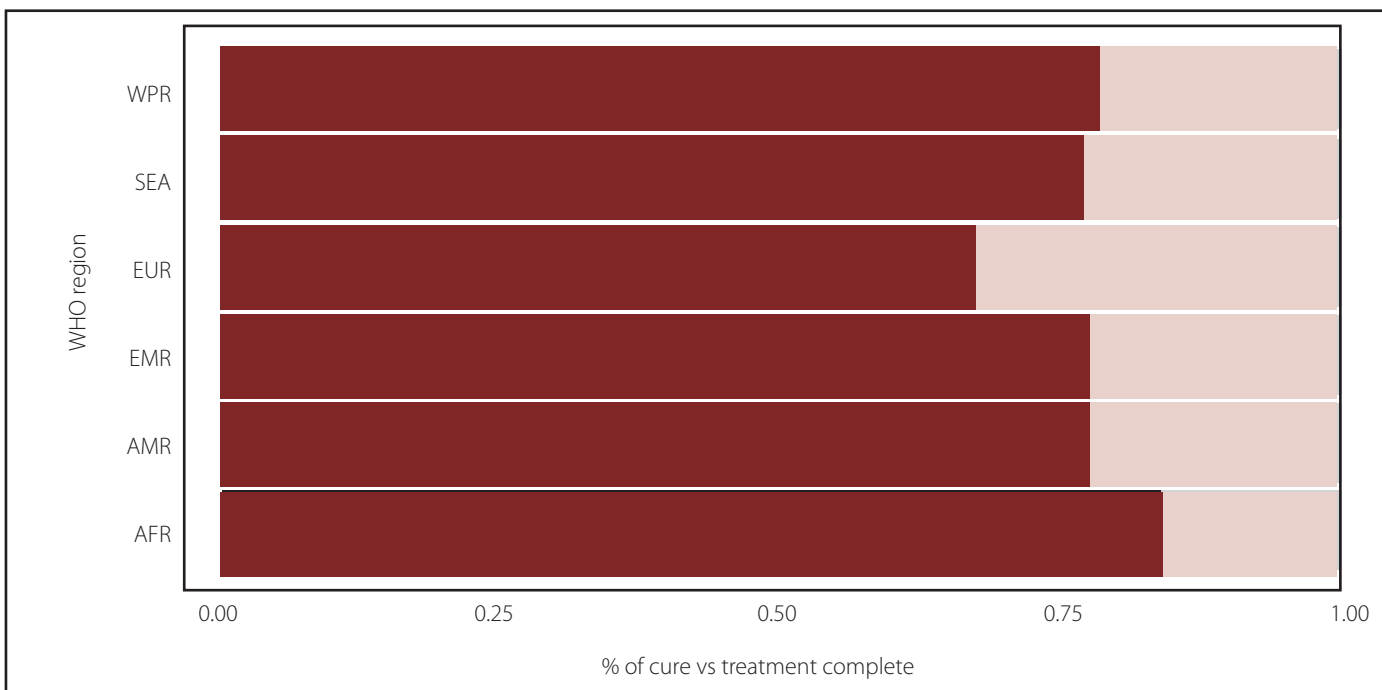
Obtaining an objective confirmation of cure is one of the challenges to reach the objectives of the EndTB strategy. This is critical to confirm that *M tuberculosis* infecting a given person was successfully removed by the treatment, and that the transmission to others is no longer possible. This is also essential as an objective measure to evaluate the efficacy of new treatments in clinical trials.

From a methodological point of view, demonstrating the correlation between a given biomarker (microbiological tests, a blood parameter, a clinical score) and a clinical outcome is more complex than demonstrating a statistical association at a given point in time, or a significant change over time. For example, in a study with 520 TB-VIH coinfecting participants, the ACS COR transcriptomic signature showed significant changes over the first months of treatment but was a suboptimal predictor of

relapse (AUC ROC 0.72, 95CI 0.58-0.85)<sup>1</sup>. At the trial level, what biomarkers are trying to capture is not the individual risk of an outcome, but the effect of two different interventions in that outcome. According to Prentice's criteria, this means that the effect of the treatment on the surrogate explains completely the effect observed in the true endpoint. Large datasets from randomized participants are needed to evaluate this effect<sup>2</sup>.

Current cure criteria from the World Health Organisation are still based on sputum culture or smear. However, using WHO's public dataset, we can easily calculate among pulmonary TB new cases with positive smear sputum at diagnosis who are considered as 'treatment success', 20% did not have a microbiological confirmation of cure (Figure 1). Relapse-free cure is the most common endpoint for phase 3 regulatory trials in TB. Hence, TB forms where microbiological samples are difficult to obtain at

**Figure 1. 2011 WHO global report. Microbiological cure vs treatment complete in smear positive new cases.**



diagnosis or follow-up have been systematically excluded from clinical trials (i.e., paediatric, extrapulmonary TB). Mid-treatment sputum status, either smear or culture conversion, or time to negative culture, is used as endpoint in earlier phase (2a-2b) trials. However, its capacity to predict treatment outcomes is limited both at the individual and at the treatment level. For example, in one study in Angola, the positive predictive value of a positive sputum smear after two months of treatment was only 31% to predict treatment failure for a given patient<sup>3</sup>. At the trial level, in a meta-analysis of the results of trials conducted by the British Medical Council during the 170's and 1980's, the correlation between the treatment effect on the month 2 culture status and the effect of the same treatment in the relapse rate was poor, with proportion of variation explained ( $R^2$ trial) of only 0.36, with wide geographical variations<sup>4</sup>.

Thousands of other biomarkers are being explored for monitoring treatment in tuberculosis, but they face similar limitations as compared to sputum microbiological tests, or they are still technically complex. For example, the C-reactive protein, a common marker of systemic inflammation, showed significant changes during the first 8 weeks of treatment in a recent meta-analysis, and has been endorsed by the WHO as a useful tool for treatment monitoring<sup>5</sup>. Other biomarkers that may be good predictors of clinical outcomes include: CT chest scan at week 8 or 24 to predict treatment failure, or

Xpert Ct in sputum to predict culture status at a given point in TB treatment.

The ever evolving field of TB biomarkers is now undergoing a revolution. With the efforts being made to standardise data across clinical trials, with nested biomarker clinical studies, will provide large datasets to validate this robust streamline of biomarkers. However, further efforts of the TB community are needed to point the most relevant markers for the people affected by TB, and to move from mere descriptions of statistical associations to true predictive and surrogate validation studies.

## Bibliography

1. Darboe F, Mbandi SK, Naidoo K, Yende-Zuma N, Lewis L, Thompson EG, et al. Detection of Tuberculosis Recurrence, Diagnosis and Treatment Response by a Blood Transcriptomic Risk Signature in HIV-Infected Persons on Antiretroviral Therapy. *Front Microbiol.* 2019;10:1441.
2. Buyse M, Molenberghs G. Criteria for the validation of surrogate endpoints in randomized experiments. *Biometrics.* 1998 Sep;54(3):1014–29.
3. López T, Moreno M, Salvador F, Zacarías A, Carvalho R de, Tomás E, et al. Tuberculosis diagnosed in a rural setting in Angola. Accuracy of follow-up sputum smears to predict outcome. *Pathog Glob Health.* 2013 Jan;107(1):5–10.
4. Phillips PPJ, Fielding K, Nunn AJ. An evaluation of culture results during treatment for tuberculosis as surrogate endpoints for treatment failure and relapse. *PLoS One.* 2013;8(5):e63840.
5. Zimmer AJ, Lainati F, Aguilera Vasquez N, Chedid C, McGrath S, Benedetti A, et al. Biomarkers That Correlate with Active Pulmonary Tuberculosis Treatment Response: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2022 Feb 16;60(2):e0185921.