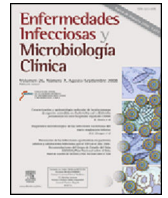




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Formación médica continuada: Métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica

Diagnóstico rápido de la tuberculosis. Detección de mecanismos de resistencia



Jesús Viñuelas-Bayón^a, María Asunción Vitoria^b y Sofía Samper^{c,*}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Lozano Blesa, CIBERES, Zaragoza, España

^c Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, IIS Aragón, CIBERES, Zaragoza, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de enero de 2017

Aceptado el 31 de enero de 2017

On-line el 15 de marzo de 2017

Palabras clave:

Multiresistencia

Resistencia extensa o extrema

Mycobacterium tuberculosis complex

R E S U M E N

La tuberculosis continúa siendo hoy en día un grave problema de salud pública con 10,8 millones de casos nuevos y 1,8 millones de muertes a nivel mundial en el año 2015. La diversidad existente entre los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que producen la tuberculosis permiten el diseño de métodos para su rápido diagnóstico. Así mismo, las mutaciones en los genes implicados en los mecanismos de resistencia permiten escapar a la bacteria del tratamiento. Hemos revisado los métodos de diagnóstico rápido de *M. tuberculosis* complex y de la detección de la sensibilidad/resistencia a los fármacos; ambas cosas son necesarias para detener la aparición de nuevas resistencias e instaurar un tratamiento precoz y correcto.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Rapid diagnosis of tuberculosis. Detection of drug resistance mechanisms

A B S T R A C T

Tuberculosis is still a serious public health problem, with 10.8 million new cases and 1.8 million deaths worldwide in 2015. The diversity among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, the causal agent of tuberculosis, is conducive to the design of different methods for rapid diagnosis. Mutations in the genes involved in resistance mechanisms enable the bacteria to elude the treatment. We have reviewed the methods for the rapid diagnosis of *M. tuberculosis* complex and the detection of susceptibility to drugs, both of which are necessary to prevent the onset of new resistance and to establish early, appropriate treatment.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Los primeros indicios de la enfermedad tuberculosa se han hallado en momias de 5.000 años antes de la era actual y pese a que han transcurrido 135 años desde que Robert Koch descubriera el bacilo productor de la «tisis blanca», la tuberculosis (TB) continúa siendo hoy en día un grave problema de salud pública a nivel mundial. Según los últimos datos comunicados por la OMS, en el año

2015 se produjeron 10,8 millones de casos nuevos y 1,8 millones de muertes a nivel mundial debidas a esta enfermedad de transmisión respiratoria¹. En ese mismo año en España se comunicaron 4.191 casos nuevos (12/100.000 habitantes).

Desde el descubrimiento de los primeros fármacos, la estreptomina (SM) en 1943, la isoniazida (INH) en 1952, y la rifampicina (Rif) en 1959, comenzaron a surgir cepas resistentes, lo que hizo necesario tratar la enfermedad con una combinación de fármacos. El tratamiento insuficiente o interrumpido genera la aparición de cepas resistentes a algún fármaco o a varios, apareciendo las cepas multiresistentes (MDR), definidas como resistentes al menos a la INH y a la Rif. Cuando las resistencias no se identifican antes del

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ssamper.iacs@aragon.es (S. Samper).

inicio del tratamiento, la situación se vuelve particularmente peligrosa, ya que los pacientes infectados con cepas monorresistentes tienen un alto riesgo de desarrollar resistencias adicionales a otros fármacos si reciben la terapia estándar. Una mala administración de los fármacos de segunda línea, menos eficaces y con efectos secundarios más graves, puede conducir a la aparición de cepas extensamente resistentes (XDR), que son cepas MDR con mecanismos de resistencia adicionales frente al menos a uno de los 3 fármacos inyectables: kanamicina (KM), ampicacina (AK) y capreomicina (CPM), y a cualquier fluoroquinolona empleada frente a *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)¹. Los casos de TB-XDR en la práctica son casi imposibles de tratar. Se han notificado casos con cepas XDR que son incluso resistentes a delamanid y bedaquilina, fármacos antituberculosos introducidos recientemente para tratar TB-XDR². Es por tanto crucial el diagnóstico temprano de la TB, la obtención de resultados de sensibilidad rápidos, y una correcta prescripción de los fármacos, para un tratamiento y control adecuados de la enfermedad.

El género *Mycobacterium* es el único de la familia Mycobacteriaceae, del orden de los actinomicetales, caracterizados por tener un elevado contenido en guanina y citosina (G + C). Apareció como lo conocemos hoy en día hace unos 15.000 años. Existen más de 170 especies descritas, la mayoría de ellas pertenecen al grupo de micobacterias no tuberculosas (MNT) y solo unas pocas, que comparten un 99,9% de homología en sus genomas, pertenecen al complejo *M. tuberculosis* (MTBc), todas ellas productoras de TB, en el hombre o en diferentes especies animales. El MTBc incluye distintos linajes que han evolucionado genotípicamente y fenotípicamente tras su expansión clonal desde un progenitor común adaptándose a distintos huéspedes.

En el momento de tener una sospecha clínica de TB, el primer paso es confirmar el diagnóstico microbiológicamente. La baciloscopia o visualización de los microorganismos a partir de una extensión del producto patológico teñido con tinción de Ziehl-Neelsen continúa siendo el método más rápido, barato y accesible para diagnosticar los casos bacilíferos, si bien su sensibilidad comparada con el cultivo oscila entre el 25 y el 90%, dependiendo de la muestra que estemos estudiando y de la carga bacteriana de dicha muestra, así como de la calidad del observador. El cultivo en medio sólido, Lowenstein-Jensen y Coletos, tiene el inconveniente de que MTBc tarda más de 15 días en crecer. El primer avance en cuanto al diagnóstico rápido se debe a S. Siddiqi, quien diseñó a finales de los 70 el sistema radiométrico Bactec 460TB, con el que se acortaba el tiempo hasta la obtención del cultivo positivo y se aumentaba la sensibilidad³. Además aportó la ventaja adicional de que se podía realizar el antibiograma disminuyendo considerablemente el tiempo para la obtención del resultado en comparación con el método de las proporciones de Canetti⁴. La identificación por métodos fenotípicos: temperatura óptima de crecimiento, pigmentación de las colonias y características bioquímicas, es lenta y a veces compleja, sobre todo en muchas de las especies de MNT. En la década de los 90 aparecieron las primeras técnicas de identificación genética, logrando nuevamente una mayor rapidez y precisión en el diagnóstico micobacteriológico⁵. La necesidad de disponer en el momento actual de un diagnóstico rápido es quizá el aspecto más importante para el control de la enfermedad tuberculosa. Ello ha impulsado en las últimas décadas la investigación y el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos basados en la biología molecular. De manera ideal deberíamos tener una técnica sensible, rápida, razonablemente económica y que no necesitase medios técnicos complejos ya que la mayoría de casos se dan en países poco desarrollados y con recursos económicos limitados.

Con este trabajo no se pretende realizar una descripción exhaustiva de toda la metodología disponible o en desarrollo en el momento actual, para lo cual remitimos al lector interesado a la literatura más especializada^{6,7}, sino revisar las distintas

aproximaciones existentes al diagnóstico rápido y microbiológico de la enfermedad tuberculosa.

Diferencias geonómicas de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Se han detectado polimorfismos en sus genomas debidos a pérdidas de secuencias largas de nucleótidos (LSP), mutaciones afectando a un nucleótido (SNP) o variaciones de los elementos repetitivos en su genoma. Las deleciones específicas en el genoma de los diferentes miembros del complejo se han llamado regiones diferenciales (RDs)⁸ y pueden utilizarse para identificarlos y clasificarlos en 8 linajes diferentes (fig. 1). MTB incluye los linajes 1 a 4 y se ha adaptado de forma selectiva al ser humano. A pesar de infectar a una tercera parte de la población mundial, no ha pasado a establecerse en el mundo animal¹². La presencia o ausencia de la región llamada TbD1 diferencia entre MTB ancestral (L1) y moderna⁸. Otras diferencias de SNP permiten clasificar a los aislados en sublinajes dentro de las cepas de MTB modernas: el L2 que incluye a la familia Beijing, L3 que incluye la familia CAS y L4 que incluye la familia Latinoamericana, la más presente en Europa. Para diferenciar los distintos linajes y sublinajes o familias se han propuesto diferentes técnicas mediante multiplex PCR, pirosecuenciación, SNAPshot y secuenciación de grupos de genes¹³⁻¹⁵. La pérdida de una región llamada RD9 separaría MTB de *Mycobacterium africanum*, asociados también al huésped humano (L5 y L6), y del resto de linajes del complejo asociados con huésped animal, linaje 8¹⁶. Un grupo de cepas que circula entre humanos con aparentemente menor virulencia es el relacionado con el linaje 6, o también llamado *M. africanum* West African 2 (MAF2). Estas cepas han perdido las regiones RD7, RD8, RD9 y RD10, como ocurre en las cepas asociadas a animales, que incluyen *Mycobacterium bovis*, *M. bovis bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium orix*, *Mycobacterium pinnipedii*, y los descritos más recientemente, el llamado *chimpanzee bacillus*, *dassie bacillus*, *Mycobacterium mungi*, y *Mycobacterium suricattae*, los cuales se han aislado de chimpancé, damán roquero, mangosta rayada y suricata, respectivamente¹⁷.

Diagnóstico microbiológico rápido

La necesidad de un diagnóstico temprano cobra especial sentido si tenemos en cuenta que casi un 20% de las transmisiones son debidas a pacientes con baciloscopia negativa y cultivo positivo⁹, y al creciente aumento de los aislamientos con resistencias a distintos fármacos.

A pesar de que la microscopia continúa siendo el método más extendido y económico para el diagnóstico inmediato, sus inconvenientes —ya mencionados— han impulsado la investigación y el desarrollo de nuevos métodos, entre los cuales los de mayor implantación, sin lugar a dudas, han sido los basados en la biología molecular.

Biomarcadores

Un método rápido teórico para detectar infecciones activas es la detección de biomarcadores a partir de muestras mínimamente o no invasivas; sin embargo, a pesar de que hay un cierto desarrollo en esta línea, hasta el momento no se dispone de técnicas que puedan cumplir con las necesidades requeridas.

Serología. Al igual que en numerosas enfermedades infecciosas, con la TB se ha ensayado la detección de anticuerpos circulantes. Sin embargo, debido a su baja sensibilidad y a las reacciones cruzadas, la OMS ha desaconsejado formalmente su uso.

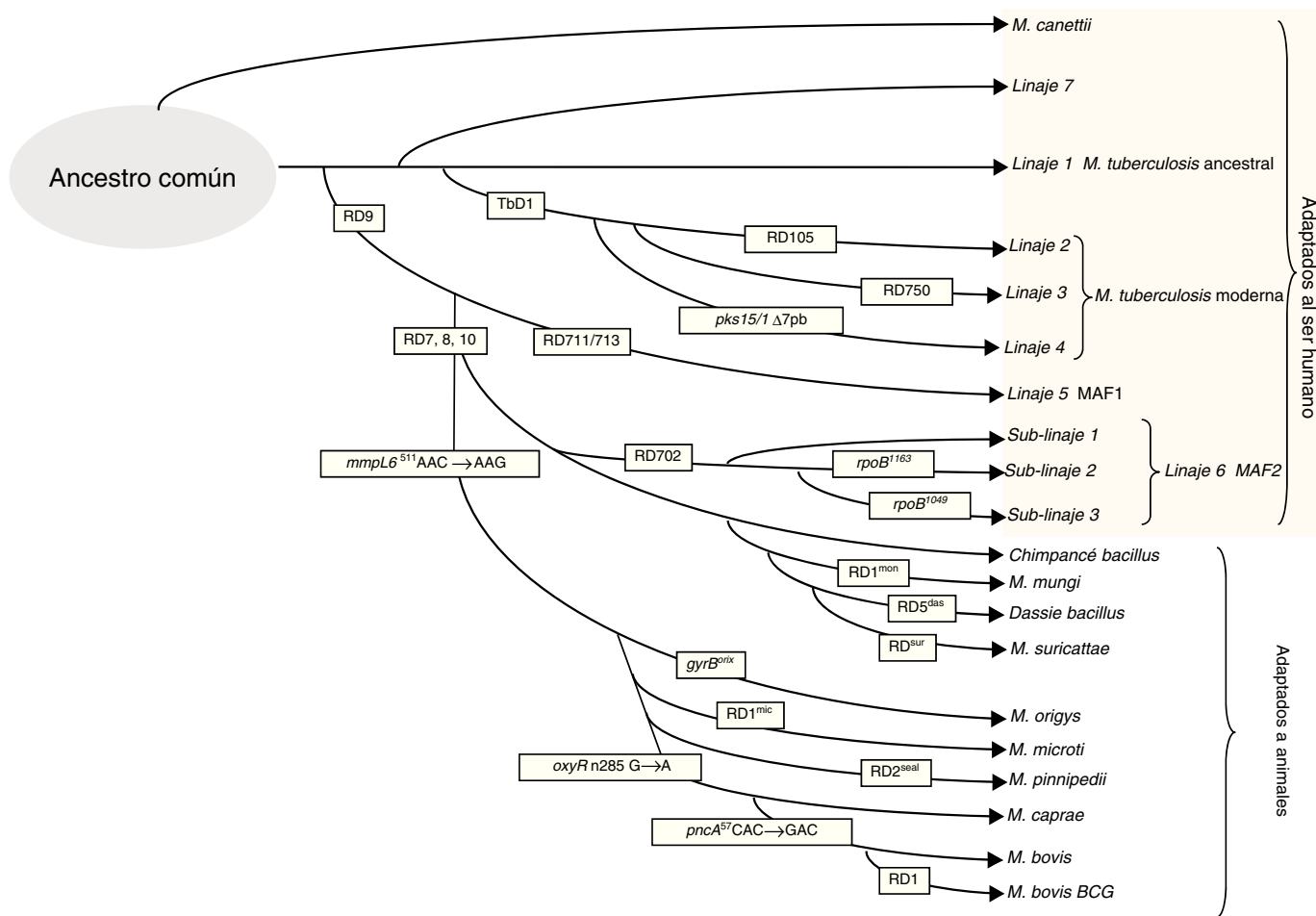


Figura 1. Árbol evolutivo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Fuente: modificado de Behr et al.⁹, Scorpio y Zhang¹⁰ y Gonzalo-Asensio et al.¹¹.

Detección de antígeno. Otra posibilidad es la búsqueda de antígeno de MTB en productos del paciente. A este respecto, existen comercializadas o en estudio algunas pruebas.

La detección en la orina de los pacientes del lipoarabinomanano, lipopolisacárido presente en la pared micobacteriana, ha sido desarrollada por Alere (LF-LAM, Alere Determine™ TB LAM Ag, Alere Inc., Waltham, MA, EE.UU.). Se trata de una inmunocromatografía de flujo lateral para realizar a pie de cama (*point-of-care*) que solo requiere una mínima cantidad de orina, 25 min de incubación, y es muy económica. Un inconveniente de esta técnica es que este lipopolisacárido no se encuentra exclusivamente en MTB, sino también en otras micobacterias. Tanto el informe de la OMS¹⁸ como una reciente revisión de la Biblioteca Cochrane¹⁹ concluyen que su sensibilidad, tanto en pacientes infectados por VIH como en convivientes, es baja, no recomendando su uso como cribado ni como diagnóstico, aunque podría ser de utilidad en pacientes con menos de 50 CD4/ μ l, donde aumenta su sensibilidad.

Compuestos volátiles orgánicos. La detección de distintos componentes en el aire espirado del paciente constituye un área de interés creciente. Varios dispositivos con filosofía *point-of-care* están en fase de desarrollo o evaluación. Se pide al paciente que exhale el aire o tosa en un dispositivo (tras nebulización con suero fisiológico) y se analizan compuestos volátiles orgánicos o la presencia de antígeno de MTB. Se están llevando a cabo estudios con resultados prometedores⁷.

TAM-TB. Otro biomarcador sería el marcador de activación de células T (TAM), descrito en 2014²⁰, que mide por citometría de flujo la expresión de una proteína de membrana (CD127) en las

células T CD4 expuestas a antígenos de MTB. En los ensayos preliminares se notificó una sensibilidad del 83%, con una especificidad del 96,6%. Próximamente se dispondrá de una versión comercial de esta técnica.

Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestra clínica

En los últimos 20 años se ha trabajado intensamente para conseguir un diagnóstico directo fiable a partir de muestra clínica. Fruto de ese trabajo son las múltiples técnicas que se han puesto en práctica y se han comercializado.

Micobacteriófagos. La utilización de fagos de micobacterias para su detección en muestra directa viene de la segunda mitad del siglo XX, cuando los micobacteriófagos fueron descubiertos. Desde entonces, se han ensayado diversos tipos de fagos y de técnicas. Las 2 técnicas más importantes son: *Phague Amplified Biologically Assay*, la primera que se utilizó, se basa en la capacidad del fago en lisar las células de un cultivo de *Mycobacterium smegmatis*, utilizado como control. Si el esputo del paciente contiene MTB viables, una vez que los fagos han sido liberados por lisis, se replican y crean «agujeros» en el agar del control. La segunda, más reciente, el *Luciferase Reporter Phague Assay*, consiste en un fago al que se le ha incorporado el gen de la luciferasa. En presencia del sustrato luciferina, si hay micobacterias en la muestra, las infecta y se produce una emisión de luz que puede ser medida en un luminómetro. Estos test se realizan en 2-3 días, son sencillos y económicos y tienen buena especificidad, pero una sensibilidad variable que disminuye en las muestras con baja carga bacteriana²¹.

Métodos moleculares. Los mayores avances de los últimos años en el diagnóstico rápido de las enfermedades infecciosas, incluyendo la TB, se han producido sin lugar a dudas en el campo de la biología molecular. Los diferentes kits comerciales se basan en los polimorfismos genéticos que diferencian a los linajes con mayor repercusión clínica: MTB, *M. bovis*, *M. bovis* BCG y *M. africanum*. La sensibilidad, reproducibilidad, rapidez de resultados, la cada vez mayor automatización y el abaratamiento de costes han convertido estos métodos en trabajo de rutina en los laboratorios de microbiología.

Los test clásicos para amplificación de ácidos nucleicos, con diferentes tecnologías, se basan en la amplificación de secuencias diana y su posterior detección, ya sea por quimioluminiscencia, colorimetría o fluorometría²². Entre ellos:

Amplified *M. tuberculosis* Direct Test (AMTD, Gen-Probe Inc., EE. UU.). Amplifica el ARNr 16S mediante una reacción isotérmica y luego lo hibrida con sondas específicas de MTB que detecta mediante quimioluminiscencia. Fue el primer test aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1995 para muestras con baciloscopia positiva (>90% de sensibilidad), y en el 2000 para baciloscopia negativa (menor sensibilidad, 65–93%). Los principales inconvenientes son la ausencia de control interno y que no está automatizado.

Cobas Amplificor *M. tuberculosis* test (Roche Diagnostic System Inc., Suiza). Amplifica el ARNr 16S mediante PCR, hibrida con sondas y realiza la detección por colorimetría. También cuenta con la aprobación de la FDA desde 1996. Tiene una sensibilidad similar al anterior en baciloscopia positiva, y algo inferior si es negativa, manteniendo una muy buena especificidad (91–100%). A diferencia del AMTD, puede automatizarse y cuenta con control interno.

BD Probe Tec ET Direct TB System (DTB, Becton Dickinson). Amplifica 2 dianas, el ARNr 16S y el IS6110 mediante la técnica SDA (*strand displacement amplification*), que es una reacción enzimática isotérmica, detectando el producto final por fluorescencia. Su sensibilidad es mayor del 90% en muestras con baciloscopia positiva, y desciende considerablemente, con un rango variable en distintos estudios, en las negativas.

TB-LAMP (Eiken Chemical Company Ltd, Japón). Es un test basado en una técnica bastante reciente denominada LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), que amplifica ADN de forma muy rápida (menos de una hora), con lectura del resultado a simple vista por turbidez, color o fluorescencia, y con muy pocos requerimientos de infraestructura. Sus resultados son prometedores, y en una reciente revisión para muestras de esputo²³ la OMS concluye que puede ser una alternativa en lugares con recursos escasos.

Otros métodos que detectan el producto amplificado por una hibridación en fase sólida consisten en una tira de nitrocelulosa que lleva fijadas las sondas específicas. Entre ellos, relativamente reciente (2010), está el método GenoQuick MTB (Hain Lifescience), que tiene como diana la secuencia de inserción específica para el MTBc, IS6110, y realiza la detección mediante hibridación en flujo lateral. La técnica se realiza en 3 h, la fase postamplificación es manual y tiene una alta sensibilidad.

Existen otros 2 ensayos de hibridación en fase sólida comercializados INNO-LiPA Rif. TB (Innogenetics, Bélgica) y GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience) que, además de identificar MTBc, son capaces de detectar mutaciones de resistencia, de las que hablaremos más adelante. Son de muy fácil interpretación y pueden utilizarse tanto en muestra directa como en cultivos, ambos con sensibilidades muy altas, y en ambos la fase postamplificación puede hacerse de forma manual o automatizada.

PCR a tiempo real. La PCR a tiempo real realiza simultáneamente la amplificación de las dianas y la detección mediante sondas fluorescentes tipo *TaqMan* o *Molecular Beacons* generalmente. Estas sondas incorporan un fluorocromo y un inhibidor que

se encuentran muy próximos, de manera que cuando hay unión con la diana amplificada se produce la separación y se emite una luz que puede ser detectada y que es proporcional a la cantidad de microorganismo que había en la muestra. La irrupción de la PCR a tiempo real ha supuesto un gran avance en el diagnóstico microbiológico, incluidas las micobacterias, reduciendo los problemas de contaminación al realizarse todo el ensayo en un solo tubo que no hay que manipular, aumentando la sensibilidad y con la ventaja de poder obtener una cuantificación del microorganismo estudiado en la muestra.

Cobas Taqman MTB (Roche Diagnostics) es una adaptación del Cobas Amplificor MTB de la misma casa, visto anteriormente (amplifica ARNr 16S), que parece haber aumentado su especificidad con esta técnica.

Fluorotype MTB (Hain Lifescience), aparecido en 2011, tiene como diana a IS6110, puede usarse también en muestras extrapulmonares y el resultado es analizado por el programa que evalúa la fluorescencia emitida a distintas temperaturas, reconociendo la correspondiente a MTB. Varios estudios le han reconocido una sensibilidad del 100% en muestras baciloscopia positiva y entre el 55–85% en baciloscopia negativa²⁴.

También utilizan como diana IS6110 el Abbott Real Time MTB, con igual sensibilidad que el anterior en baciloscopia positiva y algo superior en baciloscopia negativa, si bien solo está indicado en muestras respiratorias. Está disponible otro test de la misma marca (Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance), que también detecta resistencia a INH y Rif.

Anyplex plus MTB/NTM/DR-TB (Seegene Inc., Corea), no solo diferencia entre MTB y MNT, ya que, si es positivo, en un segundo ensayo (de solo 40 min), puede detectar resistencias a INH y Rif.

Por último cabe mencionar el Xpert MTB/RIF (Cepheid), que es un sistema totalmente automatizado, sin manipulación, salvo la introducción de la muestra en el cartucho, y que detecta simultáneamente la presencia de MTB y la resistencia a Rif. Como inconveniente cabe destacar que es más caro que otros sistemas, si bien tiene un acuerdo de bajo precio para países con recursos limitados. En el año 2011, tras una evaluación de su efectividad, la OMS lo recomendó como primer paso diagnóstico en países con alta incidencia de TB-MDR²⁵.

Identificación a partir de cultivos positivos

La rapidez en la identificación de las cepas que se obtienen por cultivo es igualmente importante para discriminar MTB de las que no lo son. Actualmente disponemos de 2 métodos muy rápidos no basados en amplificación molecular:

Inmunocromatografía. Hay varias pruebas comerciales basadas en la detección del antígeno MPT64 que es una proteína excretada por la casi totalidad de MTBc (excepto si presentan mutaciones del gen *mpt64*), y salvo algunos *M. bovis* BCG. La prueba puede realizarse a partir de medio líquido directamente, o a partir de medio sólido utilizando un tampón de extracción. El dispositivo, tipo «jabonera», lleva fijados anticuerpos anti-MPT64 y aparece una línea de color en menos de 15 min a partir de añadir la suspensión bacteriana. La sensibilidad y especificidad están muy cercanas al 100%.

Espectrometría de masas. En los últimos años, la identificación de los cultivos microbiológicos en general ha experimentado una auténtica revolución, pasando de los tradicionales métodos bioquímicos a la espectrometría de masas mediante el MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*). En el campo de las micobacterias, se ha tardado algo más en incorporar esta técnica debido a los distintos protocolos no estandarizados, y a los peores resultados. Sin embargo, poco a poco se ha producido una mejora, tanto en la técnica como en las bibliotecas de bases de datos de los sistemas, que están haciendo que cada vez se

empleen con mayor frecuencia, y estudios recientes indican que su concordancia con los métodos genéticos es muy alta²⁶. Con seguridad, en poco tiempo será uno de los métodos más utilizados para identificar micobacterias de forma rápida y fiable en aquellos laboratorios que puedan disponer del espectrómetro.

Técnicas moleculares

Sondas de ácidos nucleicos. Fue la primera prueba basada en detección de ácidos nucleicos de la que se dispuso. Consiste en diseñar sondas fluorescentes de ADN complementario al ARNr de la micobacteria que queremos identificar, y al realizarse la unión, se produce una reacción quimioluminiscente. Se puede utilizar tanto para medio líquido como sólido, y su sensibilidad y especificidad son muy buenas. No se realiza amplificación genética ya que el ARNr es obtenido sonicando la suspensión bacteriana, por lo que no necesita medios técnicos complejos y el resultado se obtiene en menos de 2 h.

Existen sondas para MTBc y para las MNT más importantes en la clínica como *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae*, etc., y su mayor inconveniente es que es necesario tener una orientación de la micobacteria de la que se trata, para poder elegir la sonda adecuada, y en caso de que el resultado sea negativo, hay que probar con otra.

Amplificación genética. Estas pruebas consisten en amplificar los ácidos nucleicos de determinadas regiones genéticas y analizarlos posteriormente. La amplificación se realiza mediante PCR del extracto de ADN obtenido del cultivo sólido o líquido, y el producto final puede ser estudiado de diferentes maneras:

PRA (PCR-RFLP del gen *hsp65*). Es una técnica relativamente sencilla, económica y rápida, basada en la amplificación de dicho gen, cuya secuencia presenta zonas conservadas y otras variables, con lo que pueden diferenciarse distintas especies. Una vez amplificado, se somete a una digestión enzimática y posterior electroforesis, analizándose el patrón de bandas. El patrón de bandas resultante es característico para las diferentes especies de micobacterias.

Secuenciación ADNr 16S. La secuenciación del ADNr del 16S, tras amplificación por PCR, ha supuesto un vuelco en el sistema de taxonomía bacteriana en los últimos años, permitiendo establecer las relaciones filogenéticas que existen entre los distintos microorganismos, dando lugar a un nuevo sistema de clasificación, y a la posibilidad de una identificación absolutamente precisa de los mismos. Es una técnica compleja y cara, por lo que su uso está limitado a laboratorios especializados, aunque se está trabajando en aplicaciones más rápidas y económicas como la pirosecuenciación, que hace esta técnica mucho más asequible.

Hibridación en fase sólida. Como ya hemos mencionado anteriormente, las técnicas de hibridación en fase sólida enfrentan el producto de la amplificación genética a unas tiras de nitrocelulosa en las que están fijadas unas sondas específicas marcadas. Tras el revelado por reacción enzimática, obtenemos un patrón de bandas que nos indica a qué especie micobacteriana corresponde. Existen 2 sistemas comerciales en el mercado: el INNO-LIPA MYCOBACTERIA (Innogenetics, Bélgica) y el Geno-Type (GT) *Mycobacterium* (Hain Lifescience, Alemania). En el primero de ellos, la amplificación se realiza sobre el espacio intergénico 16S-23S, y la tira de nitrocelulosa tiene 22 sondas que permiten identificar el complejo MTB y otras 16 MNT, de relevancia clínica. El GT *Mycobacterium* amplifica el gen *23SrRNA* y existen 3 diferentes formatos. El GT MTBc identifica las subespecies del MTBc, el GT CM identifica MTBc y 13 especies de MNT, y el GT AS identifica 16 especies más. Aunque estos ensayos están validados para estudio de cepas, es posible realizarlos en muestra directa con baciloscopia positiva.

Existen también técnicas de hibridación en fase sólida en pocillos (microarrays), que permiten un número mayor de sondas, pero

en la actualidad no están suficientemente desarrollados para su comercialización en la clínica.

Estudio de los mecanismos que confieren resistencia

Existen algunos métodos para determinar la sensibilidad de las micobacterias que son más rápidos que el tradicional método de las proporciones, y que están recomendados por la OMS en aquellos lugares que no pueden disponer de la tecnología necesaria, como son la observación microscópica directa de la sensibilidad a los fármacos (MODS, por su acrónimo en inglés), las pruebas con indicador colorimétrico redox (CRI) o el ensayo de la nitrato reductasa (NRA). Sin embargo, el mayor impulso en este campo ha sido, sin lugar a dudas, el desarrollo de la detección de los mecanismos de resistencia mediante técnicas moleculares recomendadas por la OMS de manera universal. En esta sección resumimos los eventos moleculares que se han seleccionado en la evolución de las cepas clínicas de MTB para la adquisición de resistencias en el curso de las infecciones y brotes. El mecanismo de resistencia a fármacos *de novo* entre los miembros del MTBc se debe a la adquisición de mutaciones individuales, a diferencia de otras bacterias en las que el mecanismo de adquisición de resistencia es principalmente por transferencia horizontal de casetes con genes de resistencia. Desde hace varios años se está trabajando para determinar las mutaciones que causan la resistencia a los fármacos antituberculosos. La [tabla 1](#) resume las bases genéticas de la resistencia de MTBc frente a los fármacos de primera y segunda línea.

La *rifampicina* es un gran bactericida que, además de interferir con la síntesis del ARN por unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa, se ha descrito que induce la formación de radicales hidroxilo en las cepas sensibles, contribuyendo a aumentar su poder bactericida²⁸. La resistencia a Rif en más de un 96% está causada por mutaciones en una región de 81-pb del gen *rpoB* (RRDR, codones 428 a 456 o 507 a 533 referidos a H37Rv o *Escherichia coli* respectivamente), que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa²⁹. Estas mutaciones en la proteína esencial RpoB provocarían una reducción del *fitness* y se asociarían a una menor transmisibilidad de la bacteria de un huésped a otro. Sin embargo, se sugiere que una cepa resistente a Rif puede tener éxito en su transmisión, así como una concentración mínima inhibitoria (CIM) alta si es capaz de generar mutaciones compensatorias eficientes que le permitieran eludir o sortear este coste, lo que explicaría que algunas cepas MDR se transmiten mejor que otras³⁰. Casali et al. encontraron que el 97% de las cepas Beijing que producían los casos de TB-MDR en la población rusa tenían la mutación más frecuente en *rpoB*, S450L (S531L referido a *E. coli*), y tenían mutaciones compensatorias en los genes *rpoA* o *rpoC*, o en el propio gen *rpoB*³¹. Meftahi et al. también lo describen para una cepa MDR Haarlem responsable de un brote en Túnez, que tenía una segunda mutación en codón V534M confirmando con pruebas fenotípicas que esta mutación compensaba el *fitness* perdido además de aumentar el nivel de resistencia a Rif³². Mutaciones en *rpoB* generalmente se asocian a resistencia a todas las rifamicinas, incluida la rifabutina, sin embargo, las mutaciones 514, D516V y S522L se han descrito asociadas a resistencia a Rif y sensibilidad a rifabutina. Así mismo se han encontrado mutaciones en cepas sensibles, por ejemplo 510H, L511P, D516Y, N518D, H526N y L533P^{33,34}, lo que podría causar errores en las técnicas moleculares si no se consideran. La monoresistencia a Rif es rara, generalmente se asocia a resistencia a INH; este hecho, junto con el alto rendimiento de su detección molecular, hace que se utilice como un buen marcador de TB-MDR¹. La [tabla 2](#) muestra las mutaciones más frecuentes y consistentes con resistencia para los fármacos de primera línea.

La resistencia de alto nivel a *isoniacida* se debe principalmente a mutaciones en el gen catalasa-peroxidasa *KatG*, que cataliza la

Tabla 1
Mecanismos de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* frente a fármacos de primera y segunda línea

Fármaco (año de descubrimiento)	CIM (µg/ml)	Gen involucrado en resistencia	Función del gen involucrado	Mecanismo de acción	Frecuencia de mutación (%)
Isoniazida (1952) ^a	0,02-0,2	<i>katG, inhA</i>	Catalasa-peroxidasa	Inhibición de síntesis de ácidos micólicos y otros múltiples efectos	50-95
Pirazinamida (1952) ^a	16-100	<i>pncA, rpsA, panD</i>	Enoil ACP reductasa Nicotinamidasas/pirazinamidasas, proteína ribosomal S1, aspartato decarboxilasa	Depleción de membrana energía; inhibición de trans-traslación; inhibición de síntesis de pantotenato y coenzima A	8-43 72-99
Rifampicina (1966) ^a Etambutol (1961) ^a	0,05-1 1-5	<i>rpoB</i> <i>embB, ubiA</i>	Subunidad β de ARN polimerasa Arabinosil transferasa, decaprenilfosforil-5-fosforibosa sintasa	Inhibición de síntesis de ARN	95 47-65
Estreptomina (1943) ^a	2-8	<i>rpsL, rrs, gidB</i>	Proteína ribosomal S12 16S ARNr	Inhibición de síntesis proteica	52-59 8-21
Amicacina/kanamicina (1957) ^b	2-4	<i>rrs, eis, whiB7</i>	16S ARNr, aminoglicósido acetiltransferasa, regulador transcripcional	Inhibición de síntesis proteica	76
Capreomicina (1960) ^b Quinolonas (1963) ^b	2-4 0,5-2,5	<i>rrs, tlyA</i> <i>gyrA, gyrB</i>	16S ARNr, 20-O-metiltransferasa Subunidad A de ADN girasa, subunidad B de ADN girasa	Inhibición de síntesis proteica Inhibición de síntesis de ADN	85 75-94
Etionamida (1956) ^b	2,5-10	<i>etaA/ethA</i> <i>ethR</i> <i>inhA</i>	Flavin monooxigenasa Represor transcripcional Enoil ACP reductasa	Inhibición de síntesis de ácidos micólicos	37 56
PAS (1946) ^b	1-8	<i>thyA</i> <i>dfrA</i> <i>folC</i> <i>ribD</i>	Timidilato sintetasa Dihidrofolato reductasa Dihidrofolato sintetasa Enzima en biosíntesis riboflavina	Inhibición de ácido fólico y metabolismo de nucleótido timina	37
Cicloserina (1955) ^b	10-40	<i>alr</i> <i>ddl</i> <i>cycA</i>	Alanina racimasa D-alanina-D-alanina ligasa Probable transportadora de D-serina / alanina / glicina	Inhibición de síntesis de peptidoglicano de la pared celular	Desconocido

ACP: proteína transportadora de acilo; CIM: concentración mínima inhibitoria; PAS: ácido para-aminosalicílico.
Fuente: Zhang y Yew²⁷.

- ^a Fármacos de primera línea.
- ^b Fármacos de segunda línea.

Tabla 2
Resistencia a fármacos de primera línea

Fármaco	Nom. gen	Codón afectado
Isoniazida	<i>katG</i>	Ser315Thr /Asn/Ile/Gly Trp300Gly Thr275Pro
	<i>fabG1</i>	-15 c-t -8 t-a / t-c
	<i>inhA</i>	Ser94Ala
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Val170Phe Gln432Leu Asp435Tyr/Gly/Val His445Tyr /Asn/Asp/Pro/Arg Ser450Leu /Trp Leu452Pro Ile491Phe
	<i>pncA</i>	Más de 100 posiciones diferentes incluida la región promotora
	<i>embB</i>	Met306Val /Leu/Thr/Ile Gly406Ser/Cys/Ala/asp Gln497Arg
	<i>rpsL</i>	Lys43Arg Lys88Arg

En negrita se señalan las mutaciones que se presentan con mayor frecuencia asociadas a la resistencia del correspondiente fármaco.

oxidación del profármaco a su forma activa³⁵. La resistencia de bajo nivel se asocia con mutaciones en el gen *inhA*, que codifica una enoil-acil-portador-proteína reductasa NADH-dependiente, diana del fármaco, involucrada en la síntesis de ácidos micólicos³⁶. Se han descrito otros genes relacionados con la resistencia a INH, como

ahpC, y mutaciones que podrían ser compensatorias a la pérdida de la actividad catalasa³⁷.

La *pirazinamida* (PZ) es un importante fármaco esterilizante que acorta la terapia de la TB. Sin embargo, el mecanismo de acción de la PZ es poco conocido. El ácido pirazinoico, principio activo de la PZ, altera la energía de la membrana e inhibe la función de transporte de la membrana en MTB. La actividad preferencial de la PZ frente a bacilos en estado no replicativo se correlaciona con su bajo potencial de membrana y la disrupción del potencial de membrana por el ácido pirazinoico y el pH ácido³⁸. Mutaciones a lo largo del gen *pncA* se han descrito como causa de resistencia a PZ. *M. bovis* se caracteriza por una mutación en el aminoácido 57 del gen *pncA*, que además le convierte en resistente a PZ de forma natural. También podrían estar involucrados el gen *rpsA* en casos de bajo nivel de resistencia y *panD*. De hecho, *Mycobacterium canettii* presenta una mutación en *panD* que parece ser le confiere resistencia intrínseca a PZ²⁷.

El *etambutol* (EMB) interfiere con la síntesis del arabinogalactano de la pared celular. Tiene como diana la enzima arabinosil transferasa, y mutaciones en el operón que la codifica *embCAB* pueden causar resistencia a EMB. La mutación más frecuente se da en el codón 306 de *embB*, llegando hasta el 68% de los casos³⁹.

Entre los aminoglicósidos utilizados se encuentran SM, AK, KM y CPM. La SM inhibe la síntesis proteica uniéndose a la subunidad ribosomal 30S y causando así alteraciones en la lectura del ARN mensajero. La resistencia está causada por mutaciones en el gen *rpsL* que codifica para la proteína 12S y en *rrs* que codifica para ARNr 16S, que suponen el 50 y el 20% de las resistencias a SM respectivamente. Se han descrito mutaciones en *gidB* en cepas resistentes

Tabla 3
Mecanismos de resistencia de los nuevos fármacos o agentes propuestos frente a *Mycobacterium tuberculosis*

Fármaco (año de descubrimiento)	CIM $\mu\text{g/ml}$	Gen involucrado en la resistencia	Función del gen	Mecanismo de acción
Delamanid (OPC-67683) (2006)	0,006-0,012	<i>ddn</i> <i>fdg1</i>	Nitrorreductasa dependiente de deazaflavin, G6P deshidrogenasa dependiente de F420	Inhibición de síntesis de ácidos micólicos, producción de especies de nitrógeno reactivo
Bedaquilina (TMC207) (2005)	0,06-0,12	<i>atpE</i> <i>rv0678</i>	Inhibe la enzima F1F0 protón sintetasa Represor transcripción del transportador MmpL5	Inhibición de producción de ATP Aumento de la expresión de bomba de eflujo
SQ109 (2005)	0,5	<i>mmpL3</i>	Transportador de membrana	Inhibición de síntesis de ácidos micólicos
Clofazimina (1956)	0,1-0,25	<i>rv0678</i>	Represor transcripción del transportador MmpL5	Aumento de la expresión de bomba de eflujo, producción especies reactivas del oxígeno, inhibición de producción energía, disrupción membrana
Linezolid (1996)	0,25-0,5	<i>rrn</i>	23SrRNA	Inhibición de síntesis proteica

ATP: adenosín trifosfato; CIM: concentración mínima inhibitoria.

Fuente: Zhang y Yew²⁷.

a SM y se ha visto resistencia cruzada con SM y KM en la región promotora de *whyB7*. Mutaciones en la posición 1400 de *rrs* se han descrito como causantes de resistencia a KM y AK. Mutaciones en la región promotora de *eis* causan bajo nivel de resistencia a KM pero no a AK²⁷. Mutaciones en *tlyA* y en *rrs* (A1401G y G1484T) están relacionadas con resistencia a CPM y KM. Múltiples mutaciones pueden darse en el gen *rrs* y producir resistencia entre estos fármacos.

El mecanismo de acción de las *fluoroquinolonas* es la inhibición de la topoisomerasa II (ADN girasa), codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*. Mutaciones en el gen *gyrA*, con mayor frecuencia en los codones 94, 90 y 88, están asociadas a resistencia. Mutaciones en *gyrB* pueden dar resistencia de bajo nivel, y mutaciones dobles en *gyrA* y *gyrB* pueden dar un mayor nivel de resistencia. Un hallazgo interesante es que la concurrencia de 2 mutaciones T80A y A90G en *gyrA* hacen a la cepa hipersensible a la mayoría de quinolonas⁴⁰, lo que puede hacer más complejo el estudio de estas resistencias⁴¹.

La *cicloserina* actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglicano de la pared celular, si bien los mecanismos de resistencia todavía no están bien definidos.

El ácido para-aminosalicílico tiene un mecanismo de acción no bien conocido, que podría interferir con la biosíntesis del ácido fólico. Se han descrito mutaciones en los genes *thyA* en el 40% de los casos y también en los genes *folC* y *dfrA*⁴².

Entre los nuevos fármacos propuestos para el tratamiento de TB, la *bedaquilina* inhibe la adenosín trifosfato (ATP) sintasa, siendo activa frente a población en crecimiento y no crecimiento. En el modelo de ratón, parece tener efecto sinérgico con la PZ. Las resistencias que se han descrito estarían en la *atpE* y en el gen *Rv0678* que sobreexpresaría la bomba de eflujo *MmpL5* provocando resistencia cruzada de clofazimina y bedaquilina. El *delamanid* inhibe la síntesis de ácidos micólicos, debe ser activado por una enzima nitrorreductasa, *Ddn*, y tiene actividad frente a los bacilos en estado no replicativo. Se ha asociado su resistencia a mutaciones en los genes *fdg1*, *ddn*, *fbiA*, *fbiB* y *fbiC*. Las oxazolidonas, y entre ellas el *linezolid*, inhiben la síntesis proteica uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma y la resistencia se asocia principalmente a mutaciones en el gen *23SrRNA*. SQ109 es un análogo del EMB pero con un mecanismo de acción diferente, que tiene como diana la proteína *MmpL3*, imposibilitando la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular. Mutaciones en el gen *mmpL3* se han asociado con resistencia a SQ109²⁷ (tabla 3).

Existen varias bases de datos de libre acceso que recopilan los polimorfismos asociados a resistencia a fármacos de primera y segunda línea, como son <https://tbdreamdb.ki.se/Info/>⁴³ y <https://umr5558-biserv.univ-lyon1.fr/mubii/mubii-select.cgi>.

Detección rápida de los genes implicados en resistencia

Los métodos de detección son de 2 tipos fundamentalmente, los basados en amplificación mediante PCR e hibridación en fase sólida, y los basados en PCR a tiempo real.

Hibridación en fase sólida. Como ya mencionamos en la identificación de muestra directa, hay 2 pruebas disponibles, el INNO-LIPA1 Rif.TB y el Genotype, del que tenemos 3 versiones: MTBDRplus, MTBDRsl y NTM-DR⁴⁴. El INNO-LIPA consta de 10 sondas en su tira, una de ellas identifica MTBc, 5 ponen de manifiesto regiones específicas del gen *rpoB* presentes en las cepas sensibles, y 4 detectan las mutaciones. Tiene una sensibilidad muy alta en cultivos, y, como siempre, menor en muestra directa. Las mutaciones que se pueden poner de manifiesto cubren aproximadamente el 95% de las resistencias confirmadas por antibiograma, y sirve como marcador de multiresistencia (TB-MDR)⁴⁵ ya que la resistencia aislada a Rif es bastante rara (alrededor de un 5%). El MTBDRplus es similar al anterior, pero también detecta la resistencia a INH mediante el estudio de los genes *inhA* (que codifica resistencia de bajo nivel) y *katG* (que codifica resistencia de alto nivel). Tiene, al igual que antes, sondas para las regiones salvajes (sensibles) y sus correspondientes mutaciones, cubriendo el 80-85% de las resistencias a INH. Está recomendado por la OMS desde el año 2008 y puede realizarse tanto sobre muestra directa como sobre cultivo, con magnífica sensibilidad y especificidad.

De más reciente aparición son el MTBDRsl, que busca detectar resistencias a fármacos de segunda línea como CP, AK y KM (gen *rrs*), fluoroquinolonas (gen *gyrA*) y a EMB (gen *embB*), con buena sensibilidad para quinolonas, algo peor para aminoglucósidos y más baja aún para EMB. Existe una segunda versión que incluye el estudio del gen *eis* (que mejora el rendimiento de la KM, aunque empeora la especificidad de los inyectables), y el del gen *gyrB* para las quinolonas, desapareciendo el EMB.

El NTM-DR identifica algunas especies de MNT (*M. avium*, *M. intracellulare*, *Mycobacterium quimaera*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus*) y detecta mutaciones en los genes *rrs* para aminoglucósidos, y *rrl* para macrólidos, así como la presencia del gen *erm* en *M. abscessus* (resistencia inducible a macrólidos).

PCR a tiempo real. Como ya se ha comentado, la PCR a tiempo real tiene grandes ventajas, por lo que también está irrumpiendo en la detección de resistencias de las micobacterias. Ya hemos visto que el test Anyplex plus MTB/NTM/DR-TB, en un segundo paso, una vez que ha resultado positivo para MTB, puede detectar mutaciones de resistencia. En concreto estudia 4 mutaciones para el gen *katG* y 3 para el *inhA* (resistencia a INH), 18 mutaciones del gen *rpoB* (resistencia a Rif), 7 mutaciones del *gyrA* (quinolonas) y 6 mutaciones

para fármacos inyectables (3 para el gen *rrs* y 3 para el promotor *eis*). Su sensibilidad y especificidad ha sido recientemente comparada en cultivos con MTBDRplus y MTBDRsl siendo equiparable, salvo para aminoglucósidos, que ha sido ligeramente superior⁴⁶. El Abbott RealTime MTB RIF/INH también detecta las resistencias mediadas por los mismos genes (*katG* e *inhA* para INH y *rpoB* para Rif) con muy buena sensibilidad y especificidad, habiendo recibido recientemente el marcado CE-IVD.

Por último hay que mencionar el Xpert MTB/RIF, que como vimos ha sido recomendado por la OMS en 2010. Estudia las mutaciones del gen *rpoB*, y según la revisión Cochrane⁴⁷ tiene una sensibilidad acumulada del 95% y una especificidad del 98%. Su rapidez y extrema sencillez, al estar todo el proceso integrado en un cartucho que no requiere manipulación, hace que sea muy atractivo, habiendo sido impulsado por la OMS como herramienta para diagnosticar rápidamente tanto la enfermedad como las cepas resistentes en las zonas con altas tasas de ambas. Gracias a un acuerdo comercial con los países con bajos ingresos (la mayoría de los que tienen esas altas incidencias), se dispensa a un precio reducido, habiéndose distribuido millones de cartuchos. En los países desarrollados, el mayor inconveniente es el precio, aunque en un estudio muy reciente se expone que su uso en todos los pacientes resulta coste-efectivo⁴⁸.

La secuenciación del genoma completo (WGS) de MTB para la detección de resistencia a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea se ha utilizado ya en distintas ocasiones. En una revisión reciente sobre el tema, se ha determinado la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de WGS utilizando los métodos de ensayo de sensibilidad a fármacos fenotípicos como patrón de referencia. Concluyendo, WGS puede considerarse una alternativa prometedora a los métodos de ensayo de sensibilidad fenotípica y molecular existentes para Rif e INH en espera de la estandarización de los procedimientos analíticos⁴⁹. También recientemente se ha publicado una biblioteca con 1.325 polimorfismos basados en la secuenciación genómica que serían predictivos de resistencia a AM, CP, EMB, etionamida, INH, KM, moxifloxacino, ofloxacina, PZ, Rif y estreptomina⁵⁰.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- WHO. Global tuberculosis report 2016. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015. Disponible en: <http://www.who.int/>
- Bloemberg GV, Keller PM, Stucki D, Trauner A, Borrell S, Latshang T, et al. Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis. *N Engl J Med.* 2015;373:1986–8.
- Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A. Interlaboratory drug susceptibility testing *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric procedure and two conventional methods. *J Clin Microbiol.* 1985;22:2332–8.
- Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drugues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev Tuberc.* 1963;27:217.
- Guerrero A, Martín N, Moreno S, Nogales MC. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Procedimientos en microbiología clínica* cap. 9. Recomendaciones SEIMC 1999. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. Stockholm: ECDC; 2016.
- Boyle DS, Pai M. UNITAID Tuberculosis diagnostics technology and market landscape. 4th ed.; 2015. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/282878590>
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:3684–9.
- Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de León A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet.* 1999;353:444–9.
- Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* 1996;2:662–7.
- Gonzalo-Asensio J, Malaga W, Pawlik A, Astarie-Dequeker C, Passemar C, Moreau F, et al. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:11491–6.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet.* 2013;45:1176–82.
- Cabal A, Strunk M, Domínguez J, Lezcano MA, Vitoria MA, Ferrero M, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis used for the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on a pyrosequencing assay. *BMC Microbiol.* 2014;14:21.
- Bouakaze C, Keyser C, de Martino SJ, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, et al. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot Minisequencing-based assay. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1758–66.
- Homolka S, Prohahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nübel U, et al. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2012;7:e39855.
- Huard RC, Fabre M, de Haas P, Lazzarini LCO, van Soolingen D, Cousins D, et al. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol.* 2006;128:4271–87.
- Dippenaar A, Parsons SD, Sampson SL, van der Merwe RG, Drewé JA, Abdallah AM, et al. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95:682–8.
- World Health Organization. The use of lateral flow urine lipoarabinomannan assay (LF-LAM) for the diagnosis and screening of active tuberculosis in people living with HIV. Policy guidance. WHO/HTM/TB/2015.25. Geneva: World Health Organization; 2015.
- Shah M, Hanrahan C, Wang ZY, Dendukuri N, Lawn SD, Denkinger CM, et al. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in HIV-positive adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016. Art. No.: CD011420.
- Portevin D, Moukambi F, Clowes P, Bauer A, Chachage M, Ntinginya NE, et al. Assessment of the novel T-cell activation marker-tuberculosis assay for diagnosis of active tuberculosis in children: a prospective proof-of-concept study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:931–8.
- McNerney R, Traoré H. Mycobacteriophage and their application to disease control. *J Appl Microbiol.* 2005;99:223–33.
- Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Suppl. 1:34–40.
- World Health Organization. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: Policy guidance. WHO/HTM/TB/2016.07. Geneva: World Health Organization; 2016.
- Eigner U, Veldner A, Holfelder M. Evaluation of the fluorotype MTB assay for the rapid and reliable detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory tract specimens. *Clin Lab.* 2013;59:1179–81.
- World Health Organization. Rapid Implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
- Mediavilla-Gradolph MC, de Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, García-Martínez MA, 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.* 2015;2015:854078.
- Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19:1276–89.
- Piccaro G, Pietraforte D, Giannoni F, Mustazzolu A, Fattorini L. Rifampin induces hydroxyl radical formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:7527–33.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993;341:647–51.
- Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet.* 2011;44:10610.
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet.* 2014;46:279–86.
- Meftahi N, Namouchi A, Mhenni B, Brandis G, Hughes D, Mardassi H. Evidence for the critical role of a secondary site *rpoB* mutation in the compensatory evolution and successful transmission of an MDR tuberculosis outbreak strain. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:324–32.
- Ocheretina O, Escuyer VE, Mabou MM, Royal-Mardi G, Collins S, Vilbrun SC, et al. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Haiti: Investigation of cases with discrepant susceptibility results. *PLoS One.* 2014;9:e9056.
- Andres S, Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Occurrence of *rpoB* mutations in isoniazid-resistant but rifampin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:590–2.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* 1992;358:591–3.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1994;263:227–30.
- Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, et al. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1996;272:1641–3.

38. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: Disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:790–5.
39. Ramaswamy SV, Amin AG, Göksel S, Stager CE, Dou SJ, El Sahly H, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:326–36.
40. Aubry A, Veziris N, Cambau E, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Fisher LM. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis: Functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:104–12.
41. Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics.* 2014;3:317–40.
42. Mathys V, Wintjens R, Lefevre P, Bertout J, Singhal A, Kiass M, et al. Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2100–9.
43. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med.* 2009;6:e1000002.
44. Alcaide F, Esteban J, González-Martin J, Palacios JJ. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.04.008>.
45. Zhang Y, Yew WW. Mechanism of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13:1320–30.
46. Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Vaquero M, Casal M. New Anyplex™ II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in MT cultures. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19:1542–6.
47. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014:1–161.
48. Herráez Ó, Asencio-Egea MA, Huertas-Vaquero M, Carranza-González R, Castellanos-Monedero J, Franco-Huerta M, et al. Estudio de coste-efectividad del diagnóstico microbiológico de tuberculosis mediante geneX-perB/RIF®. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.06.009>.
49. Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniowski F, Cirillo DM, Nikolaevskyy V. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of drug resistance: A systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23:61–8.
50. Coll F, McNerney R, Preston MD, Guerra-Assunção JA, Pain A, Clark TG. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* 2015;27:51.