



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE CIENCIAS MÉDICAS

TEMA:

INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y
EXTRAPULMONAR.

TRABAJO PRÁCTICO DEL EXAMEN COMPLEXIVO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO

AUTOR:

NOVILLO VICUÑA MICHAEL DUSTIN

MACHALA - EL ORO

Machala, 8 de Octubre del 2015

CERTIFICAMOS

Que el señor **Michael Dustin Novillo Vicuña**, es autor del presente trabajo de titulación:
“INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y EXTRAPULMONAR.” la cual fue revisada y corregida, por lo que se autorizó la impresión, reproducción y presentación a los tribunales correspondientes.

Dra. MARIA DEL CARMEN SANTILLAN

C.I. 0902882521

Dr. MALDONADO EMERSON ARMANDO

C.I. 0703320077

Dr. JARA GUERRERO EDMO

C.I. 1103101208



UTMACH

10. UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD UNIDAD DE MATRICULACIÓN, MOVILIDAD Y GRADUACIÓN

DOCUMENTO DE ENTREGA-RECEPCIÓN DE LA PARTE PRÁCTICA DEL EXAMEN COMPLEXIVO PROCESO: PT-030615

Comité evaluador designado mediante Resolución Nº Oficio 652-CD-FCQS-UTMACH de fecha 02/10/2015

Apellidos y nombres del estudiante: NOVILLO VICUÑA MICHAEL DUSTIN		
Título del reactivo práctico: INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y EXTRAPULMONAR.		
Carrera de: CIENCIAS MÉDICAS		
Fecha y hora de sustentación: 08 DE OCTUBRE DE 2015 17:00		
Integrantes del Comité evaluador		
Especialista	Firma	Fecha y hora de recepción
0902882521 -SANTILLAN SAMANIEGO MARIA DEL		
0703320077 -MALDONADO GUERRERO EMERSON		
1103101208 -JARA GUERRERO EDMO RAMIRO		

NOVILLO VICUÑA MICHAEL DUSTIN
C.I. 0705416162

Para uso exclusivo de la UMMOG	
Fecha de recepción:	
Hora de recepción:	
Persona que recibe:	
Firma de quien recibe:	

Nota Importante: Original para UMMOG-UACQS

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, NOVILLO VICUÑA MICHAEL DUSTIN, con C.I. 0705416162, estudiante de la carrera de CIENCIAS MÉDICAS de la UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD de la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA, en calidad de Autor del siguiente trabajo de titulación INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y EXTRAPULMONAR.

- Declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional. En consecuencia, asumo la responsabilidad de la originalidad del mismo y el cuidado al remitirme a las fuentes bibliográficas respectivas para fundamentar el contenido expuesto, asumiendo la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera EXCLUSIVA.
- Cedo a la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA de forma NO EXCLUSIVA con referencia a la obra en formato digital los derechos de:
 - a. Incorporar la mencionada obra al repositorio digital institucional para su democratización a nivel mundial, respetando lo establecido por la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), la Ley de Propiedad Intelectual del Estado Ecuatoriano y el Reglamento Institucional.
 - b. Adecuarla a cualquier formato o tecnología de uso en internet, así como incorporar cualquier sistema de seguridad para documentos electrónicos, correspondiéndome como Autor(a) la responsabilidad de velar por dichas adaptaciones con la finalidad de que no se desnaturalice el contenido o sentido de la misma.

Machala, 16 de diciembre de 2015

.....
NOVILLO VICUÑA MICHAEL DUSTIN

C.I. 0705416162

CERTIFICACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Michael Dustin Novillo Vicuña**, autor del siguiente trabajo de titulación:

“INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y EXTRAPULMONAR.”.

Declaro que la investigación, ideas, conceptos, procedimientos y resultados obtenidos en el siguiente trabajo son de mi absoluta responsabilidad.

.....
Michael Dustin Novillo Vicuña

C.I.: 0705416162

DEDICATORIA

Mi trabajo se lo dedico en primer lugar a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mi madre, por ser la fuente de inspiración más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. A mi padre, quien con sus consejos ha sabido guiarme para culminar una meta en mi vida.

MICHAEL NOVILLO VICUÑA.

AGRADECIMIENTOS

A mi novia por ser compañera y amiga en mi vida.

Agradezco también la confianza y el apoyo brindado por parte de mis padres, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi novia por ser pilar fundamental en mi vida y ser parte importante de la misma. A mis hermanos, que con sus consejos me ha ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

MICHAEL NOVILLO VICUÑA

RESUMEN

Tuberculosis, enfermedad infecto-contagiosa producida por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. hominis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Se calcula que en 2014 contrajeron la enfermedad 9 millones de personas, El diagnóstico de tuberculosis se sospecha por el cuadro clínico-radiológico- epidemiológico, pero debe ser confirmado por la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. En el Ecuador se realizan 3 pruebas de esputo a sintomáticos respiratorios, con lo cual se diagnosticó el 80% de tuberculosis pulmonar, el 20% restante debe ser destinado a diagnóstico mediante cultivo ya que a pesar de ser un método costoso y demorado (2-8 semanas) es el Gold estándar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con tuberculosis al presentar excelente especificidad y sensibilidad como prueba diagnóstica.

ABSTRACT

Tuberculosis, contagious disease caused by mycobacteria of *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. hominis* , *M. bovis* , *M. africanum*) . It is estimated that in 2014 contracted the disease 9 million people , the diagnosis of tuberculosis is suspected by the epidemiological - radiológico- clinician picture but should be confirmed by identification of *Mycobacterium tuberculosis*. In Ecuador three sputum tests are performed to respiratory symptoms , which 80% of pulmonary tuberculosis was diagnosed , the remaining 20 % must be intended for diagnosis by culture since despite being an expensive and time consuming method (2- 8 weeks) is the gold standard in the diagnosis and management of TB patients presenting excellent specificity and sensitivity as a diagnostic test .

INDICE

1.- Introducción.....	pág.1
2.- Historia.....	1
3.- Epidemiología.....	1
4.-Etiología.....	1
5.-Cadena epidemiológica de la transmisión.....	2
6.- Historia Natural de la Tuberculosis.....	2 y 3
7.- Factores de riesgo de infección y de enfermedad.....	3
8.- Cuadro clínico.....	3
9- Diagnóstico.....	4
9.1. - Historia clínica.....	4
10.- Métodos diagnósticos.....	4
10.1.- Baciloscopia directa.	4 y 5
10.2.- Radiografía de tórax.....	5
10.3.- Cultivo de las micobacterias	5 y 6
11.- Indicaciones para el cultivo de mycobacterium Tuberculosis.....	6
11.1.- En el momento del diagnóstico:.....	6 y 9
11.2.- Durante el control del tratamiento cultivar muestras de.....	10
12.- Tratamiento.....	10
13.- Conclusiones y Recomendaciones.....	10
14.- Bibliografía	

1.- Introducción.

Tuberculosis pulmonar (TBP), enfermedad infecto-contagiosa producida por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. hominis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Se adquiere principalmente por vía aérea, afectando principalmente al sistema respiratorio. Aunque se trata principalmente de una enfermedad pulmonar (85%), afecta también a otros órganos y tejidos. Puede ser mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado. El diagnóstico de tuberculosis se sospecha por el cuadro clínico-radiológico, pero debe ser confirmado por la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. El hallazgo de bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) en el examen directo del esputo es altamente aproximativo del diagnóstico etiológico y suficiente para iniciar el tratamiento específico.

2.- Historia.

Palabra tuberculosis fue empleada por primera vez en 1834 cuando aún el diagnóstico de la enfermedad seguía basándose en sus síntomas, en 1865 Villemin demostró la contagiosidad de la enfermedad mediante experiencias observadas en animales obtenidos de enfermos conocidos. El descubrimiento del bacilo productor de tuberculosis en el año 1842 por el sabio alemán Robert Koch.

3.- Epidemiología

La tuberculosis (TB) actualmente sigue siendo una de las enfermedades transmisibles más mortales. Se calcula que en 2014 contrajeron la enfermedad 9 millones de personas y que 1,5 millones, de los cuales 360 000 eran VIH-positivos, fallecieron por esta causa.

En el Ecuador la tasa de mortalidad ha ido disminuyendo progresivamente desde el año 2005, en que fue de 5,88 por 100 mil habitantes, hasta los 2,43 reportados en 2013; la meta a 2015 es alcanzar una tasa de mortalidad de 2 por cada 100 mil habitantes.

4.-Etiología.

Proviene de el género *Mycobacterium*, dentro de la familia Mycobacteriaceae, comprende a bacterias aeróbicas grampositivas débiles, **ácido alcohol resistentes, inmóviles**, no esporuladas, ubicuas en agua y suelos.: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M.m microti*, y *M. canettii* son miembros del complejo *M. tuberculosis (mt)*. Las micobacterias no tuberculosas (MNT), ubicuas, pueden aislarse de tierra, agua, polvo, leche, diversos animales y se asocian a enfermedad, sobre todo, el complejo *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium marinum*.

5.- La cadena epidemiológica de transmisión

5. 1.- Agente causal: La tuberculosis es una enfermedad producida por el *Mycobacterium tuberculosis*, el denominado Complejo *M. Tuberculosis* con gran diferencia el de mayor frecuencia es el *M. tuberculosis*.

5.2.- Reservorio y fuente de infección: El reservorio más importante de la enfermedad tuberculosa es el hombre sano infectado, es decir, la persona que tiene en su organismo de manera latente el bacilo sin aquejar ningún síntoma o signo externo que lo pueda identificar. Únicamente cuando el hombre sano infectado desarrolla la enfermedad es cuando se convierte en fuente de infección.

5.3.- Mecanismo de transmisión: El mecanismo más habitual es la vía aerógena, sobre todo con las pequeñas gotas aerosolizadas de 1-5 micras de diámetro; estas pequeñas gotas cargadas con pocos bacilos (entre 1 y 5 en cada gotita) Además existen de manera anecdótica las vías urogenital, cutáneo-mucosa, transplacentaria (tuberculosis congénita) y por inóculo.

5.4.- Huésped susceptible de enfermar: La susceptibilidad del huésped está condicionada por el estado de sus mecanismos de resistencia inespecíficos y específicos (inmunidad).

5.5.-Puerta de entrada: Aparato Respiratorio: Nariz, boca, piel.

5. 6.- Puerta de Salida: Aparato Respiratorio: Nariz, boca

6.- Historia natural.

6. 1.- PERIODO DE INDUCCION: Los enfermos de tuberculosis pulmonar activa producen aerosoles contaminantes, que en el exterior pierden parte de su contenido acuoso por evaporación y dejan un núcleo con uno o pocos bacilos. Los mecanismos de defensa del árbol respiratorio son incapaces de impedir que, cuando estos núcleos contaminantes son inhalados, lleguen hasta los alveólos pulmonares, donde los bacilos encuentran las condiciones adecuadas para multiplicarse. Una vez que el microorganismo llega al pulmón, suele dirigirse a lóbulos inferiores, que son los que proporcionalmente tienen más ventilación. El bacilo produce en los alveólos una reacción inflamatoria inespecífica, inicialmente mínima. Los macrófagos alveolares lo fagocitan y lo transportan a los ganglios hiliares. Los bacilos se multiplican en los macrófagos, destruyendo un gran número de ellos, y se liberan al medio extracelular del ganglio, desde donde pasan a la sangre y se diseminan por todo el organismo. Esta primoinfección suele ser asintomática y se desarrolla en 3-10 semanas

MEDIDAS DE PREVENCION PRIMARIA: Mejora de condiciones socioeconómicas Quimioprofilaxis primaria y BCG muy discutido su uso en la actualidad.

6.2.- PERIODO DE LATENCIA: Mayoría de los bacilos de la infección inicial son destruidos, algunos quedan en estado latente en el interior de los macrófagos y son capaces de provocar, meses o años después de la infección, enfermedad clínica por exacerbación endógena. La presencia de bacilos persistentes en el individuo infectado indica un notable riesgo para el futuro. El riesgo de desarrollar enfermedad tuberculosa clínica es mayor durante los primeros 5 años después de la primo infección. **MEDIDAS DE PREVENCIÓN SECUNDARIA:** Búsqueda y quimioprofilaxis secundaria de los individuos infectados que actúan de reservorio del bacilo. Aislamiento respiratorio de pacientes bacilíferos. Estudio de los contactos y convivientes de enfermos tuberculosos.

6. 3.- PERIODO DE EXPRESIÓN: Comprende desde la aparición de los signos y síntomas de la enfermedad hasta el desenlace (curación, muerte, recaída, recidiva...). La baciloscopia y el cultivo de esputo, del aspirado bronquial o gástrico son casi siempre positivos. La tendencia evolutiva de la tuberculosis del adulto es hacia la fibrosis como forma de limitación y curación de la infección. **PREVENCIÓN TERCIARIA:** Tratamiento de los casos de tuberculosis. Rehabilitación social y laboral del enfermo.

7.- Factores de riesgo de infección y de enfermedad

Por lo general para contraer la infección de TB se requiere un contacto intenso y prolongado con una persona bacilífera. En el contagio influyen factores como la cantidad de bacilos presentes en la expectoración del enfermo, el grado de intimidad, la duración de la exposición, la edad del contacto (mayor riesgo en niños) y el estado inmunológico del mismo. Los infectados con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad son: a) los conversores recientes de la tuberculina (la máxima probabilidad se da en el primer año, es de alrededor del 5-8% en los 2 primeros años y después disminuye progresivamente; en coinfectados por el HIV sin tratamiento antirretroviral aumenta al 5-10% anual); b) los individuos con infección por el HIV y otros inmunodeprimidos (por enfermedades o por tratamientos inmunodepresores, así como por tratamientos biológicos, entre los que cabe destacar, por la importancia que han adquirido, los fármacos contra el factor de necrosis tumoral alfa); c) los que tienen lesiones tuberculosas pulmonares residuales que nunca han sido tratadas, y d) los niños menores de 5 años. A esta relación aún deberían añadirse las personas con silicosis o pérdida ponderal importante.

8.- Cuadro clínico.

Aproximadamente el 10% de los individuos infectados suelen desarrollar la enfermedad activa, la mayor parte en el transcurso de los dos primeros años posteriores a la adquisición de la infección. Tuberculosis primaria: es la enfermedad de los sujetos que se infectan por primera vez. En general es leve y frecuentemente asintomática. Se ubica generalmente en el aparato respiratorio inferior. Sus características peculiares son tos productiva crónica, fiebre en picos, sudoración nocturna, decaimiento, anorexia y pérdida de peso. El tubérculo puede sufrir fibrosis y calcificación, aunque algunas bacterias no proliferativas pueden persistir. De manera alternativa, una lesión caseosa (en licuefacción) puede abrirse y descargar su contenido,

creando una cavidad que puede facilitar la dispersión, a través de las vías linfáticas y hematogena a tejidos diversos: hígado, bazo, riñones, hueso o meninges.

9-Diagnóstico.

9.1. - Historia clínica

Lo primordial para diagnosticar la tuberculosis es mantener siempre un alto índice de sospecha sobre esta enfermedad. Relacionar epidemiología con la clínica del paciente.

El diagnóstico de tuberculosis se sospecha por el cuadro clínico-radiológico, pero debe ser confirmado por la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. El hallazgo de bacilos ácidoalcohol-resistentes (BAAR) en el examen directo del esputo es altamente aproximativo del diagnóstico etiológico y suficiente para iniciar el tratamiento específico.

10.- Métodos Diagnósticos

10.1.- Baciloscopia directa. La baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen continúa siendo la base del diagnóstico y seguimiento de la TB por su sencillez, rapidez, reproducibilidad en todos los ámbitos y bajo coste, y porque detecta los casos contagiosos de la comunidad, lo que constituye la base del diagnóstico y seguimiento de la TB. Su principal inconveniente es su moderada sensibilidad ya que se requieren al menos 5 000 bacilos/ml de esputo para que la microscopía resulte positiva, que está condicionada por la localización y el grado de afectación de la enfermedad, la calidad de la muestra y el tiempo que dedica el observador para determinar que una baciloscopia es negativa. La sensibilidad puede incrementarse mediante la concentración de la muestra. Sin embargo, su especificidad es muy elevada, superior al 95%, tan sólo limitada por los falsos positivos que pueden aportar otras micobacterias ambientales o por otras causas técnicas muy infrecuentes. Por consiguiente, una baciloscopia negativa no descarta la TB, pero una baciloscopia positiva prácticamente la confirma en más del 95% de los casos y es indicación de iniciar tratamiento. **Las tinciones con fluorocromos.** Emplean como primer colorante la auramina-rodamina. Se tiñen en frío y, como en el caso anterior, tampoco se decolora con la mezcla de alcohol-clorhídrico. Al observarlos en un microscopio de fluorescencia, las micobacterias emiten una luz fluorescente. Esta luz emitida puede ser detectada rápidamente.

Ventajas: Técnica sencilla. Bajo costo. Rápidos resultados. No requiere equipo especial. Amplia cobertura. Gran utilidad para diagnosticar pacientes bacilíferos.

Desventajas Poca sensibilidad, Poca especificidad. 95%

11.2.- Radiografía de tórax

El patrón radiológico es de tipo nodular difuso, con predominio en campos pulmonares superiores. Los nódulos son de mediano tamaño, teniendo pocos milímetros de diámetro. En

algunas de las radiografías se observan cavidades de halo fino, que son características de esta forma de tuberculosis. Las mismas se constituyen por insuflación de una pequeña cavidad, creada al eliminarse por vía bronquial el caseum contenido en uno de los múltiples nódulos descritos.

10.3.- Cultivo de las micobacterias.

Es el "**patrón de oro**" en el diagnóstico y seguimiento de los casos de TB. Permite el aislamiento y la identificación del germen y la posterior determinación de sensibilidad a fármacos.

UTILIDAD DEL CULTIVO

El cultivo produce resultados tardíamente pero es más sensible que la baciloscopia.

Puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) presentes en una muestra, si es realizado en forma adecuada. Permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar. Si se considera el total de casos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmado bacteriológicamente, la baciloscopia detecta el 70-80% y el cultivo 20-30% el restante. Estas cifras están condicionadas por la situación epidemiológica. Entre los casos con tuberculosis extrapulmonar el aporte del cultivo al diagnóstico es muy variable según la localización de la patología. Aun con un resultado negativo del cultivo es posible que se establezca o se mantenga el diagnóstico de tuberculosis sobre la base de las evidencias clínicas y epidemiológicas. Cuando es necesario priorizar el uso de recursos, el cultivo es reservado para los sintomáticos que no han podido ser diagnosticados por baciloscopia. Con este criterio, se siembran principalmente las muestras de sintomáticos adultos con enfermedad pulmonar poco avanzada, las de los niños y todas las muestras extrapulmonares. En ciertas circunstancias, el cultivo permite dar seguridad al resultado de la baciloscopia positiva. Es preciso hacerlo cuando se procesan muestras provenientes de pacientes infectados por HIV que pueden estar afectados por tuberculosis pero también, con mayor frecuencia que los pacientes inmunocompetentes, por una micobacteriosis. También es necesario en el caso de muestras en las que puede haber micobacterias ambientales colonizantes (lavado gástrico, orina). Por su sensibilidad y porque detecta únicamente bacilos vivos, el cultivo es el mejor método para demostrar la curación de un paciente al finalizar el esquema terapéutico.

Sin embargo, es difícil asegurar el acceso al cultivo a todos los pacientes a los que se les da el alta, por lo que generalmente las normas requieren el simple control con una baciloscopia en favor de que puedan ser cumplidas, toda vez que la evolución clínica del paciente sea buena. El cultivo permite realizar la prueba de sensibilidad a los antibióticos, identificar a los casos que necesitan una reformulación de la quimioterapia y orientar la conformación de un nuevo esquema de tratamiento. Para este fin, es necesario cultivar las muestras de pacientes que tienen riesgo de estar afectados por tuberculosis resistente al esquema estandarizado de primera línea. Son los pacientes que tienen antecedentes de tratamiento antituberculoso, sospecha de falla de tratamiento o de contagio con un bacilo resistente a las drogas. El cultivo es el mejor método disponible para cerciorar falla de tratamiento. Para detectarlos, evitando demoras, se cultivan las muestras de casos bajo tratamiento con baciloscopia positiva al finalizar el segundo mes de

quimioterapia, y se realiza la prueba de sensibilidad inmediatamente después de desarrollado el cultivo en el caso en que la baciloscopia persista positiva en el siguiente control.

VENTAJAS Mayor sensibilidad. Mayor especificidad.

DESVENTAJAS Mayor tiempo para obtener resultados. Más costoso. Necesita equipo especial. Mayor preparación de personal

11.- Indicaciones para el cultivo de mycobacterium Tuberculosis

11. 1.- En el momento del diagnóstico: Cultivar todas las muestras de pacientes sintomáticos, con signos clínicos y/o radiográficos u otras imágenes compatibles con tuberculosis y alguna de las siguientes características:

11.1.1.- Baciloscopia negativa de 3 muestras respiratorias

La sensibilidad de la baciloscopia está entre 50% y 60% , de aquellos tuberculosos que se diagnostican por baciloscopia positiva el 80% resultan positivos en la primera muestra 15% más en la segunda y poco menos de 5% solo resultan positivos en la tercera muestra, sin embargo la concentración más baja de bacilos que se pueden detectar por baciloscopia es de 5.000 a 10000 por ml de muestra, lo que hace difícil su utilidad en paciente paucibacilares al no tener muy buena sensibilidad, por lo cual el cultivo sigue siendo el **GOLD STÁNDAR** para el diagnóstico y seguimiento de la tuberculosis a pesar de ser un procedimiento lento (4 -8 semanas) y más costoso , la concentración más baja que se pueden detectar es de 500 por ml de muestra, lo que le confiere mucha mayor sensibilidad (90% - 100%) que la baciloscopia, siendo indispensable su uso en sospecha clínica de moderada – alta de tuberculosis.

11.1.2.- Localización extrapulmonar de las enfermedades: biopsias

Lo recomendado es realizar baciloscopia y cultivo de las muestras que se sospechen de tuberculosis extrapulmonar, Los estudios Bacteriológico de localizaciones extrapulmonares son muestras paucibacilares por lo cual presentan baja rentabilidad para examen directo y cultivo.

Estudios anatomopatológicos de las muestras de biopsia: Ante la presencia de granulomas con células gigantes de Langerhans y necrosis caseosa: Alta sospecha de TBC. Estas muestras deben cultivarse para llegar al diagnóstico específico.

11.1.3- Niños

Debido a que habitualmente la TB infantil presenta formas cerradas (no bacilifera) y paucibacilares, en los niños es difícil obtener muestras clínicas adecuadas para la microbiología, el cultivo aumenta la rentabilidad del diagnóstico bacteriológico en el 20% o más de los casos,

pues se consigue su positividad con muestras que contienen 10 bacilos/ml. Permite la identificación del bacilo y practicar antibiogramas.

11.1.4.- Inmunocomprometidos, particularmente HIV positivos

El rendimiento diagnóstico de la baciloscopia de esputo no parece estar disminuido en los pacientes infectados por el VIH, aunque es significativa una mayor carga bacilífera en las tuberculosis pulmonares de los pacientes sin esta coinfección. Dada la elevada incidencia de localización diseminada, es necesario tomar muestras de orina, sangre y heces para su estudio bacteriológico

En el escenario planteado de alta resistencia en este grupo de pacientes debe exigirse a todo paciente un cultivo y prueba de susceptibilidad al 100% de pacientes con TB VIH. Del mismo modo debe insistirse en la aplicación de pruebas rápidas para la detección de TB MDR.

11.1.5.- Baciloscopia positiva en lavado gástrico

Es recomendable realizar cultivo para mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico, dado que la obtención de la muestra puede ser contaminada, paubacilar o alterada.

11.1.6.-Lavado bronquial o hisopado

Es recomendable realizar cultivo para mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico, dado que la obtención de la muestra puede ser contaminada, paubacilar o alterada.

11.1.7.-Antecedentes de tratamiento antituberculoso especialmente si se registró

Abandono o fracaso

Para además de confirmar el diagnóstico, también realizar una prueba de sensibilidad para asegurar que los bacilos no hayan desarrollado resistencia al primer esquema de tratamiento.

11.1.8.-Exposicion a infección por bacilos resistentes a las drogas (contacto de casos con Tuberculosis resistente, internados o trabajadores de la salud o prisiones)

Para comprobar o descartar el desarrollo de resistencia a fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis.

12.2.- Durante el control del tratamiento: Cultivar muestras de:

11.2.1.- Casos de tuberculosis crónicos o con baciloscopia positiva en el control del segundo mes de quimioterapia o en un control posterior.

Durante el control de tratamiento de categoría I, la baciloscopia identifica a los pacientes que no negatividad según lo esperado y que por lo tanto deben ser investigados mediante cultivo para conocer si los bacilos observados están vivos y si son resistentes a las drogas.

Para el control de tratamiento se recomienda realizar una baciloscopia mensual, si luego de finalizado el segundo mes dos o más baciloscopias mensuales consecutivas resultan positivas es necesario realizar nuevamente cultivo y prueba de sensibilidad para verificar si los bacilos eliminados continúan vivos y comparar el perfil de resistencia con el perfil inicial.

11.2.2.-Casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento

Para corroborar la falla en la terapéutica, y realizar prueba de sensibilidad para determinar el grado y perfil de resistencia.

11.2.3.-Para la vigilancia de la resistencia a drogas antituberculosas

Cultivar las muestras de casos bajo estudio o vigilancia según lo establecido en el Protocolo de trabajo.

12.- Tratamiento.

En la mayoría de los países de Latinoamérica se utiliza como tratamiento estándar de la TB el esquema denominado Categoría I por OMS/OPS. Este comprende una fase inicial (2 meses) de H+R+Z+E y una fase de continuación (diaria o intermitente) con H+R (4 meses, excepto en formas diseminadas, meningitis y enfermedad de Pott, donde se indican 7 meses). En ciertas condiciones (recaídas, abandono), OMS/OPS aconseja un esquema ampliado denominado Categoría II (2 meses de H+R+Z+E+S; 1 mes de H+R+Z+E y 5 meses de H+R+E diario o trisemanal).

13.- Conclusion: Tuberculosis: enfermedad infectocontagiosa prevalente en nuestro medio, causada por el género *Mycobacterium tuberculosis*, se transmite por el aparato respiratorio a través de los aerosoles, todas las personas son susceptibles, pero existe población con mayor riesgo de infección como son los inmunodeprimidos (HIV), para evitar la propagación debemos revisar y actuar sobre la cadena epidemiológica, controlando a los pacientes bacilíferos que son las fuentes de infección, para un diagnóstico correcto debe sospecharse en todo paciente sintomático respiratorio, realizándose un diagnóstico epidemiológico – clínico- apoyado en la microbiología, en donde juega un papel importante la baciloscopia que se encarga de diagnosticar el 80 % de la tuberculosis pulmonar, mientras que el cultivo aporta el 20% restante principalmente en las formas paucibacilares, y a pesar de ser costoso y demorado (2-8 semanas) es el método con mayor sensibilidad y especificidad tanto como para diagnóstico, seguimiento y sensibilidad. Existen casos en donde el cultivo es mandatorio y no opcional cuyos casos integran

las INDICACIONES PARA CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. El tratamiento debe ser estrictamente supervisado, para lograr la cura y evitar la presencia de resistencia.

14.- Recomendaciones: La tuberculosis es un enfermedad prevalente y emergente en nuestro país, por lo cual es de vital importancia cortar la cadena de transmisión descubriendo precozmente a los pacientes bacilíferos los cuales son la principal fuente de contagio, para lo cual debemos utilizar herramientas disponibles en nuestro medio como son la baciloscopia y cultivo, sería muy recomendable en el país el uso de diagnóstico molecular de la tuberculosis, para de esta manera continuar disminuyendo los índices de tuberculosis en nuestro medio.

John Patricio Orellana Preciado <jporellana@utmachala.edu.ec>

Para mycol_dnv@yahoo.com

nov 25 a las 5:14 P.M.

----- Mensaje reenviado -----

De: <report@analysis.orkund.com>

Fecha: 24 de noviembre de 2015, 16:18

Asunto: [Urk:TESIS] 2% de similitud - mycol_dnv@yahoo.com

Para: jporellana@utmachala.edu.ec

Documento(s) entregado(s) por: mycol_dnv@yahoo.com

Documento(s) recibido(s) el: 24/11/2015 22:07:00

Informe generado el 24/11/2015 22:18:42 por el servicio de análisis documental de Urkund.

Mensaje del depositante:

.....
John Patricio Orellana

.....
Michael Novillo Vicuña

14.- BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Jorge Martín Llaca Díaz, Amador Flores Aréchiga, María Gloria Martínez Guerra y Pedro César Cantú Martínez. LA BACILOSCOPIA Y EL CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR. Vol 4 No.3 Julio-Septiembre 2003 Departamento de Patología Clínica, Hospital Universitario "Dr. José E. González", Universidad Autónoma de Nuevo León (México) [citado 2015-09-29], Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/iv/3/articulos/tbexp_co.htm
- 2.- Organización mundial de la salud. Informe mundial sobre la tuberculosis 2014 [citado 2015-09-29], Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_execsummary_summary_es.pdf
- 3.- IMPERIALE, Belén Rocío. Meta-análisis: diagnóstico de tuberculosis resistente por técnicas no comerciales de amplificación. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [online]. 2013, vol.47, n.2 [citado 2015-09-28], pp. 407-418 . Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032529572013000200017&lng=es&nrm=iso. ISSN 0325-2957.
- 4.- Diagnóstico de Tuberculosis Xpert MTB/Rif®. Organización panamericana de la salud [citado 2015-09-29], Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24334&Itemid=
- 5.-Martha Sanz Rubio. Tuberculosis: actualización diagnóstica y terapéutica 20 de febrero del 2015. [citado 2015-09-29], Disponible en: <http://es.slideshare.net/joserrapa/actualizacion-bibliografica-en-tuberculosis-20-feb-2015>
- 6.- Universidad autónoma nacional de Mexico. Dra Teresa Urarribaren Tuberculosis . [citado 2015-09-29], Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>
- 7.- Fitzgerald, Daniel W. Sterling Timothy R, Haas David W. Capítulo: Mycobacterium tuberculosis. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. John E. Bennett MD, MACP, Raphael Dolin MD y Martin J. Blaser MD (eds.). 2015. Saunders. Pp. 2787-2818.e5. En Clinical Key. Opción en español: Mycobacterium tuberculosis, edición año 2012.
- 8.- Juan Ruiz-Manzano^a, Rafael Blanquer^b, José Luis Calpe^c, José A Caminero^d, Joan Caylà^e, José A Domínguez^f, José María García^g, Rafael Vidal^h · Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2008;44:551-66. - Vol. 44 Núm.10

DOI: 10.1157/13126836. [citado 2015-09-29], Disponible en: <http://www.archbronconeumol.org/es/diagnostico-tratamientotuberculosis/articulo/13126836/>

9.- Autor: Dres. Alimuddin Zumla, Mario Raviglione, Richard Hafner, C. Fordham von Reyn N Engl J Med 2013;368:745-55. Tuberculosis: ¿Qué hay que saber hoy?.

Intramed. [citado 2015-09-29], Disponible en:

<http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=79505>

10.- GUÍAS LATINOAMERICANAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS FÁRMACORRESISTENTE Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT). [citado 2015-09-29], Disponible en:

<http://www.intramed.net/userfiles/pdf/57367.pdf>

11.- Cenetec. Diagnostico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis. [citado 2015-09-29], Disponible en:

http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/070_GPC_CasosnuevosTBP/Tuberculosis_casos_nuevos_Rapida_CENETEC.pdf

12.- Órgano profesional de la sociedad española de quimioterapia. Tuberculosis. Abril 2015. [citado 2015-09-29], Disponible en: www.seq.es/seq/riyv/riv15.pdf

13.- Organización panamericana de la salud. Manual para el Diagnostico bacteriológico de tuberculosis. [citado 2015-09-29], Disponible en:

<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo%5B2%5D.pdf>

14.- Revised National TB Control Programme Training Manual for Mycobacterium tuberculosis Culture & Drug susceptibility testing . [citado 2015-09-29], Disponible en:

<http://tbcindia.nic.in/pdfs/Training%20manual%20M%20tuberculosis%20C%20DST.pdf>

15.- Juan Ruiz-Manzano, Rafael Blanquer, José Luis Calpe, José A. Caminero, Joan Caylà. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. Separ 2008. Elsevier.

[citado 2015-09-29], Disponible en:

http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13126836&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=6&ty=21&accion=L&origen=bronco&web=www.archbronconeumol.org&lan=es&fichero=6v44n10a13126836pdf001.pdf

16.- Global Tuberculosis Report 2014. World Health Organization.

17.- Supplement to the Global tuberculosis report 2014: Drug-resistant TB - surveillance & response. World Health Organization.

18.- Dres.Shou-Chien Chen, Kwo-Liang Chen, Kou-Huang Chen, Shun-Tien Chien, Kow-Tong Chen World J Pediatr 2013; 9 (1): 9-16. Actualización del diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. [citado 2015-09-29], Disponible en: <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=80306>

19.- RAMIREZ-LAPAUSA, M.; MENENDEZ-SALDANA, A. y NOGUERADO-ASENSIO, A.. Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. *Rev. esp. sanid. penit.* [online]. 2015, vol.17, n.1 [citado 2015-09-29], pp. 3-11 . Disponible en: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1575-06202015000100002&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1575-0620. <http://dx.doi.org/10.4321/S1575-06202015000100002>.

20.- SUPPLEMENTARTICLE Tuberculosis Diagnostics in 2015: Landscape, Priorities, Needs, and Prospects. Madhukar Pai and Marco Schito. . [citado 2015-09-29], Disponible en: http://jid.oxfordjournals.org/content/211/suppl_2/S21.full.pdf+html

21.- The new england journal of medicine Tuberculosis. Alimuddin Zumla, M.D., Ph.D., Mario Raviglione, M.D., Richard Hafner, M.D.,

and C. Fordham von Reyn, M.D. [citado 2015-09-29], Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMra1200894>

ANEXOS

Tuberculosis Diagnostics in 2015: Landscape,
Priorities, Needs, and Prospects

In 2015, tuberculosis remains a major global health problem, and drug-resistant tuberculosis is a growing threat. Although tuberculosis diagnosis in many countries is still reliant on older tools, new diagnostics are changing the landscape. Stimulated, in part, by the success and roll out of Xpert MTB/RIF, there is now considerable interest in new technologies. The landscape looks promising, with a robust pipeline of new tools, particularly molecular diagnostics, and well over 50 companies actively engaged in product development. However, new diagnostics are yet to reach scale, and there needs to be greater convergence between diagnostics development and development of shorter-duration tuberculosis drug regimens. Another concern is the relative absence of non-sputum-based diagnostics in the pipeline for children and of biomarker tests for triage, cure, and progression of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Several initiatives, described in this supplement, have been launched to further stimulate product development and policy, including assessment of needs and priorities, development of target product profiles, compilation of data on resistance-associated mutations, and assessment of market size and potential for new diagnostics. Advocacy is needed to increase funding for tuberculosis research and development, and governments in high-burden countries must invest more in tuberculosis control to meet post-2015 targets for care, control, and prevention.

Keywords. tuberculosis; diagnostics; pipeline; unmet needs; market potential.

While much progress has been made with tuberculosis control, the World Health Organization (WHO) estimates that 9 million people developed tuberculosis in

2013 and that 1.5 million died, including 360 000 people who were infected with human immunodeficiency virus (HIV; Figure 1) [1]. Rapid, accurate diagnosis is critical for timely initiation of antituberculosis treatment, but many people with tuberculosis (or tuberculosis symptoms) do not have access to adequate initial diagnosis. In 2013, >3 million cases were missed by the health system, either because they were not diagnosed or were not notified to national tuberculosis programs [1].

Access to adequate diagnosis is particularly poor for patients with multidrug-resistant (MDR) tuberculosis

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiu803

Correspondence: Madhukar Pai, MD, PhD, McGill Global Health Programs and McGill International TB Centre, Department of Epidemiology and Biostatistics, 1020 Pine Ave West, Montreal, QC H3A 1A2, Canada (madhukar.pai@mcgill.ca).

and in cases of childhood tuberculosis. Globally, in

2013, the WHO estimated that 480 000 people developed MDR tuberculosis [1]. However, only 136 000

MDR tuberculosis cases were detected, with second-line treatment initiated for 97 000. Also, in 2013, an estimated 535 000 children developed tuberculosis, but the true case burden of childhood tuberculosis is likely higher. A model-based estimate suggests that the number was closer to 1 million children in 2010 [2]. Childhood tuberculosis is very difficult to diagnose, and most conventional tuberculosis tests perform poorly in this high-risk population.

In 2014, the WHO and partners announced a post-

2015 tuberculosis strategy and accompanying targets with the goal of ending the global tuberculosis epidemic [3]. This ambitious strategy aims to reduce the tuberculosis incidence by 90% by 2035 (compared with the

2015 incidence). Early diagnosis of tuberculosis, including universal drug-susceptibility testing (DST), and systematic screening (active case finding) of contacts and high-risk groups are key components of this new strategy. Discovery, development, and rapid uptake of new



Figure 1. Status of the tuberculosis problem in 2014. The graphic is reproduced with permission from the World Health Organization (http://www.who.int/tb/features_archive/globaltb_report2014/en/).

tools, interventions, and strategies are also highlighted as important components [3].

LANDSCAPE AND PIPELINE OF TUBERCULOSIS DIAGNOSTIC TECHNOLOGIES

Although tuberculosis diagnosis in 2014 is still reliant on older tools such as smear microscopy and culture, new diagnostics are changing the tuberculosis diagnostics landscape. Worldwide, the

Stimulated, in part, by the success and roll out of Xpert MTB/RIF, there is now considerable interest in new tuberculosis diagnostics. The 2014 UNITAID TB Diagnostics Technology and Market Landscape report summarized the technologies that have been endorsed by the WHO and described the pipeline of novel tools that are on or likely to enter the market [6]. As described in the UNITAID report and summarized by stakeholders such as the Foundation for Innovative New Diagnostics, the landscape looks promising, with a robust pipeline of new tools and well over 50 companies actively engaged in product development. Figure 2 shows the pipeline of tools and the expected complexity of the products under development.

In the short term, the most impressive trend is the expansion of the range of molecular technologies that could potentially replace smear microscopy [6]. As shown in Figure 3, new molecular products on the market (or in the pipeline) will compete with the Xpert technology, and some may be deployable in peripheral microscopy centers, where millions of patients are tested. This level of decentralized deployment is feasible but challenging with the Xpert technology because of technical and infrastructure issues [7–10].

In addition to rapid case detection, newer molecular tools will have the capacity to identify drug-resistance mutations and thereby help countries reach the post-2015 target of universal DST for all patients with tuberculosis, at the time of detection. With the impending introduction of new tuberculosis drug regimens (described below), this is of great significance. New drug regimens will require companion diagnostics to ensure rapid completion of the so-called test and treat approach. While newer molecular diagnostics are ideally suited to serve the role of companion diagnostics to new drug regimens, a major hurdle is the lack of high-quality validation studies of

newer molecular tests. Several assays are now on the market with virtually no validation trials published on their accuracy

ongoing roll out of Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, California) continues to be the most important, measurable shift in the tuberculosis diagnostics landscape. According to the WHO, as of 30 September 2014, 3553 GeneXpert instruments (comprising >17 000 modules) and 8.8 million Xpert MTB/RIF cartridges had been procured by the public sector in 110 of 145 countries eligible for concessional pricing [4]. The Xpert technology is significantly more sensitive than sputum smear microscopy and can also rapidly detect rifampicin resistance with high accuracy [5].

and performance. This suggests the need for ensuring global and country-level systems for rapid validation of new tools, to ensure that such evidence is translated into policies.

In the medium term, the need for a biomarker-based, low-cost, non-sputum-based test remains an important priority for tuberculosis diagnostics at the primary care level, where the majority of people first seek care [6]. Although biomarker discovery is an active area and several potential products (eg, antigen or antibody detection tests, volatile organic compound analysis, and enzymatic detection) are under development, no test under development is likely to be on the market with policy endorsements within the next 3–5 years [11].

In the longer term, a breakthrough in biomarker discovery is necessary to identify those with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection who are at the highest risk of progressing to tuberculosis, so that the vast pool of latently infected individuals can be successfully reduced [6]. Since molecular tests are usually not helpful for treatment monitoring, a biomarker-based test

Global TB diagnostic pipeline

	Early Development	Late or Completed Development	On Pathway to WHO Evaluation
HIGH COMPLEXITY ASSAYS	Molecular Detection/DST		
	TruArray MDR-TB (Akkoni) COBAS TaqMan MTB + DST (Roche) Hydra 1K (insilixa) Mycobacterium Real-time MDR (CapitalBio)	TRC Rapid MTB (Tosoh) VereMTB (Veredus Laboratories) LIPA Pyrazinamide (Nipro) LATE-PCR Lights on / Lights off (Hain) TBMDx (Abbott) Meltpro (Zeesan) Mycobacteria RT PCR (CapitalBio) REBA MTB-XDR (YD Diagnostics) EasyNAT TB (Ustar) BD Max (BD)	GenoTYPE MTBDRsl (Hain) LIPA MDR-TB (Nipro) REBA MTB-Rifa (YD Diagnostics)
	Culture-based Technology		
	BNP Middlebrook (NanoLogix) Rapid colorimetric DST	TREK Sensitive MYCOTB (Trek)	
MODERATE COMPLEXITY ASSAYS	Molecular Detection/DST		
	Xpert Ultra and Xtend XDR (Cepheid) Alere Q (Alere) Enigma ML (Enigma Diagnostics) Q-POC (QuantuMDx) EOSCAPE (Wave80) RT-PCR Testing Platform (NWGHF/Guidel) iCubate 2.0 (iCubate) TBDx system (KGI) DiagCORE (STAT Diagnostica) LabChip G2-3 (Nanobiosys)	Genedrive MTB/RIF (Epistem) Truelab/Truenat MTB (Molbio)	TB LAMP (Eiken)
	Volatile Organic Compounds		
	BreathLink (Menssana) Prototype breathalyzer (Next Dimensions) TB Breathalyser (Rapid Biosensor Systems) Aeonose (The eNose Company) Breath analysis instrument (Metabolomx)	Giant African Pouch Rats (Apopo)	
	Automated Microscopy & Imaging		
TBDx (Applied Visual Sciences) Fluorescent microscopy (ID-FISH Tech.) Automatic TB Screener (Fluorobot)	Microimager (BD) CAD4TB (Delft Imaging Systems)		
LOW COMPLEXITY ASSAYS	Antigen & Antibody Detection		
	LAM in sputum (Standard Diagnostics) Multiplex antibody array (mBio)		Alere Determine TB-LAM in urine (Alere)
	Enzymatic Detection		
	β -lactamase reporter (Global BioDiagnostics)		

Source: FIND, Geneva

Figure 2. Current tuberculosis diagnostics pipeline listing the development phases and the types of technologies in development or evaluation. Complexity categorization was based on criteria that are used for similar diagnostics by the US Food and Drug Administration. Early development refers to prototype development after the proof-of-concept stage. Late-stage development refers to turning the prototype into a design-locked, manufacturable product. The graphic is reproduced with permission from the Foundation for Innovative New Diagnostics.

for cure will also be enormously helpful. The pipeline for such tests is currently weak, with few companies working on biomarker discovery to support research and development of such products. However, governmental and nongovernment organizations continue to fund the search for new biomarkers useful to meet the diagnostic, prognostic, and treatment monitoring needs.

NEEDS AND PRIORITIES

The ongoing roll out of Xpert MTB/RIF has had a positive influence on the tuberculosis diagnostics landscape, has attracted

new investments and product developers, and has created a robust pipeline of technologies [6]. It has also ploughed the way for wider access to molecular tests and universal DST and prepared the ground for the next wave of innovative technologies. Lessons learned from Xpert implementation will be invaluable for scaling up next-generation technologies [9, 10].

However, the Xpert technology was not designed to reach lower tiers of the healthcare system or to meet all needs (eg, it cannot detect latent *M. tuberculosis* infection or resistance against multiple drugs). Despite initiatives to reduce the price, high cost continues to be a hurdle for underfunded national tuberculosis programs [12]. A recent survey of 22 countries with a

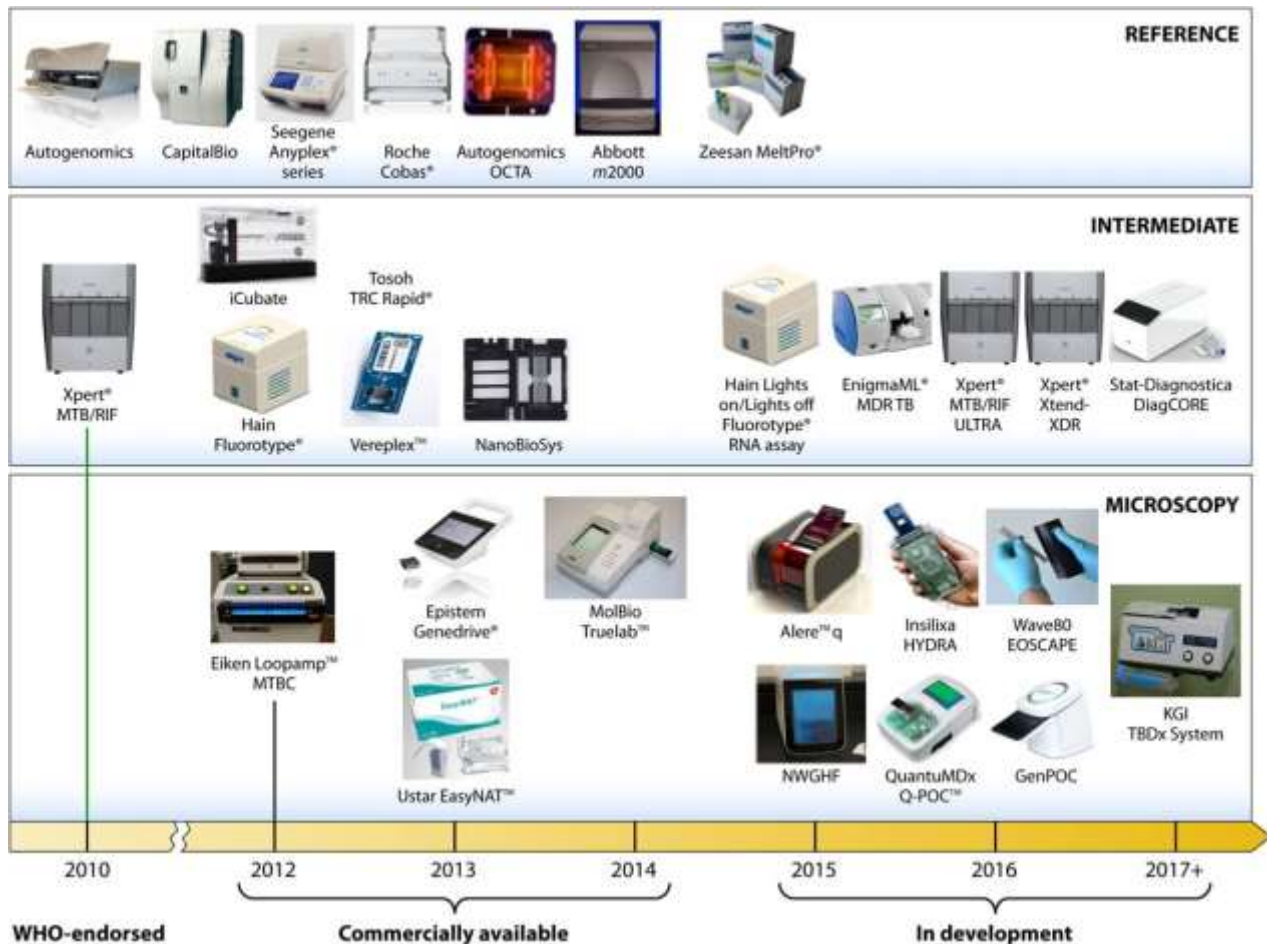


Figure 3. Pipeline of molecular diagnostics for tuberculosis, by level of deployment (ie, reference, intermediate, and peripheral microscopy laboratories). The graphic is reproduced with permission from the UNITAID (http://unitaid.org/images/marketdynamics/publications/UNITAID_TB_Diagnostics_Landscape_3rd-edition.pdf).

high tuberculosis burden (HBCs) showed that, while a majority (86%) of these countries have a policy or algorithm for use of Xpert technology, current implementation is mostly donor funded, largely dependent on testing in centralized laboratories, and primarily involves patients with presumed drug-resistance or HIV infection [13]. The survey used the ratio of smear volumes for initial diagnosis to the number of Xpert cartridges procured during a roughly similar period as an approximate index of Xpert market penetration in the public sector. The ratio in South Africa was 1.6, significantly lower than most other HBCs, where approximately 40–70 smears were performed for each Xpert cartridge [13]. This suggests that wide-scale implementation of Xpert technology has mostly occurred in South Africa, while other HBCs continue to rely heavily on smear microscopy.

A recent published study of various stakeholders helped establish the most important unmet needs and identify tools that are of highest importance. Kik et al conducted a priority-setting

exercise to identify the highest priority tests for target product profile (TPP) development and investment in research and development [14]. For each of the potential TPPs, 10 criteria were used to set priorities, including prioritization by key stakeholders (eg, managers of national tuberculosis programs), potential impact of the test on tuberculosis transmission, morbidity and mortality, market potential, and implementation and scalability of the test. On the basis of this analysis, the following were identified as the highest priorities: (1) a point-of-care sputum-based test as a replacement for smear microscopy (ie, a smear-replacement test); (2) a point-of-care, non-sputum-based test capable of detecting all forms of tuberculosis via the identification of characteristic biomarkers or biosignatures (ie, a non-sputum based biomarker test); (3) a point-of-care triage test, which should be a simple, low-cost test for use by first-contact healthcare providers as a test for ruling out tuberculosis (ie, a triage test); and (4) rapid DST at microscopy centers (ie, a rapid DST).

Given the variety of unmet needs [14] and the diversity of sites where testing can occur [15], it is important for product developers to have access to (1) a clearly identified list of diagnostics that are considered high priority by the tuberculosis community; (2) well-developed, detailed TPPs for priority diagnostics, based on a consensus-building process; and (3) up-to-date market size estimations for the priority TPPs [16, 17]. These issues are addressed in subsequent articles in this supplement. The article by Denkinger et al [18, 19] describes the final TPPs that have been developed for the highest priority tests and reviewed in a consensus meeting hosted by the WHO and partners, while the articles by Kik et al [20] and Pantoja et al [21] describe the potential future market for new assays and the affordability of new tests by countries, respectively.

ALIGNMENT OF DIAGNOSTICS WITH NOVEL TUBERCULOSIS TREATMENT REGIMENS

In a recent analysis, Wells et al outlined the need for a better alignment (or convergence) between new tuberculosis diagnostics with the likely tuberculosis treatment landscape in the next

3–4 years [22]. Because of promising results in phase 2 trials, the Global Alliance for TB Drug Development and partners have launched the Shortening Treatment by Advancing Novel Drugs trial of the PaMZ drug regimen, which contains pretomanid (previously called PA-824), moxifloxacin, and pyrazinamide. If the trial is successful, by 2018, this could reduce the duration of tuberculosis therapy to 4 months [23].

For the PaMZ regimen to be implemented successfully, it is important to ensure that existing molecular diagnostics are more widely used and to develop next-generation molecular assays that can detect resistance to markers that are aligned with novel regimens such as PaMZ. This means that product developers will need better data about the molecular mechanisms of resistance. Efforts are underway (described elsewhere in this supplement by Solomon et al [24]) to develop a database of mutations associated with drug resistance and to develop strain collections to enable assessment of new diagnostic assays.

There are other new drugs, such as bedaquiline and delamanid, that have already received partial regulatory approval for use in treating MDR tuberculosis [25]. Linezolid, although not approved for MDR tuberculosis, is already being used in the field [26]. Phenotypic resistance tests for these drugs have not been established, and careful monitoring needs to take place before critical concentrations are selected on the basis of clinical data. Even though these may be new drugs to treat tuberculosis, the mechanisms of action are either similar to those of existing drugs (as is the case between bedaquiline and clofazimine),

background resistance already exists (as in the case of linezolid), or they are in the same class of drugs (eg, nitroimidazoles). Thus, it will be important to monitor for drug resistance during treatment. This will be especially important for treatment of

extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis, since the number of effective drugs available is much smaller. With such limited choices, the likelihood of treating patients with XDR or pre-XDR tuberculosis with a suboptimal regimen becomes much higher. As a result, this also increases the chance of developing resistance to the remaining active drug(s), thus reducing the effectiveness of new compounds in our toolbox.

Also, as part of prelaunch activities, it is important for countries to establish sample collection and transport systems, laboratory information management systems, mechanisms for external quality assurance for molecular and DST tools, and information and communication technologies for rapid reporting of results, case notification and linkages to care, and supply chain and logistics management [27]. Greater use of existing tests (like Xpert technology, liquid cultures, and line probe assays) and drug regimens will enable national tuberculosis programs to develop and fine-tune these systems and then transition to newer drug regimens and companion diagnostics by 2018.

ONGOING EFFORTS TO IMPROVE CHILDHOOD TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

Although identifying tuberculosis cases continues to be a challenge in adults, active tuberculosis in several special populations, including pediatric patients, is more difficult to diagnose because of extrapulmonary involvement, paucibacillary aspects, or nonspecific presentation. In low-income and middle-income countries, difficulties arise owing to the similarity of symptoms to other common diseases, including bacterial pneumonia and viral infections, and to comorbid conditions, such as malnutrition. As a result, tuberculosis treatment is often performed empirically, which leads to underdiagnosis or, in some cases, to overdiagnosis and subsequent inappropriate prescription of drugs to patients without infection. Underdiagnosis leads to increased morbidity and mortality due to tuberculosis. Overdiagnosis results in higher treatment costs to tuberculosis programs and potentially contributes to the development of drug resistance due to poor adherence. This is further complicated by the fact that the time to symptom resolution in young children treated for tuberculosis requires >2 months in the majority of cases [28]. As a result, symptom-based diagnosis may not resolve when these patients are receiving tuberculosis treatment and may suggest MDR tuberculosis. Additional clinical evaluations would be needed to determine the etiology or whether to consider switching to a drug-resistant tuberculosis regimen.

Despite the need for better diagnostics, funding for pediatric diagnostics is woefully inadequate compared with that for adult

diagnostics, which itself continues to lag behind funding for HIV diagnostics. Unfortunately, diagnosis and treatment is not a priority for many funding organizations since pediatric

tuberculosis has a limited impact on disease at the population level. Therefore, control of tuberculosis in children is considered to be of limited programmatic value. The original directly observed treatment, short-course strategy was heavily focused on identifying infectious cases by use of sputum smears, and this led to national tuberculosis programs placing greater emphasis on adults.

Despite these challenges, interest in diagnosing and treating tuberculosis in children has gained momentum over the past few years. This includes standardizing case definitions of tuberculosis in children [29], developing and manufacturing first-line tuberculosis drugs in appropriate child-friendly formulations (through the Global Drug Facility), and inclusion of children in clinical trials [30]. This last point is significant because disease end points, pathogenesis, and drug metabolism is different in children and infants, compared with adults [30]. Several funding institutions have recently supported research initiatives to identify new biomarkers that could be used to diagnose tuberculosis in children. These biomarkers include a combination of biological measurements at the protein or genomic level that reflect an interaction between the host and the pathogen [31, 32].

As the results of these investments become available, a greater need will be placed on further evaluating potential biomarkers, using a set of well-characterized and highly pedigreed samples. Unfortunately, standard sets of samples from children exposed to and suspected of having tuberculosis are not widely available. Although many private collections exist, standardized definitions, collection, processing, and storage of samples have not been adopted. Consequently, evaluations of potential diagnostic biomarkers may be discrepant despite the use of existing pediatric samples. Moreover, additional challenges in documenting tuberculosis exposures with clinical symptoms consistent with infection and lack of funding have hampered current efforts to store these samples in biorepositories. In addition, low sample volumes typically obtained from children and infants prevent wide dissemination of material to large numbers of investigators. Finally, there is a need not only for well-defined samples from children with tuberculosis, but of samples from children in tuberculosis-endemic areas who have clinical signs consistent with tuberculosis but are free of the disease. This is most critical because the performance of a biomarker will need to be able to differentiate *M. tuberculosis* infection from a number of other conditions that typically present with similar clinical signs in tuberculosis-endemic areas.

Product developers need information on market size and potential, to make investment decisions [17]. A recent series of studies have tried to quantify the current served available market value of tuberculosis diagnostics. A survey of 22 HBCs showed that

MARKET FOR NEW TECHNOLOGIES

they performed 77.6 million sputum smears in >42 000 microscopy centers annually, with a cost of \$137 million [33]. Of these, 61% were performed in the BRICS countries. A detailed analysis of what Brazil spent on tuberculosis diagnosis showed that, during 2012, an estimated 2.4 million tuberculosis diagnostic tests were conducted, resulting in an estimated overall market value of \$17.2 million [34]. The public sector accounted for 91% of the test volume and 88% of the market value. Smear microscopy was the most commonly used test (1.3 million tests [55%]), with an estimated cost of \$3.7 million. A total of 302 761 cultures were performed, representing

13% of the test volume and 40% (\$6.9 million) of the market value. On average, \$208 was spent on tuberculosis diagnostics for every Brazilian patient with notified tuberculosis during 2012 [34].

Another analysis estimated the expenditure on tuberculosis diagnosis in South Africa during 2012–2013 [35]. This study showed that South Africa has a sizeable tuberculosis diagnostic market in terms of volume and value. In 2012, during Xpert scale-up, the public and private sectors performed 9.2 million tuberculosis diagnostic tests, with an estimated total cost of

\$98 million. The public sector accounted for 93% of the overall test volume and value, with microscopy and culture accounting for the majority of tests performed. In 2013, the public sector market value increased to \$101 million (a 10% increase over 2012). While Xpert volumes increased by 166%, total tuberculosis test volumes decreased by 12%, compared with 2012 values [35]. Similar analyses are being completed for China and India.

On the basis of these analyses, Kik et al [20] made projections about the potential available market for the 4 priority TPPs that have been developed. They found that, of the 4 TPPs, the greatest potential available market in terms of value would be for a sputum-based tuberculosis detection and DST upfront test. A test that can be deployed at lower levels of the healthcare system and used for detecting (or ruling out) all forms of tuberculosis, such as a biomarker test or a triage test, would have the largest potential market volume.

The publication of technology and market landscape reports, TPPs, and market size estimates are all intended to stimulate increased investments in the area of tuberculosis diagnostics. While the overall trend is positive (as seen in the number of products and companies), tuberculosis research and development as a whole continues to be severely underfunded.

A 2014 annual research and development funding report by Treatment Action Group, showed that the world invested only one third of the required \$2 billion needed every year for new

drugs, diagnostics, and vaccines to fight the global tuberculosis epidemic effectively [11]. In 2013, \$676.6 million was spent on tuberculosis research. Of the \$9.8 billion in funding required for tuberculosis research during 2011–2015, as estimated by The Global Plan to Stop TB, only 20% of this amount has been mustered at the end of 2013. The Treatment Action Group report registered a significant funding shortfall across every category of tuberculosis research: basic science, diagnostics, drugs, vaccines, and operational research. The report also showed that, during 2013, research and development spending by pharmaceutical companies for tuberculosis was among the lowest recorded levels. These funding trends have great consequences for biomarker and basic research work that is critically important for novel tuberculosis tests and biomarkers for childhood and extrapulmonary tuberculosis, markers for treatment monitoring, and markers for predicting progression from latent *M. tuberculosis* infection to tuberculosis. In addition to increasing funding for research and development, donors, governments, and private industry must find a way to increase funding for product evaluation. Otherwise, we may see a plethora of new tools with few data to support or refute their incorporation into policy.

CONCLUSIONS

In 2015, the tuberculosis diagnostics landscape looks promising, with a robust pipeline and several companies actively engaged. However, new diagnostics have yet to reach scale, and there needs to be greater alignment between diagnostics and novel tuberculosis drug regimens. While the pipeline is robust for molecular tools, the pipeline is less robust for other products, especially biomarker-based tests for cure, triage, and predicting progression of latent *M. tuberculosis* infection. Several initiatives, described in this supplement, are ongoing to stimulate product development and policy, including assessment of needs and priorities, development of TPPs, compilation of data on resistance-associated mutations, and assessment of market potential for new diagnostics. If these initiatives are complemented with increased advocacy for funding for tuberculosis research and development with greater engagement of countries in evaluation of new tools, and if governments in HBCs actively scale-up new diagnostics and drug regimens, it will help make the post-2015 vision of a tuberculosis-free world a reality.

Notes

Acknowledgments. We thank the World Health Organization, UN-
TAID, and the Foundation for Innovative New Diagnostics, for their per-
mission to reproduce graphics.

Financial support. This work was supported by the National Institute
of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Depart-
ment of Health and Human Services (contract HHSN272200800014C to
M. S.).

Potential conflict of interest. M. P. serves as a consultant to the Bill and Melinda Gates Foundation, on the scientific advisory committee of the Foundation for Innovative New Diagnostics, and has received grant funding from BMGF (OPP1061487) to develop target product profiles for new tuberculosis diagnostics and to conduct market analyses around existing and new tuberculosis diagnostics. M. S. certifies no potential conflicts of interest.

Both authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Geneva: WHO, 2014:1–289.
2. Dodd PJ, Gardiner E, Coghlan R, Seddon JA. Burden of childhood tuberculosis in 22 high-burden countries: a mathematical modelling study. *Lancet Global Health* 2014; 2:e453–9.
3. World Health Organization. The End TB Strategy. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Geneva: World Health Organization, 2014. http://www.who.int/tb/post2015_TBstrategy.pdf?ua=1. Accessed 29 October 2014.
4. World Health Organization. WHO monitoring of Xpert MTB/RIF roll-out. <http://www.who.int/tb/laboratory/mtbrifrollout/en/index.html>. Accessed 23 October 2014.
5. Steingart K, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme C, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; CD009593.
6. UNITAID. Tuberculosis: diagnostics technology and market landscape. 3rd ed. Geneva: WHO, 2014:1–42.
7. Denkinger CM, Kik SV, Pai M. Robust, reliable and resilient: designing molecular tuberculosis tests for microscopy centers in developing countries. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13:763–7.
8. Denkinger CM, Nicolau I, Ramsay A, Chedore P, Pai M. Are peripheral microscopy centres ready for next generation molecular tuberculosis diagnostics? *Eur Respir J* 2013; 42:544–7.
9. Creswell J, Codlin AJ, Andre E, et al. Results from early programmatic implementation of Xpert MTB/RIF testing in nine countries. *BMC Infect Dis* 2014; 14:2.
10. Raizada N, Sachdeva KS, Sreenivas A, et al. Feasibility of decentralised deployment of Xpert MTB/RIF test at lower level of health system in India. *PLoS One* 2014; 9:e89301.
11. Treatment Action Group & Stop TB Partnership. 2014 Report on tuberculosis research funding: 2005–2013. New York: Treatment Action Group, 2014.
12. Pantoja A, Fitzpatrick C, Vassall A, Weyer K, Floyd K. Xpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis: a cost and affordability analysis. *Eur Respir J* 2013; 42:708–20.
13. Qin ZZ, Pai M, Van Gemert W, Sahu S, Ghiasi M, Creswell J. *Eur Respir J* 2014; pii:erj01477-2014.
14. Kik SV, Denkinger CM, Casenghi M, Vadnais C, Pai M. Tuberculosis diagnostics: which target product profiles should be prioritised? *Eur Respir J* 2014; 44:537–40.
15. Pai NP, Vadnais C, Denkinger C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med* 2012; 9:e1001306.
16. Pai M. Tuberculosis diagnostics: test developers' FAQs. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17:570–1.
17. Pai M. Diagnostics for tuberculosis: what test developers want to know. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13:1–4.
18. Denkinger CM, Kik SV, Cirillo DM, et al. Defining the needs for next generation assays for tuberculosis. *J Infect Dis* 2015; 211(Suppl 2):S29–38.
19. Denkinger CM, Dolinger D, Schito M, et al. Target Product Profile of a Molecular Drug-Susceptibility Test for Use in Microscopy Centers. *J Infect Dis* 2015; 211(Suppl 2):S39–49.
20. Kik SV, Denkinger CM, Jefferson C, Ginnard J, Pai M. Potential market for novel tuberculosis diagnostics: worth the investment? *J Infect Dis* 2015; 211(Suppl 2):S58–66.

21. Pantoja A, Kik SV, Denkinger CM. Costs of novel tuberculosis diagnostics – will countries be able to afford it? *J Infect Dis* 2015; 211(Suppl 2):S67–77.
22. Wells WA, Boehme CC, Cobelens FG, et al. Alignment of new tuberculosis drug regimens and drug susceptibility testing: a framework for action. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:449–58.
23. Diacon AH, Dawson R, von Groote-Bidlingmaier F, et al. 14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial. *Lancet* 2012; 380:986–93.
24. Salamon H, Yamaguchi KD, Cirillo DM, et al. Integration of published information into a resistance-associated mutation database for mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 2015; 211(Suppl 2):S50–7.
25. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:388–404.
26. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. First linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1534–6.
27. Denkinger CM, Grenier J, Stratis AK, Akkihal A, Pant-Pai N, Pai M. Mobile health to improve tuberculosis care and control: a call worth making. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17:719–27.
28. Mpfu N, Moyo S, Mulenga H, et al. Time to Symptom Resolution in Young Children Treated for Pulmonary Tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33:1226–30.

29. Graham SM, Ahmed T, Amanullah F, et al. Evaluation of tuberculosis diagnostics in children: 1. Proposed clinical case definitions for classification of intrathoracic tuberculosis disease. Consensus from an expert panel. *J Infect Dis* 2012; 205(suppl 2):S199–208.
30. Seddon JA, Hesselting AC, Marais BJ, et al. Paediatric use of second-line anti-tuberculosis agents: a review. *Tuberculosis (Edinb)* 2012; 92:9–17.
31. Xu D, Li Y, Li X, et al. Serum protein S9, SOD3 and MMP9 as new diagnostic biomarkers for pulmonary tuberculosis by iTRAQ-coupled two-dimensional LC-MS/MS. *Proteomics* 2014; doi:10.1002/pmic.201400366.
32. Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, et al. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N Engl J Med* 2014; 370:1712–23.
33. Kik SV, Denkinger CM, Chedore P, Pai M. Replacing smear microscopy for the diagnosis of tuberculosis: what is the market potential? *Eur Respir J* 2014; 43:1793–6.
34. TB Diagnostics Market Analysis Consortium. Market assessment of tuberculosis diagnostics in Brazil in 2012. *PLoS One* 2014; 9:e104105.
35. TB Diagnostics Market Analysis Consortium. Market assessment of tuberculosis diagnostics in South Africa in 2012–2013. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19:216–22.

review article

current concepts

Tuberculosis

Alimuddin Zumla, M.D., Ph.D., Mario Raviglione, M.D., Richard Hafner, M.D., and C. Fordham von Reyn, M.D.

Despite the availability of a cheap and effective treatment, tuberculosis still accounts for millions of cases of active disease and deaths worldwide. The disease disproportionately affects the poorest persons in

both high-income and developing countries.¹ However, recent advances in diagnosis-

tics, drugs, and vaccines and enhanced implementation of existing interventions have increased the prospects for improved clinical care and global tuberculosis control.

Epidemiology

In 2011, there were 8.7 million new cases of active tuberculosis worldwide (13%

of which involved coinfection with the human immunodeficiency virus [HIV]) and

1.4 million deaths, including 430,000 deaths among HIV-infected patients¹ representing a slight decrease from peak numbers in the mid-2000s (Fig.

1). It has been estimated that there were 310,000 incident cases of multidrug-resistant tuberculosis, caused by organisms resistant to at least isoniazid and rifampin, among patients who were reported to have tuberculosis in 2011 (Fig. 2). More than 60% of these patients were in China, India, the Russian Federation, Pakistan, and South Africa.^{1,2}

A total of 84 countries have reported cases of extensively drug-resistant tuberculosis, a subset of multidrug-resistant tuberculosis with added resistance to all fluoroquinolones plus any of the three injectable antituberculosis drugs, kanamycin, amikacin,

and capreomycin.¹⁻³ Sub-Saharan Africa has the highest rates of active tuberculosis per capita, driven primarily by the HIV epidemic.¹ The absolute number of cases is highest in Asia, with India and China having the greatest burden of disease globally.¹ In the United States and most Western European countries, the majority of cases occur in foreign-born residents and recent immigrants from countries in which tuberculosis is endemic.⁴⁻⁶

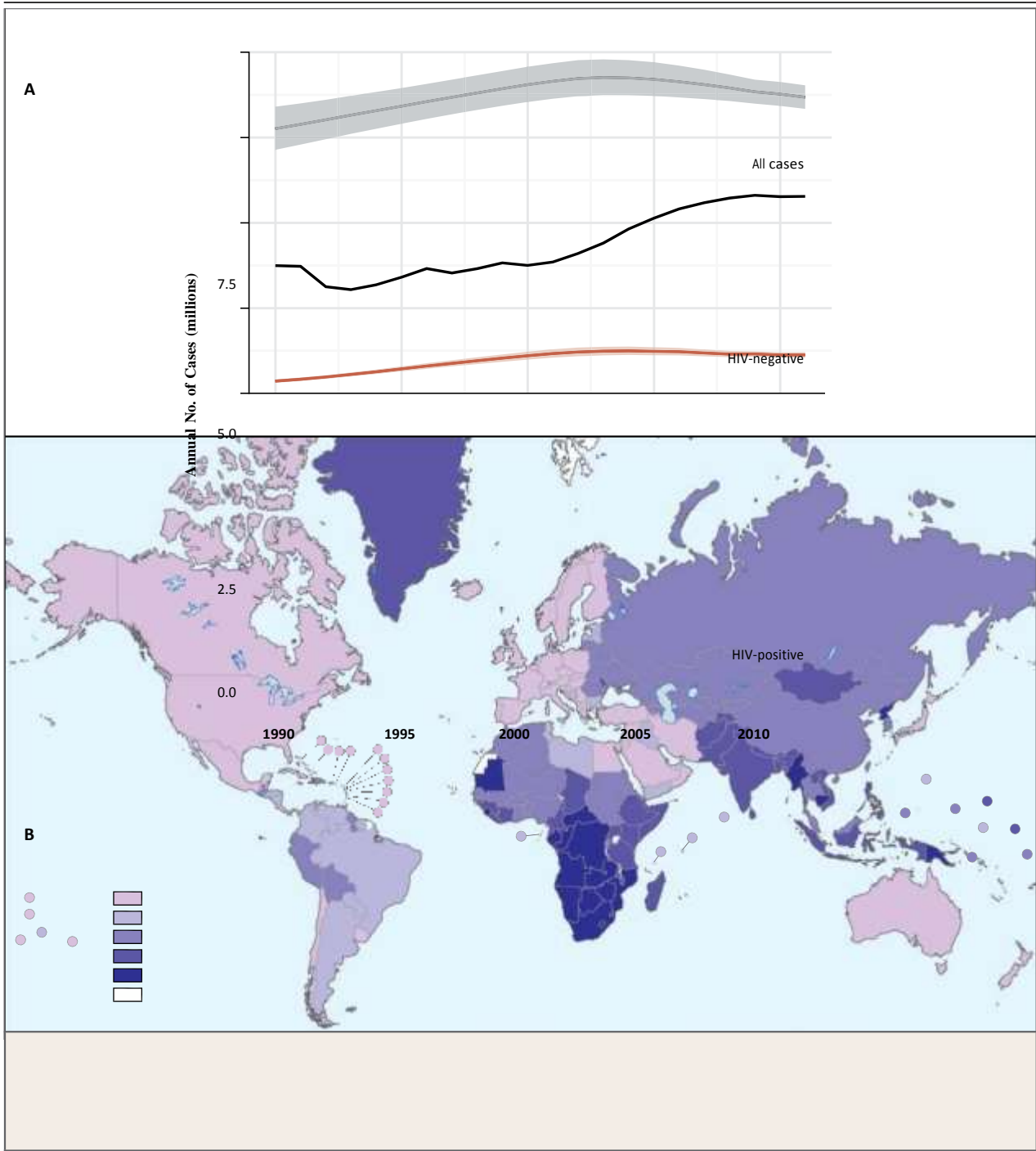
Pathogenesis

Patients with active pulmonary tuberculosis are the source of *Mycobacterium tuberculosis*. In more than 90% of persons infected with *M. tuberculosis*, the pathogen is contained as asymptomatic latent infection. Recent studies raise the possibility that some persons acquire and eliminate acute infection with *M. tuberculosis*.⁷ The risk of active disease is estimated to be approximately 5% in the 18 months after initial infection and then approximately 5% for the remaining lifetime.⁸ An estimated 2 billion persons worldwide have latent infection and are at risk for reactivation.¹ Contained latent infection reduces the risk of reinfection on repeated exposure, whereas active tuberculosis is associated with an increased risk of a second episode of tuberculosis on reexposure (Fig. S1 in the Supplementary Appendix, available with the full text of this article at NEJM.org).⁸⁻¹⁰

From the Department of Infection, Division of Infection and Immunity, University College London Medical School, London (A.Z.); STOP TB Department, World Health Organization, Geneva (M.R.); the Tuberculosis Clinical Research Branch, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD (R.H.); and the Section of Infectious Disease and International Health, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, NH (C.F.R.). Address reprint requests to Dr. Zumla at the Division of Infection and Immunity, Centre for Clinical Microbiology, 2nd Fl., UCL Royal Free Campus, Rowland Hill St., London NW3 0PE, United Kingdom, or at a.zumla@ucl.ac.uk.

N Engl J Med 2013;368:745-55.
DOI: 10.1056/NEJMra1200894

Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society.



**Estimated New Cases
(all forms) per 100,000
Population**

0–24

25–49

50–149

150–299

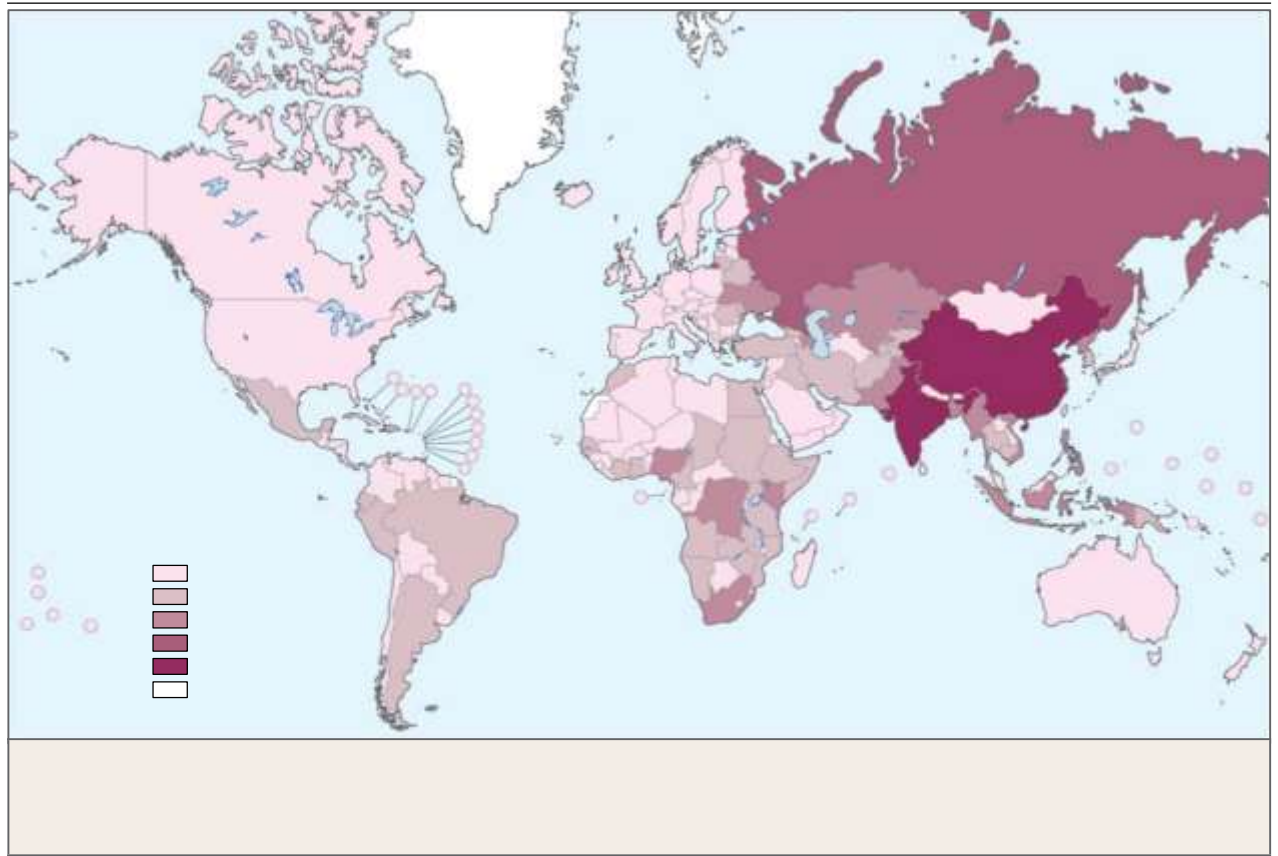
≥300

Data not shown

Figure 1. Global Incidence of Tuberculosis.

Panel A shows global trends in the estimated incidence of tuberculosis from 1990 through 2011 among all patients, those with human immunodeficiency virus (HIV) coinfection, and without HIV coinfection. The shading around the data curves indicates uncertainty intervals on the basis of available data. Panel B shows the estimated global incidence of tuberculosis in 2011.

Drug-resistant strains of *M. tuberculosis* arise from spontaneous mutations at a predictable low frequency. Selection pressure that is caused by misuse of antituberculosis drugs, such as monotherapy or the addition of single drugs to failing regimens, results in the emergence of resistant mutants (acquired resistance). Transmission of such resistant strains to another person may result in infection and eventually disease (primary resistance). Outbreaks of highly fatal drug-resistant infection have been documented in several settings, especially those in which the prevalence of HIV infection is high.¹¹⁻¹³ Recent reports describing totally drug-resistant tuberculosis require confirmation.^{14,15} The failure to detect drug resistance results in the pre-



MDR-TB Cases

0–299

300–2999

3000–29,999

30,000–59,999

≥60,000

Data not shown

Figure 2. Global Numbers of Cases of Multidrug-Resistant Tuberculosis.

Shown are the estimated numbers of cases of multidrug-resistant disease (including extensively drug-resistant disease) among cases of pulmonary tuberculosis that were officially reported in 2011.

scription of inappropriate regimens, treatment failure, increased mortality, and further transmission of drug-resistant tuberculosis.¹⁶

Clinical Features

The classic clinical features of pulmonary tuberculosis include chronic cough, sputum production, appetite loss, weight loss, fever, night sweats, and hemoptysis.¹⁷ Extrapulmonary tuberculosis occurs in 10 to 42% of patients, depending on race or ethnic background, age, presence or absence of underlying disease, genotype of the *M. tuberculosis* strain, and immune status.¹⁸ Extrapulmonary tuberculosis can affect any organ in the body, has varied and protean clinical manifestations, and therefore requires a high index of clinical suspicion.

HIV coinfection poses special challenges to clinical management in patients with active tuberculosis. The risk of active tuberculosis increases soon after infection with HIV,¹⁹ and the manifestations of pulmonary tuberculosis at this stage are similar to those in HIV-negative persons. At CD4 counts of less than 200 per cubic

millimeter, the presentation of tuberculosis may be atypical, with subtle infiltrates, pleural effusions, hilar lymphadenopathy, and other forms of extrapulmonary tuberculosis in as many as 50% of patients. At CD4 counts of less than 75 per cubic millimeter, pulmonary findings may be absent, and disseminated tuberculosis, manifested as a nonspecific, chronic febrile illness with widespread organ involvement and mycobacteremia, is more frequent, with high early mortality; polyclonal disease has also been described.²⁰ Such cases may be mistakenly diagnosed as other infectious diseases and are often identified only on autopsy.²¹

Asymptomatic, subclinical tuberculosis, with negative findings on a sputum smear and chest radiography and positive culture results, is a common feature of HIV-associated tuberculosis and may account for 10% of cases in regions in which tuberculosis is endemic.^{17,22,23} Up to 25% of patients presenting for HIV care in such regions have undiagnosed active tuberculosis.¹

Therefore, screening for tuberculosis is recommended for all patients with HIV infection to identify patients with active disease and before

instituting isoniazid preventive therapy in the remainder. The presence of any one of four symptoms (cough, fever, night sweats, or weight loss) has been shown to have sensitivity in the range of 80% for identifying patients in whom further diagnostic evaluation is warranted, even in resource-constrained regions.²⁴ Proactive screening for tuberculosis is recommended in areas where the disease is highly endemic, since subclinical tuberculosis in patients with HIV infection or noncommunicable diseases (e.g., diabetes mellitus and tobacco-related chronic lung disease) may otherwise be missed.^{24,25}

Diagnosis

Latent Infection

Screening and treatment for latent *M. tuberculosis* infection are indicated for groups in which the prevalence of latent infection is high (e.g., foreign-born persons from regions in which tuberculosis is endemic), those in whom the risk of reactivated disease is high (e.g., patients with HIV infection or diabetes and patients receiving immunosuppressive therapy), and those with both factors (e.g., recent contacts of patients with tuberculosis).^{26,27} Latent infection can be diagnosed with either a tuberculin skin test (Fig. S2 in the Supplementary Appendix) or an interferon-gamma release assay. Specific guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention in the United States,²⁸ the National Institute for Health and Clinical Excellence in the United Kingdom,²⁹ and the European Centre for Disease Prevention and Control³⁰ recommend the use of the interferon-gamma release assay and tuberculin skin test for screening for latent *M. tuberculosis* infection in various age and risk groups. The tuberculin skin test is less expensive and is therefore preferred in low-income regions. It

is as sensitive as the interferon-gamma release assay but less specific.³¹

Active Tuberculosis

Sputum microscopy and culture in liquid medium with subsequent drug-susceptibility testing are currently recommended as standard methods for diagnosing active tuberculosis. The use of solid culture medium is more cost-effective in resource-poor countries. Interferon-gamma release assays and tuberculin skin tests have no role in the diagnosis of active disease.²⁸⁻³³ Nucleic acid amplification tests, imaging, and histopathological examination of biopsy samples supplement these

evaluations. In resource-constrained settings with a high prevalence of tuberculosis and HIV infection, an estimated 30% of all patients with tuberculosis and more than 90% of those with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis do not receive a diagnosis.¹⁻³

A new molecular diagnostic test called Xpert MTB/RIF assay detects *M. tuberculosis* complex within 2 hours, with an assay sensitivity that is much higher than that of smear microscopy.³⁴ In HIV-infected patients, the test has a rate of case detection that is increased by 45%, as compared with smear microscopy.³⁵ This molecular assay has the potential to improve the performance of national tuberculosis programs and is currently being implemented in district-level laboratories in 67 countries with a high prevalence of tuberculosis.¹ It is available in Europe and is being examined for approval in the United States.

Drug-Resistant Tuberculosis

The current standard for first-line drug-susceptibility testing is an automated liquid culture system, which requires 4 to 13 days for results. Commercial molecular line-probe assays can yield results in 24 hours, once they have been validated against automated liquid culture.³⁶⁻³⁸

Within 2 hours, the Xpert MTB/RIF assay concurrently gives results on rifampin resistance, a proxy of multidrug-resistant tuberculosis in settings in which there is a high prevalence

of drug resistance, since rifampin resistance in the absence of isoniazid resistance is uncommon. Assay modifications have been introduced to reduce false positive results with respect to rifampin resistance.³⁹ The World Health Organization (WHO) recommends that standard drug-susceptibility testing be performed at the same time that the Xpert MTB/RIF assay is performed to confirm rifampin resistance and the susceptibility of the *M. tuberculosis* isolate to other drugs.⁴⁰ Other screening tests for drug resistance include the microscopic-observation drug-susceptibility (MODS) assay, the nitrate reductase assay, and colorimetric reductase methods. The MODS assay simultaneously detects *M. tuberculosis* bacilli, on the basis of cording formation, and isoniazid and rifampin resistance.⁴¹ Since most of these methods are not currently available in countries in which tuberculosis is highly endemic, it is estimated that only

10% of cases of multidrug-resistant tuberculosis are currently diagnosed worldwide and only half of them receive appropriate treatment.¹⁻³

Table 1. Current Recommendations for Tuberculosis Treatment.

Type of Infection	Recommended Regimen	Comments
Active disease		
Newly diagnosed cases that are not to multidrug-resistant	Isoniazid, rifampin, ethambutol, and pyrazinamide for 2 mo (intensive phase), followed by isoniazid and rifampin for	Pyridoxine supplementation recommended to prevent isoniazid-induced neuropathy
Multidrug-resistant disease	Four second-line antituberculosis drugs (as well as pyrazinamide), including fluoroquinolone, a parenteral agent, ethionamide or prothionamide, and either cycloserine or para-aminosalicylic	Initial treatment based on local disease patterns and pending drug-susceptibility results; a later-generation fluoroquinolone (e.g., moxifloxacin or levofloxacin) preferred
Latent infection	Isoniazid at a dose of 300 mg daily for at least 6 mo and preferably for 9 mo	Recommended for 9 mo or more in HIV-infected persons; daily administration for 6 mo also an option but with lower efficacy; extension to 36 mo further reduces risk among HIV-positive patients in regions in which tuberculosis is
	Isoniazid at a dose of 900 mg plus rifapentine at a dose of 900 mg weekly for 3 mo (directly observed therapy)	Studied with directly observed therapy in predominantly HIV-uninfected persons; higher completion rates and equal efficacy, as compared with isoniazid for 9 mo
	Rifampin at a dose of 600 mg daily for 4 mo	Shown to be effective in persons with silicosis
	Isoniazid at a dose of 300 mg plus rifampin at a dose of 600 mg daily for 3 mo	Effective alternative for HIV-infected persons
	Isoniazid at a dose of 900 mg plus rifampin at a dose of 600 mg twice weekly for 3 mo	Another effective alternative for HIV-infected persons

Treatment

Latent Infection

Persons with latent *M. tuberculosis* infection who are at increased risk for active tuberculosis require preventive treatment.^{28,42} The preferred regimen is isoniazid alone for 9 months or for a longer duration in HIV-infected persons in areas with a high prevalence of tuberculosis.^{43,44} Recently, directly observed weekly administration of isoniazid and rifapentine for 12 weeks has been shown to be as effective as isoniazid alone in adults without HIV infection in countries with a low burden of tuberculosis. This regimen was associated with fewer serious adverse events than

9 months of isoniazid alone, although treatment discontinuation because of an adverse event was more common (Table 1).⁴⁵

The trial is continuing to assess safety and effectiveness in children and HIV-infected persons.

Current WHO guidelines⁴⁴ recommend that all

HIV-infected persons with positive or unknown results on the tuberculin skin test and without active tuberculosis who are living in resource-

constrained, high-burden countries receive preventive therapy with isoniazid for at least 6 months. Three regimens are effective for the prevention of active tuberculosis in HIV-infected persons: daily isoniazid for 6 to 9 months, daily rifampin and isoniazid for 3 months, and rifampin and isoniazid twice weekly for 3 months.^{43,44} Rifampin-containing regimens have higher rates of drug toxicity than those that do not include rifampin.⁴⁴⁻⁴⁶ The

difficulty of diagnosing active tuberculosis in patients with HIV coinfection accounts in part for the slow adoption of isoniazid preventive therapy in clinical practice. Only patients with a positive tuberculin skin test who are receiving preventive therapy with isoniazid have decreased rates of active tuberculosis and death,⁴⁶ and protection against tuberculosis wanes within a few months after cessation of isoniazid therapy. A trial in Botswana recently showed that 36 months of preventive therapy with isoniazid, as compared with 6 months of therapy, reduced the subsequent rate of tuberculosis by 43%.⁴⁷ However, compliance with such a long-term regimen may be poor.⁴⁴ A daily regimen of rifapentine

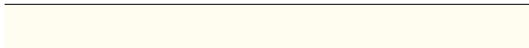


Table 2. Status of Selected Trials of Tuberculosis Treatments.*

Trial or Investigational Drug	Description	Comments
Treatment of drug-sensitive active disease		
REMOx	Standard 6-mo regimen vs. two 4-mo regimens including moxifloxacin	Results in 2014 have potential to shorten standard therapy to 4 mo
OFLOTUB III	Standard 6-mo regimen vs. 4-mo regimen including gatifloxacin	Results by mid-2013 have potential to shorten standard therapy to 4 mo
RIFAQUIN	Two experimental groups in which moxifloxacin is substituted for ethambutol for 2 mo, followed by moxifloxacin plus rifapentine twice weekly for 2 mo or moxifloxacin plus rifapentine weekly for 4 mo	Results expected by mid-2013
Multiple trials	Increased doses of rifampin and rifapentine	Higher doses of rifamycins may permit shorter regimens with standard drugs
Treatment of drug-resistant active disease		
Bedaquiline (TMC207)	Background therapy for multidrug-resistant disease plus bedaquiline	Mycobacterial ATP synthase inhibitor shown to improve sputum conversion at 8 wk; also to be studied in new regimens for drug-sensitive tuberculosis
Delamanid (OPC-67683)	Background therapy for multidrug-resistant disease plus delamanid	A nitroimidazole with activity against replicating bacilli through inhibition of mycolic acid synthesis; active against nonreplicating bacilli through generation of reactive nitrogen intermediates; shown to improve sputum-culture conversion at 8 wk
PA-824	PA-824 combined with moxifloxacin and pyrazinamide is being studied in a phase 2b trial (8 wk) for treatment of drug-sensitive and drug-resistant disease	A nitroimidazole with the same mechanism of action as delamanid; when combined with moxifloxacin and pyrazinamide, has high bactericidal activity at 14 days, suggesting promise for treatment of sensitive and resistant disease
Linezolid	Background therapy plus linezolid added immediately or 2 mo later in patients with extensively drug-resistant disease	A marketed oxazolidinone that improved sputum-culture conversion at 4 mo in a group receiving immediate versus delayed linezolid; for both linezolid regimens, 89% of patients had sputum-culture conversion on solid medium by 6 mo; high rate of peripheral neuropathy, including some cases of optic neuropathy
Sutezolid	Dose-ranging phase 2a trial completed	Analogue of linezolid that may have improved activity

AZD 5847	Phase 2a trial under way	More highly modified oxazolidinone
SQ109	Phase 2a trial completed; phase 2b combination trials to begin early in 2013	An ethylenediamine-based compound that is structurally related to ethambutol but has an entirely different mechanism of action

<p>Empirical therapy provided within 2 wk after start of antiretroviral therapy in patients with CD4+ cell count of <50/mm³ and body-mass index of <18.5</p>	<p>Designed to reduce mortality from undiagnosed tuberculosis in HIV-infected patients</p>
<p>Empirical therapy provided within 7 days after start of antiretroviral therapy in patients with CD4+ cell count of <50/mm³</p>	<p>Designed to reduce mortality from undiagnosed tuberculosis in HIV-infected patients</p>
<p>Prevention of active disease in patients with latent infection</p>	
<p>Daily rifapentine plus isoniazid for 4 wk vs. daily isoniazid for 9 mo</p>	<p>Designed to determine whether shorter treatment is effective in HIV-positive patients</p>

* A full listing of all trial references or clinical trial numbers is provided in the Supplementary Appendix at NEJM.org. ACTG 5279 denotes Ultra-Short-Course Rifapentine/Isoniazid for the Prevention of Active Tuberculosis in HIV-Infected Individuals with Latent Tuberculosis Infection, OFLOTUB Randomized, Open-Label, Controlled Trial of a 4-Month Gatifloxacin-Containing Regimen versus Standard Regimen for the treatment of Adult Patients with Pulmonary Tuberculosis, PROMPT Prevention of Early Mortality by Presumptive Tuberculosis Treatment, REMEMBER Reducing Early Mortality and Morbidity by Empiric Tuberculosis Treatment, REMox Rapid Evaluation of Moxifloxacin in Tuberculosis, and RIFAQUIN International Multicenter Trial to Evaluate High-Dose Rifapentine and a Quinolone in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis.

and isoniazid for 1 month is also being studied (Table 2). Studies have been suggested to investigate targeted use of preventive therapy with isoniazid on a continuous or recurring basis in persons with HIV infection who have a positive tuberculin skin test.⁴⁸

Drug-Sensitive Active Tuberculosis

Effective tuberculosis treatment requires accurate and early diagnosis, screening for drug resistance and HIV, the administration of effective regimens under supervision, and the provision of support to patients for compliance throughout the course of treatment. The current standard four-drug treatment regimen of first-line drugs (isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and ethambutol) achieves cure rates of more than 95% in trial conditions and more than 90% in treatment under the oversight of tuberculosis-control programs.^{1,49} Treatment requires a minimum of 6 months in two phases: 2 months of all four drugs in the intensive phase and 4 months of isoniazid and rifampin in the continuation stage (Table 1). Risk factors for relapse include cavitation, extensive disease, immunosuppression, and a sputum culture that remains positive at 8 weeks. If any of these risk factors is present, therapy may be extended for up to 9 months. Challenges with current therapy include inconsistent drug quality, the need to ensure that drug administration is directly observed and that other support is provided to patients, treatment interruptions and changes in regimen because of side effects, toxic effects, pharmacokinetic interactions (particularly with antiretroviral therapy in patients with HIV coinfection),⁵⁰ and compliance issues owing to the lengthy treatment period. Several trials in progress are adding or substituting fluoroquinolones or testing higher doses of rifamycins in

an attempt to shorten standard therapy to 4 months (Table 2).

Tuberculosis and HIV Coinfection

Tuberculosis leads to an increase in HIV replication and accelerates progression of HIV infection, with attendant high mortality. Early initiation of antiretroviral therapy results in a reduction in mortality; among patients with tuberculosis who do not receive antiretroviral therapy, those with very low numbers of CD4+ cells have a high short-term risk of death.⁵⁰⁻⁵² WHO recommends that antiretroviral therapy be started within the

first 8 weeks after the initiation of tuberculosis treatment and that patients with a CD4+ cell count of less than 50 per cubic millimeter receive antiretroviral therapy within the first 2 weeks.⁴²

One exception is patients with tuberculous meningitis, in whom the early initiation of antiretroviral therapy does not improve outcomes and results in an increased risk of adverse events.⁴²

The immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) occurs in at least 10% of HIV-infected patients who start antiretroviral therapy during tuberculosis treatment. These cases of IRIS include both new cases of active tuberculosis detected after the initiation of antiretroviral therapy (called unmasking IRIS) and clinical worsening during tuberculosis treatment after the initiation of antiretroviral therapy (called paradoxical IRIS).⁵³ The most common manifestations of IRIS are new-onset or worsening respiratory symptoms and increased lymphadenopathy. IRIS is more common in patients who have a reduced number of CD4+ cells and those in whom antiretroviral therapy was initiated early in the course of tuberculosis treatment, with rates approaching 50% among patients with a CD4+ cell count of less than 50 per cubic millimeter who started to receive antiretroviral therapy within 4 weeks after the start of tuberculosis treatment.⁵³ For antiretroviral therapy in patients with active tuberculosis, regimens with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors are preferred, and efavirenz is the drug of first choice.⁵⁴

The use of rifampin significantly reduces serum concentrations of protease inhibitors.⁵⁵

Studies of the substitution of rifabutin for rifampin and increased doses of boosted protease inhibitors to avoid this reduction are under way.⁵⁵

Patients with HIV-associated tuberculosis should also receive prophylaxis with trimethoprim-sulfamethoxazole. In two clinical trials — the Prevention of Early Mortality by Presumptive Tuberculosis Treatment (PROMPT) study⁵⁶ and the Reducing Early Mortality and Morbidity by Empiric Tuberculosis Treatment (REMEMBER) study⁵⁷ — investigators are evaluating the use of early empirical tuberculosis therapy to reduce the high rate of death among patients living in tuberculosis-endemic countries who have a CD4+ cell count of less than 50 per cubic millimeter

but who do not have probable or confirmed tuberculosis (Table 2).

Multidrug-Resistant Tuberculosis

The treatment of multidrug-resistant tuberculosis is based on expert opinion and requires the creation of combination drug regimens chosen from five hierarchical groups of first-line and second-line drugs^{58,59} (Table S1 in the Supplementary Appendix). Such therapy is associated with a high risk of intolerance and serious toxic effects. Regimens may be chosen on a standardized or empirical basis and then switched to individualized therapy after data regarding drug-susceptibility testing become available. However, reliable drug-susceptibility testing is not widely available in regions in which tuberculosis is endemic, particularly for second-line drugs. WHO treatment guidelines for multidrug-resistant tuberculosis recommend that the intensive phase of therapy be administered for at least 8 months.^{58,59}

A fluoroquinolone and an injectable agent should routinely be included to provide a regimen with at least four second-line drugs that will have certain or nearly certain effectiveness, as well as pyrazinamide.

Such therapy should be administered for at least 20 months in patients who have not received previous

treatment for multidrug-resistant tuberculosis and for up to 30 months in those who have received previous treatment. An observational study showed that a shorter regimen, with treatment given for 9 to 12 months (the so-called Bangladesh regimen), had acceptable efficacy with fewer adverse reactions⁶⁰ in a population with no previous exposure to second-line drugs. This regimen is being more widely evaluated in the ongoing Standardized Treatment Regimen of Antituberculosis Drugs for Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis (STREAM) trial.⁶¹ Since most of the recommended drugs have serious side effects that render treatment particularly difficult, expert consultation is always advised for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis (Table S2 in the Supplementary Appendix).

Extensively drug-resistant tuberculosis is extremely difficult to diagnose and treat in countries in which the disease is endemic. The condition has been associated with death rates as high

as 98% among HIV-infected persons.^{12,13,62,63}

Several new drugs with activity against multi-drug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis have shown promise in early trials and are being investigated further (Table S3 in the Supplementary Appendix).

New Drugs

Five classes of new drugs are being investigated in trials. Of these drugs, two classes (nitroimidazoles and oxazolidinones) and two drugs (bedaquiline and SQ-109) have new mechanisms of action for tuberculosis (Table S3 in the Supplementary Appendix). Phase 2 trials of bedaquiline or delamanid added to background therapy for multidrug-resistant tuberculosis have shown a significant increase in the rate of sputum-culture conversion at 8 weeks of treatment (Table 2).^{64,65}

Phase 3 trials of each drug are being initiated, and each manufacturer has applied for accelerated marketing approvals by regulatory agencies. Accelerated approval was recently granted by the Food and Drug Administration for the use of bedaquiline in multidrug-resistant tuberculosis.

Several studies of combination drugs are being conducted or are being planned, although these trials face barriers that include pharmacokinetic interactions, the reliance on clinical rather than surrogate end points, and the relatively low financial incentive for drug companies to perform such trials. The efficient evaluation of new drug combinations will require close cooperation among the drug companies and nonprofit sponsors of clinical trials. The three-drug combination of moxifloxacin, pyrazinamide, and PA-824 has 14-day

bactericidal activity similar to that of standard four-drug therapy.⁶⁶ Linezolid has recently been shown to achieve sputum-culture conversion in patients with extensively drug-resistant tuberculosis, and further evaluations are under way.⁶⁷

BCG and New Vaccines

M. bovis bacilli Calmette–Guérin (BCG) vaccine continues to be administered in infants at birth in most regions where tuberculosis is endemic. On the basis of a meta-analysis of controlled clinical trials, the vaccine has an estimated overall efficacy of approximately 50% for the prevention of tuberculosis.⁶⁸ Since the BCG vaccine can cause

fatal disseminated infection in immunosuppressed patients, it should not be administered in HIV-infected newborns. Although the BCG vaccine has never been routinely used in the United States, it is increasingly being considered for use in tuberculin-negative adults who are planning to travel to areas with a high prevalence of multidrug-resistant tuberculosis in order to provide medical care.

Through a major international effort, a range of vaccines, both as primary immunogens to replace BCG and as boosters for BCG, are being studied, with more than 30 vaccines in development. Twelve vaccines have entered clinical trials (Fig. S3 in the Supplementary Appendix).⁶⁹ A polyantigenic inactivated whole-cell vaccine showed

39% efficacy in a phase 3 trial for the prevention of tuberculosis among HIV-infected adults who had received previous BCG immunization.⁷⁰

Conclusions

Tuberculosis remains a major cause of death worldwide. The rise and spread of drug resistance and synergistic interaction with the HIV epidemic are posing difficult challenges and threatening global efforts at tuberculosis control. New molecular diagnostics have made earlier and improved diagnosis of active disease possible. Laboratory expertise and resources are required for these tests to become available throughout the developing world. Newer antituberculosis drugs offer the promise of shortened treatment regimens for drug-sensitive disease and more effective treatment for drug-resistant disease and latent infection. New vaccines against tuberculosis in advanced clinical trials offer hope for future tuberculosis control. Although these scientific developments are promising, the global economic crises continue to hinder tuberculosis-control programs. Strong political and financial commitments⁷¹ will be required to achieve global control of tuberculosis and avert millions of unnecessary deaths.

Dr. von Reyn reports receiving consulting fees from Oxford

Immunotec. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at NEJM.org.

We thank Sue Tvaroha for her assistance with Figure S1 in the Supplementary Appendix and Adam Zumla for administrative and technical support.

References

1. Global tuberculosis report 2012. Geneva: World Health Organization (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
2. Zignol M, van Gemert W, Falzon D, et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010. *Bull World Health Organ* 2012;90:111D-119D.
3. Tuberculosis MDR-TB and XDR-TB: 2011 progress report. Geneva: World Health Organization, 2011 (http://www.who.int/tb/challenges/mdr/factsheet_mdr_progress_march2011.pdf).
4. Hill AN, Becerra J, Castro KG. Modeling tuberculosis trends in the USA. *Epidemiol Infect* 2012;140:1862-72.
5. Surveillance report: tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2012. Geneva: World Health Organization (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1203-Annual-TB-Report.pdf>).
6. Abubakar I, Lipman M, Anderson C, Davies P, Zumla A. Tuberculosis in the UK — time to regain control. *BMJ* 2011; 343:d4281.
7. Ewer K, Millington KA, Deeks JJ, Alvarez L, Bryant G, Lalvani A. Dynamic antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:831-9.
8. Andrews JR, Noubary F, Walensky RP, et al. Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* 2012;54:784-91.
9. Verver S, Warren RM, Beyers N, et al. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1430-5.
10. Lahey T, Mackenzie T, Arbeit RD, et al. Recurrent tuberculosis risk among HIV-infected adults in Tanzania with prior active tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2013;56: 1 5 1 - 8 .
11. Frieden TR, Munsiff SS, Ahuja SD. Outcomes of multidrug-resistant tuberculosis treatment in HIV-positive patients in New York City, 1990-1997. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:116.
12. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006;368:1575-80.
13. Dheda K, Shean K, Zumla A, et al. Early treatment outcomes and HIV status of patients with extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa: a retrospective cohort study. *Lancet* 2010;375: 1 7 9 8 - 0 7 .
14. Udwadia ZF, Amale RA, Ajbani KK, Rodrigues C. Totally drug-resistant tuber-

- culosis in India. *Clin Infect Dis* 2012;54:579-81.
15. "Totally Drug-Resistant TB": a WHO consultation on the diagnostic definition and treatment options. Geneva: World Health Organization (http://www.who.int/tb/challenges/xdr/Report_Meeting_totallydrugresistantTB_032012.pdf).
16. Nathanson E, Nunn P, Uplekar M, et al. MDR tuberculosis — critical steps for prevention and control. *N Engl J Med* 2010;363:1050-8.
17. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet* 2011;378:57-72.
18. Caws M, Thwaites G, Dunstan S, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2008;4(3):e1000034.
19. von Reyn CF. Optimal treatment of codisease due to HIV and tuberculosis. *J Infect Dis* 2011;204:817-9.
20. von Reyn CF, Kimambo S, Mtei L, et al. Disseminated tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: ineffective immunity, polyclonal disease and high mortality. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:1087-92.
21. Mudenda V, Lucas S, Shibemba A, et al. Tuberculosis and tuberculosis/HIV/AIDS-associated mortality in Africa: the urgent need to expand and invest in routine and research autopsies. *J Infect Dis* 2012;205:Suppl 2:S340-S346.
22. Mtei L, Matee M, Herfort O, et al. High rates of clinical and subclinical tuberculosis among HIV-infected ambulatory subjects in Tanzania. *Clin Infect Dis* 2005;40:1500-7.
23. Cain KP, McCarthy KD, Heilig CM, et al. An algorithm for tuberculosis screening and diagnosis in people with HIV. *N Engl J Med* 2010;362:707-16.
24. Getahun H, Kittikraisak W, Heilig CM, et al. Development of a standardized screening rule for tuberculosis in people living with HIV in resource-constrained settings: individual participant data meta-analysis of observational studies. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000391.
25. Bates M, O'Grady J, Mwaba P, et al. Evaluation of the burden of unsuspected pulmonary tuberculosis and co-morbidity with non-communicable diseases in sputum producing adult inpatients. *PLoS One* 2012;7(7):e40774.
26. Horsburgh CR Jr, Rubin EJ. Latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med* 2011;364:1441-8.
27. Ferrara G, Murray M, Winthrop K, et al. Risk factors associated with pulmonary tuberculosis: smoking, diabetes and anti-TNF α drugs. *Curr Opin Pulm Med* 2012;18:233-40.
28. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection — United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59:1-25.
29. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011 (<http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/13422/53642/53642.pdf>).
30. Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2011 (http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1103_GUI_IGRA.pdf).
31. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis* 2012;205:Suppl 2:S147-S58.
32. von Reyn CF, Horsburgh CR, Olivier KN, et al. Skin test reactions to *Mycobacterium tuberculosis* purified protein derivative and *Mycobacterium avium* sensitin among health care workers and medical students in the United States. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:1122-8.
33. Hopewell PC, Pai M, Maher D, Uplekar M, Raviglione MC. International standards for tuberculosis care. *Lancet Infect Dis* 2006;6:710-25.
34. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363:1005-15.
35. Lawn SD, Kerkhoff AD, Vogt M, et al. Characteristics and early outcomes of patients with Xpert MTB/RIF-negative pulmonary tuberculosis diagnosed during screening before antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2012;54:1071-9.
36. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. Geneva: World Health Organization, 2008 (http://www.who.int/tb/publications/2008/whohtmtb_2008_392/en/index.html).
37. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Genotype MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2008;32:1165-74.
38. O'Grady J, Maeurer M, Mwaba P, et al. New and improved diagnostics for detec-

tion of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2011;17:

134-41.

39. Performance of Xpert MTB/RIF version G4 assay. Geneva: Foundation for Innovative New Diagnostics, 2011 (<http://www>

[.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/)

[map/findg4cartridge.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/map/findg4cartridge.pdf)).

40. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational 'how-to': practical considerations. Geneva: World Health Organization.

- tion, 2011 (http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569_eng.pdf).
41. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006;355:1539-50.
42. WHO policy on collaborative TB/HIV activities. Geneva: World Health Organization, 2012 (http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503006_eng.pdf).
43. Martinson NA, Barnes GL, Moulton LH, et al. New regimens to prevent tuberculosis in adults with HIV infection. *N Engl J Med* 2011;365:11-20.
44. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. Geneva: World Health Organization, 2011 (http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241500708_eng.pdf).
45. Sterling TR, Villarino ME, Borisov AS, et al. Three months of rifapentine and isoniazid for latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2011;365:2155-66.
46. Akolo C, Adetifa I, Shepperd S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;1:CD000171.
47. Samandari T, Agizew TB, Nyirenda S, et al. 6-Month versus 36-month isoniazid preventive treatment for tuberculosis in adults with HIV infection in Botswana: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2011;377:1588-98.
48. Lawn SD, Wood R. Antiretroviral therapy for control of the HIV-associated MDR and XDR tuberculosis epidemic in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1567.
49. Combs DL, O'Brien RJ, Geiter LJ. USPHS Tuberculosis Short-Course Chemotherapy Trial 21: effectiveness, toxicity and acceptability: the report of the final results. *Ann Intern Med* 1990;112:397-406.
50. Abdool Karim SS, Naidoo K, Grobler A, et al. Integration of antiretroviral therapy with tuberculosis treatment. *N Engl J Med* 2011;365:1492-501.
51. Havlir DV, Kendall MA, Iye P, et al. Timing of antiretroviral therapy for HIV-1 infection and tuberculosis. *N Engl J Med* 2011;365:1482-91.
52. Blanc FX, Sok T, Laureillard D, et al. Earlier versus later start of antiretroviral therapy in HIV-infected adults with tuberculosis. *N Engl J Med* 2011;365:1471-81.
53. Naidoo K, Yende-Zuma N, Padayatchi N, et al. The immune reconstitution inflammatory syndrome after antiretroviral therapy initiation in patients with tuberculosis: findings from the SAPiT trial. *Ann Intern Med* 2012;157:313-24.
54. Swaminathan S, Padmapriyadarsini C, Venkatesan P, et al. Efficacy and safety of once-daily nevirapine- or efavirenz-based antiretroviral therapy in HIV-associated tuberculosis: a randomized clinical trial. *Clin Infect Dis* 2011;53:716-24.
55. ClinicalTrials.gov. Rifampin-based tuberculosis treatment versus rifabutin-based tuberculosis treatment in HIV (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01601626>).
56. *Idem*. Prevention of Early Mortality by Presumptive Tuberculosis (TB) Treatment (PrOMPT) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01417988>).
57. *Idem*. REMEMBER: Reducing Early Mortality & Morbidity by Empiric Tuberculosis (TB) Treatment (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01380080>).
58. Guidelines for the programmatic management of drug resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2011 (http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501583_eng.pdf).
59. Falzon D, Jaramillo E, Schünemann HJ, et al. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. *Eur Respir J* 2011;38:516-28.
60. Van Deun A, Salim MA, Das AP, Bastian I, Portaels F. Results of a standardised regimen for multidrug-resistant tuberculosis in Bangladesh. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:560-7.
61. STREAM: the evaluation of a standardised treatment regimen of anti-tuberculosis drugs for patients with multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB). 2011 (<http://www.controlled-trials.com/isrctn/pf/78372190>).
62. Ahuja SD, Ashkin D, Avendano M, et al. Multidrug resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients. *PLoS Med* 2012;9(8):e1001300.
63. Jacobson KR, Tierney DB, Jeon CY, Mitnick CD, Murray MB. Treatment outcomes among patients with extensively drug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2010;51:6-14.
64. Diacon AH, Pym A, Grobusch M, et al. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 2009;360:2397-405.
65. Gler MT, Skripconoka V, Sanchez-Garavito E, et al. Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med* 2012;366:2151-60.
66. Diacon AH, Dawson R, von Groote-Bidlingmaier F, et al. 14-Day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial. *Lancet* 2012;380:986-93.
67. Lee M, Lee J, Carroll MW, et al. Linezolid for treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 2012;367:1508-18.
68. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994;271:698-702.
69. Stop TB Partnership. Tuberculosis vaccine candidates — 2011 (http://www.stoptb.org/wg/new_vaccines/assets/documents/TB%20Vaccine%20Pipeline_rAug%202012.pdf).
70. von Reyn CF, Mtei L, Arbeit RD, et al. Prevention of tuberculosis in Bacille Calmette-Guérin-primed, HIV-infected adults boosted with an inactivated whole-cell mycobacterial vaccine. *AIDS* 2010;24:675-85.
71. Raviglione M, Marais B, Floyd K, et al. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. *Lancet* 2012;379:1902-13. [Erratum, *Lancet* 2012;379:2242.]

Incremental yield of bronchial washing for diagnosing smear-negative pulmonary tuberculosis

Aumento do rendimento do lavado brônquico para diagnóstico da tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa

ABSTRACT

ⁱ General Epidemiology and Disease Control Unit. Institute of Tropical Medicine. Antwerp, Belgium

ⁱⁱ Departamento de Medicina. Hospital Nacional Hipólito Unanue. El Agustino, Lima, Peru

ⁱⁱⁱ Unidad de Análisis y Generación de Evidencias en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Peru

^{iv} Department of Public Health, Ghent

University. Gent, Belgium

Correspondence:

Alonso Soto

Hospital Nacional Hipólito Unanue Av. Cesar Vallejo, 1390 El Agustino Lima, Peru

E-mail: sotosolari@gmail.com

Received: 9/11/2012

Approved: 2/21/2013

Article available from: www.scielo.br/rsp

OBJECTIVE: To assess the increased diagnostic yield for pulmonary tuberculosis using bronchial washing cultures compared with sputum cultures.

METHODS: Study conducted with 61 adults in Lima, Peru, from January 2006 to December 2007. The yield of sputum cultures was compared with the yield of acid-fast bacilli smears and cultures of bronchial washing for diagnosing pulmonary tuberculosis in suspected cases of clinical tuberculosis with negative acid fast bacilli sputum smears.

RESULTS: Twenty seven (95%CI 32;58) of the cases were eventually diagnosed with smear-negative pulmonary tuberculosis. Bronchial washing samples detected 23 (95%CI 72;99) of the smear-negative pulmonary tuberculosis cases compared with 15 (95%CI 37;74) for sputum cultures ($p = 0.02$). The incremental diagnostic yield of acid fast bacilli smear and culture of bronchial washing specimens over sputum culture was 44% (95%CI 25;65).

CONCLUSIONS: In function of the epidemiological context and the resources available, bronchoscopy should be deployed as part of a comprehensive work up that optimizes smear-negative pulmonary tuberculosis diagnosis and minimizes risk and costs.

DESCRIPTORS: Bronchoalveolar Lavage. Tuberculosis, diagnosis. Diagnostic Techniques and Procedures. Sensitivity and Specificity.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar o aumento do rendimento do diagnóstico de tuberculose pulmonar mediante cultura de lavado brônquico em comparação ao rendimento da cultura de escarro.

MÉTODOS: Estudo realizado com 61 adultos da cidade de Lima, Peru, a partir de janeiro de 2006 a dezembro de 2007. Foi comparado o rendimento de culturas de escarro com o de esfregaço de bacilos ácido-resistentes e cultura de amostras de lavado brônquico para diagnóstico de tuberculose pulmonar, em casos suspeitos de tuberculose clínica, com esfregaço de escarro de bacilos ácido-resistentes negativo.

RESULTADOS: Vinte e sete (IC95% 32;58) dos casos foram diagnosticados com tuberculose pulmonar de baciloscopia negativa. As amostras de lavado brônquico detectaram 23 (95%; IC95% 72;99) dos casos de tuberculose pulmonar de baciloscopia negativa, comparados com 15 (IC95% 37;74) de cultura de escarro ($p = 0.02$). O diagnóstico da tuberculose pulmonar mediante o uso do esfregaço de bacilos ácido-resistentes e da cultura de lavado brônquico tiveram um rendimento adicional de 44% (IC95% 25;65) em relação à cultura de escarro.

CONCLUSÕES: Em função do contexto epidemiológico e dos recursos disponíveis, a broncoscopia deve ser adotada como parte de trabalho abrangente que otimize o diagnóstico de tuberculose pulmonar de baciloscopia negativa e minimize riscos e custos.

DESCRITORES: Lavagem Broncoalveolar. Tuberculose, diagnóstico. Técnicas e Procedimentos Diagnósticos. Sensibilidade e Especificidade.

INTRODUCTION

According to World Health Organization (WHO), smear negative pulmonary tuberculosis (SNPT) is defined as a case with at least two negative sputum acid fast bacilli (AFB) smears and either a positive culture or radiographic abnormalities consistent with tuberculosis and failure to respond to an antibiotic trial.⁵

Microbiological tests on flexible bronchoscopy samples are considered useful for the diagnosis of SNPT, but their indication is not standardized. The procedure is performed on the premise that the bacillary load is higher in samples from bronchial secretions than in sputum. However, bronchoscopy is not without risk

for patients and may be associated with nosocomial transmission of tuberculosis.

The reported sensitivity in patients with clinical suspicion of tuberculosis varies from as low as 6.5% to up to

Further evaluation of the yield of bronchoscopy is needed in order to generate evidence-based recommendations for the use of the procedure in patients with clinical suspicion of SNPT. This study aimed to prospectively assess the incremental diagnostic yield of acid fast bacilli (AFB) smear and culture of a bronchial washing sample over the yield of sputum sample culture in such patients. We also compared the yield of liquid culture compared to conventional solid culture in bronchial washing samples.

METHODS

Study conducted in adults that attended the *Hospital Nacional Hipólito Unanue*, a tuberculosis reference hospital in Lima, Peru, from January 2006 to December

2007. We included patients with clinical suspicion of pulmonary tuberculosis (cough for 14 days or more) and two or more negative AFB sputum smears and one additional negative concentrated smear, who did not improve after a two week antibiotic trial. Patients with high clinical suspicion of tuberculosis who were put on anti-tuberculous treatment without further investigation by the treating pneumologist were excluded from the analysis.

All patients underwent bronchoscopy with bronchial washing, without bronchoalveolar lavage. The procedures were executed by trained pneumologists. Patients were pre-medicated with 0.5 mg atropine and then sedated with midazolam. Bronchial washing was performed by instilling 20 to 50 ml of 0.9% isotonic

saline in the tracheobronchial tree up to the sub-

mental level. The sample was obtained by aspiration into a trap connected to a suction tube.

The sputum sample taken prior to the procedure was concentrated, decontaminated and cultured in solid Ogawa medium using standard methodology¹ and in mycobacteria growth indicator tube, manually read as previously described.³ Bronchial washing samples were concentrated, directly examined for AFB and cultured in the same way.

We classified patients as SNPT cases when they had a positive bacteriological result in cultures of sputum or in AFB smears or cultures of bronchial washing specimens. We calculated the overall diagnostic yields of the different sputum and bronchial washing examinations. Incremental diagnostic yield was defined as [(number of additional cases diagnosed by the test / all detected cases)*100]. The McNemar test was used for comparing the proportion of positive results.

Written informed consent was obtained from all participants. Patients were offered HIV counseling and voluntary testing. The study followed the Declaration of Helsinki principles and was approved by the Ethics Committee of the *Hospital Nacional Hipólito Unanue* and of the Institute of Tropical Medicine of Antwerp (Registration number 4525842, July 5 2005).

RESULTS

Sixty-one patients were recruited. The median age was

Table. Comparison of the diagnostic yield in sputum smear-negative pulmonary tuberculosis suspects of sputum culture, bronchial washing smear acid fast bacilli staining and bronchial washing culture. Lima, Peru, 2006 to 2007.

Variable	Bronchial washing AFB smear and culture	
	Any	Both

33 (interquartile range 26 to 43 years old) and 52% were males; 21% had a previous history of tuberculosis. Fourteen patients refused HIV testing and one out of the 47 patients tested had a positive test. SNPT was diagnosed in 27/61 (95%CI 32;58) suspected cases. There were no complications from the procedure and bronchial washing samples were able to be obtained from all recruited patients.

Bronchial washing AFB smears and cultures detected 23/27 cases of SNPT (95%CI 72;99), a significantly higher proportion ($p = 0.02$) than the 15/27 (95%CI 37;74) cases detected by sputum cultures (Table 1). Nine of the 27 SNPT patients (95%CI 17;54) had a positive solid sputum culture and 13/27 (95%CI 29;68) a positive liquid sputum culture. This difference was not significant ($p = 0.16$). The incremental diagnostic yield of bronchial washing examinations over sputum cultures was 12/27 (95%CI 25;65). AFB smears from bronchial

	positive	negative	Total
Sputum culture			
Positive	11	4	15
Negative	10	33	43
Contaminated	2	1	3
Total	23	38	61
Bronchial washing culture			
	Positive	Negative	Total
Bronchial washing AFB			
Positive	10	1	11
Negative	12	38	50
Total	22	39	61

AFB: acid fast bacilli

washings were already positive in 6/15 (95%CI 16;68) cases eventually detected by sputum culture.

Bronchial washing AFB smears were positive in 11 of the 23 (95%CI 27;69) SNPT cases detected through bronchoscopy while cultures of bronchial washing specimens were positive in 22 of these cases (95%CI 78;100) ($p < 0.001$). The incremental diagnostic yield of culture over AFB smears in bronchial washing specimens was 12/23 (95%CI 31;73).

Positivity of bronchial washing culture was higher in liquid media (19/22; 95%CI 65;97) than in solid media (14/22; 95%CI 41;83) ($p = 0.06$). The incremental diagnostic yield of liquid culture from bronchial washing over solid cultures was 8/22 (95%CI 17;59).

DISCUSSION

The incremental yield of AFB smear and culture of bronchial washing specimens over sputum cultures (44.0%) is substantial in suspected cases of SNPT, and the diagnostic yield (85.0%) is high. The latter finding

is consistent with the literature, but yield is highly dependent on the setting. Nevertheless, a few patients with positive sputum cultures have negative bronchial washing examinations. This may be due to the bacteriostatic effect of the local anesthetic, xylocaine² or to delays in processing the bronchial washing samples. Bronchoalveolar lavage could possibly result in an even better diagnostic yield but is not frequently performed in resource constrained settings.

A considerable proportion of bronchoscopies could be foregone if the results of sputum cultures became more rapidly available: half of patients with SNPT diagnosed through bronchoscopy eventually had a positive sputum culture. Liquid media cultures give faster results and are more sensitive than culture in standard solid media and should be made more generally available.⁴ The diagnostic yield of bronchial washing samples is better than that of sputum samples, but they are complementary and should be included in the work-up in function of the epidemiological context, patient presentation and resources available. Sputum induction, post-bronchoscopic sputum samples and the deployment of molecular techniques could all further

contribute to rationalizing the use of bronchoscopy and to optimizing SNPT diagnosis.

While substantially augmenting diagnostic yield, it remains unclear at which step in the diagnostic workup of suspected cases of SNPT bronchoscopy could best be used and further research is needed to define its precise place and role. It should be deployed as part of a broader, comprehensive approach towards diagnosing SNPT that maximizes yield while minimizing risks and costs. Nevertheless, AFB smears from bronchial washing specimens detect almost half of all SNPT cases and allow for a very rapid diagnosis. This justifies the use of the procedure in critical situations where a treatment decision is urgently needed, particularly if avoiding tuberculosis drug related morbidity is of concern.

REFERENCES

1. World Health Organization. Treatment of tuberculosis guidelines. 4. ed. Geneva; 2010. (WHO/HTM/TB/2009.420).
2. Mohan A, Sharma SK. Fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of sputum smear-negative pulmonary tuberculosis: current status. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2008;50(1):67-78.
3. World Health Organization. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV-prevalent and resource-constrained settings. Geneva; 2007.
4. Kent P, Kubica GP. Public Health mycobacteriology: a guide for the level III Laboratory. Atlanta: Centers for the Disease Control;1985.
5. Soto A, Agapito J, Acuna-Villaorduna C, Solari L, Samalvides F, Gotuzzo E. Evaluation of the performance of two liquid-phase culture media for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a national hospital in Lima, Peru. *Int J Infect Dis.* 2008;13(1):40-5. DOI: 10.1016/j.ijid.2008.03.023



– ORIGINAL ARTICLE –

Statistical Evaluation of Two Microbiological Diagnostic Methods of Pulmonary Tuberculosis After Implementation of a Directly Observed Treatment Short-course Program

Shakti Rath ^a, Debasmita Dubey ^a, Mahesh C. Sahu ^a, Sudhanshu S. Mishra ^b,
Rabindra N. Padhy ^{c,*}

^aDepartment of Microbiology, IMS & Sum Hospital Medical College, Siksha 'O' Anusandhan University, Kalinga Nagar, Bhubaneswar, Odisha, India.

^bDepartment of Pharmacology, IMS & Sum Hospital Medical College, Siksha 'O' Anusandhan University, Kalinga Nagar, Bhubaneswar, Odisha, India.

^cCentral Research Laboratory, IMS & Sum Hospital Medical College, Siksha 'O' Anusandhan University, Kalinga Nagar, Bhubaneswar 751003, Odisha, India.

Received: December
17, 2012

Revised: December 18,
2012

Accepted: December
19, 2012

KEYWORDS:

a priori probability,

a posteriori probability, Bayes rule, Mycobacterium

tuberculosis, pulmonary tuberculosis, ROC curve,

sensitivity, specificity

A
b
s
t
r
a
c
t

Objectives: To evaluate the diagnostic accuracy of smear and culture tests of clinical samples of pulmonary tuberculosis after the introduction of the directly observed treatment short-course (DOTS) program.

Methods: Using sputum samples from 572 individuals as a self-selected population, both Ziehl-Neelsen staining and culturing on Lowenstein-Jensen medium were carried out as diagnostic procedures. Using Bayes' rule, the obtained data set was analyzed.

Results: Of the 572 samples, 33 (0.05769) were true positive (results of both tests positive) cases; 22 samples (0.03846) were false positive (smear test positive and culture test negative) cases; 62 samples (0.10839) were false negative (smear test negative and culture test positive) cases; and 455 samples (0.79545) were true negative (results of both tests negative) cases. Values of test statistics, sensitivity, and specificity were used to compute several inherent other Bayesian test statistics. The a priori probability or prevalence value of tuberculosis in the targeted population was 0.166. The a posteriori probability value computed arithmetically was 0.6614 and that obtained by the graphical method was 0.62. Conclusions: The smear test was found to be dependable for 95.4% with stable TB infections, and it was not dependable for 34.7% without stable TB infections. The culture test could be regarded as the gold standard for 96.15% as seen with the data set, which was obtained after the implementation of the DOTS program.

*Corresponding author.

E-mail: rnpadhy54@yahoo.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 Korea Centers for Disease Control and Prevention. Published by Elsevier Korea LLC. All rights reserved.

1. Introduction

Tuberculosis, caused by tubercle bacilli (TB), spreads by droplet infection, via an aerosol sneezed by a patient. In immune-compromised/aged individuals, those with poor health, those infected with HIV, and those living in poor hygienic conditions, TB attacks through the upper respiratory tract (URT), and after a dormant period, the disease is expressed [1]. Sometimes, a TB strain causes URT infections, and when consulting a clinician the infected individual is routinely advised to undergo a rapid diagnostic test of the acid-fast bacillus (AFB) staining or Ziehl-Neelsen staining (ZN staining or smear test, cited herein). Typically, this method requires a critical population of bacilli (5×10^3 bacilli/mL) in the clinical (sputum) sample from an infected person for the positivity of the test result [2]. However, a smear test can turn up a negative result, if there is only a small number of bacilli in the sputum sample. Concomitant to diagnosis by a smear test, sputum samples are routinely sent for culturing in

Lowenstein-Jensen (LJ) medium. Unfortunately, in TB it takes 3-4 weeks for colonies to develop, during which time the disease becomes stable in the infected individual. Indeed, this test (culture test, cited herein) is regarded as the gold standard, because viable bacilli in the sputum sample grow into colonies in the LJ medium [3].

The unfortunate situation is that false negative (FN) cases (results where the smear test is negative and the culture test is positive) lead to cryptic invasions of bacilli that progress toward the establishment of the disease, as a negative smear test result prompts the decision for nontreatment (to control the infection), and when culture test results become available later (after 1 month or so), the person has already contracted the disease [4]. Therefore, to prevent this, clinicians usually recommend for patients to undergo empirical TB chemotherapy. When a patient is on chemotherapy, he/she may sometimes have a sufficient amount of dead bacilli to yield "smear test positivity along with culture test negativity", giving rise to false positive (FP) cases. The other two obvious possibilities are the positivity of both tests, i.e., true positive (TP) cases (smear test positivity and culture test positivity) and the

negative results of both tests, i.e., true negative (TN) cases (smear test negativity and culture test negativity), which can be suitably taken care of by the clinician. The confusing ambivalence of FN and FP cases creates clinical ambiguity, i.e., persons with FN cases are not given chemotherapy unless multiple comorbidities are evident, leading to the establishment of the disease. By contrast, FP patients, particularly those with a small number of bacilli, are unnecessarily subjected to a rigorous regimen of chemotherapy. In addition, FP cases may arise from infection from mycobacteria other than tuberculosis (MOTT).

This hospital was converted into a teaching hospital in 2007, and the Revised National TB Control Program

was launched in the same year; however, the program only became effective from December 2009 onward. The samples were collected from suspected patients, who at times had been treated with the directly observed treatment short-course (DOTS) protocol, which was instituted by the World Health Organization [5]. The DOTS strategy involves the treatment of TB patients for the first 2 months with the first-line drugs of chemotherapy [6]. There were also provisions for intermediate dosing of drugs three times weekly, and at times twice weekly, although this was not recommended by the World Health Organization, because margins of error stemming from accidentally omitting one dose per week may result in once-weekly dosing, which would virtually render the treatment ineffective. It had been recorded that the implementation of DOTS has a success rate exceeding 95% and that it prevented the emergence of further MDR-TB strains [7]. It should be noted that the DOTS-plus program meant for MDR-TB was not introduced in this study, because it involves drug sensitivity testing as a routine procedure; thus, patients were treated under resource-limited settings. Data presented here were from a period of 19 months, as recorded from patients in areas where the DOTS program was implemented. This work is an extension of our previous work of 5 years [8], which was conducted in a community where the DOTS program was not used. This report describes the prevalence of tuberculosis after the program has been implemented. Thus, this work substantiates, with a reasonable interval after the previous study, the use of the DOTS program in and around this TB center with a view toward examining its aftermath in a typical state of India.

1.1. Why Bayesian analysis?

In a population of suspected patients who donated sputum samples, four types of situations were noted. Obviously, a clinician would be eager to know numerically about the errors of each test, which gave rise to FN and FP cases. Therefore, degrees of fallibility of both tests need to be assessed. To resolve the ambiguity, how specific and sensitive are these tests?

Bayesian analysis can be used [9]. As with any disease, for TB, an affirmative diagnostic procedure becomes essential in order to determine the presence/absence of a disease in a patient. Two types of false cases, FN and FP cases, arise as errors unbeknown to the clinician and the first type of error is the treatment of healthy people suspected of being infected, and the second is allowing infected patients to go untreated in a community of healthy individuals [10]. The first type of error results in morbidity linked to first-line and second-line drugs [6], whereas the impact of the second type is even more grave, in that the infection subtly spreads to the rest of the patient's body as well as to the community. This situation could lead to serious consternation in issues of public health [6]. Thus, a suitable test to

resolve the ambivalence of supporting smear tests or culture test results is essential.

Data could be presented in a 2 × 2 generic format, for which only the Bayesian concept can be used, as the culture test is considered the gold standard [11]. The data set could then be used to assess the prevalence of tuberculosis in the targeted population as a post hoc trial from 572 samples; in addition, the digital assessment of the credibility of the smear test could be performed. As the culture test also has its degree of fallibility, i.e., unviable bacilli as discussed above may give rise to positivity in the smear test and negativity in the culture test, its quantification also remains an obvious quest.

Diagnostic tests are used to reveal the occurrence of

a disease in a population consisting of randomly distributed diseased and disease-free individuals, and the accuracy of a diagnostic test can be measured by comparing the test results to the true condition of patients individually. Herein, the ambivalence of smear and culture tests could be resolved with the account of data as evidenced by an appropriate statistical analysis involving probability as the extent of how dependable each test is. Obviously, an ideally based truth is required with which the second test can be compared and the smear test is to be assessed. Therefore, with care, the Bayesian analysis based on evidence could measure the degree of belief/assumption: first, at what percentage can the culture test be taken as the gold standard, and second, to what extent, numerically, can the smear test be considered dependable for the start of TB chemotherapy?

To evaluate the inherent probability of each test, the prior probability (a priori probability or prevalence or the prevalence of disease in the targeted population) is determined before using the data. Prevalence is computed as $(TP + FN)/N$, where N is the total number of samples. Additionally, several test statistics are associated in the analysis:

1. The sensitivity (TP rate) is the proportion of people with the disease who will have positive smear test results, computed by $[TP/(TP + FN)]$. This value is the ability of the smear test to detect the infection status, when it is truly

present, i.e., it is the probability of a positive test result, given that the samples were taken from sick individuals.

2. The specificity (TN rate) is the proportion of people

without the disease who will have negative smear test results, obtained by $[TN/(FP + TN)]$. This value is the ability of the smear test to yield a negative result with samples from disease-free individuals, i.e., it is the probability of a negative test result.

3. The FP rate is the probability of errors in the culture test, computed as $[FP/(FP + TN)]$.

4. The FN rate is the probability of errors in the smear

test, computed as $FN/(TP + FN)$.

5. The positive predictivity is the posttest probability

of the disease that yielded a positive test result, or

the probability of the portion of people with positive test results who actually had the disease, computed as $[TP/(TP + FP)]$.

6. The negative predictivity is the posttest probability of the disease that gave a negative test result, or the probability of the proportion of people with negative test results who actually did not have the disease, computed as $[TN/(FN + TN)]$.
7. The diagnostic accuracy (inherent validity or predictive validity) is the ability of the smear test to be correctly positive or negative, among the binary results of the culture test, computed as $[(TP + TN)/N]$. Additionally, this value estimates the accuracy of smear and culture tests together.
8. The positive likelihood ratio (LR) is the ratio between the TP rate and the FP rate, computed as $[\text{sensitivity}/(1 - \text{specificity})]$, when the smear test result was positive.
9. The negative LR is the ratio between the FN rate and the TN rate, computed as $[(1 - \text{sensitivity})/\text{specificity}]$, when the smear test result was negative. In fact, the larger is the positive LR value, the greater the likelihood of infection, and similarly, the lesser is the negative LR value, the lesser the likelihood of infection in a population.
10. The a posteriori probability is the value from posttest arithmetic computation of the data set for the diagnostic efficiency, and it clarifies the dependability of each test independently, with a numerical probability value in arriving at the truth, i.e., the sought-after conclusions from both tests.
11. The area under the receiver operating characteristic

(ROC) curve, drawn with values of sensitivity and

specificity, gives a graphical analysis for diagnostic efficiency. The graphical method additionally examines the predictive capability

as another value of a posteriori probability, independent of the arithmetic computation.

2. Materials and Methods

Sum Hospital, Bhubaneswar, is a philanthropic clinical teaching hospital with a recognized TB center. During the

18 months of study, persons of all age groups suspected of having pulmonary tuberculosis contributed fresh sputum samples, which were subjected to AFB/smear test and culturing in the LeJ medium on the same day. An aliquot of 5 mL of a sample was added to a volume of 10 mL of 4% NaOH in a centrifuge tube that was placed for 15 minutes in a water bath at 37 °C, for the digestion of mucus. The tube was centrifuged at 3000 g for 20 minutes; the supernatant was discarded, and the residue was washed three times with sterile distilled water [12]. A smear was prepared using two droplets of the suspension on a glass slide, and this was air dried; drops of 1% carbol-fuchsin were poured onto the smear. Next, the slide was heated

gently and was allowed to stand for 10 minutes for the coloration of the smear. The slide was gently washed with water and was decolorized with drops of 25% H₂SO₄. The smear was further counterstained with 0.1% methylene blue solution for 1 minute, and was gently washed before air-drying. At least 200-300 fields under an oil immersion objective were screened for red/pink AFB, and results were recorded as 0e1, 1e9, or 10e99 or more AFB per field (Figure 1). Results were reported, viewing under 100 fields, as follows: (1) negative with no red/pink bacteria, (2) scanty for 1e9 bacilli, (3) μ for 10e99 bacilli, (4) $\mu\mu$ for more than 100 bacilli, or (5) $\mu\mu\mu$ for bacilli more than 100 per field [13]. Furthermore, duplicate tubes of the LeJ medium were inoculated from the prepared suspension and were incubated at 37 °C for the growth of colonies that were checked later, in 6-8 weeks with weekly intervals.

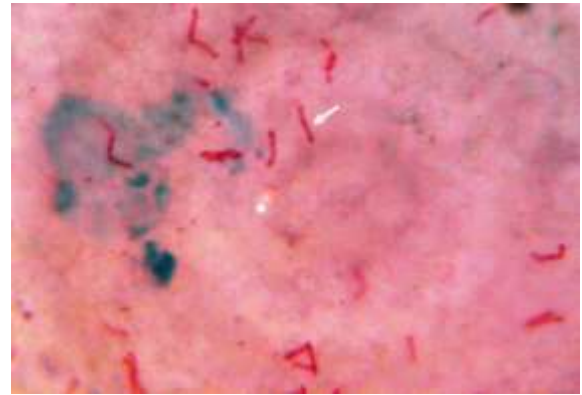


Figure 1. Photomicrograph of smear slide with Ziehl-Neelsen staining with pink bacilli of Mycobacterium tuberculosis. An arrow indicates a bacillus.

3. Results

Diagnostic analyses of 572 sputum samples (NZ1.0) obtained in a period of 19 months (March 2010 to September 2012) were performed with a smear test and culture test, in a parallel manner. It was found that from a total of 572 samples (N Z 1.0), 33 samples (0.05769) were TP cases; 22 samples (0.03846) were FP cases; 62 samples (0.10839) were FN cases; and 455 samples (0.79545) were TN cases. It was evident that there was mismatch of results in the two tests, so FN and FP cases arose (Table 1). Applying the Bayesian concept with the recorded data (Table 1), several other test statistics described earlier could be computed for additional probability values, with 95% confidence interval (CI) values (Table 2).

3.1. Computation of a posteriori probability mathematically and by ROC curve analysis

The a posteriori probability or $P(E_j|E)$, the probability value of a sample to be truly positive, can be

calculated using the Bayesian formula,

$$P(E_1|E) = \frac{P(E_1 \cap E)}{P(E)}$$

$$= \frac{P(E_1) \cdot P(E|E_1)}{P(E)}$$

where E is the event that the smear test result is positive; E₁ is the event that the result of the culture test involving the same sample is positive; E₁⁰ is the partition of the sample space for all clinical samples from noninfected individuals, and it is a hypothetical value. This yields several probability values:

P(E) = probability of smear test positives

$$= 0.09615$$

P(E₁) = probability of

culture test positives

$$= 0.16608$$

$$P(E_1|E) = \frac{0.09615 \cdot 0.16608}{0.5789}$$

P(E⁰) = probability of TP = 0.05789

P(E₁|E⁰) = probability of TP = TN = 0.8531

Because we seek the mathematical value of a posteriori probability, substituting the above values in its formula, we obtain

$$P(E_1|E) = \frac{0.16608 \cdot 0.5789}{0.16608 \cdot 0.5789 + 0.05777 + 0.8531}$$

$$= 0.6614 \pm 95\% \text{ CI}; 0.562 \text{ to } 0.758$$

The population of 572 samples was grouped into six fractional populations, and values of prevalence remained at the mean value of 0.23 ± 0.12 (the original prevalence value was 0.16608). Values of sensitivity, specificity, and a posteriori probability were determined before drawing the graph for the ROC curve, and these values gave an idea that for all possible values of population and prevalence, the sensitivity patterns changed with a mean present value of 0.30 ± 0.13 (the original sensitivity value was 0.347), but the specificity values remained unchanged at 0.99 throughout. Values of a posteriori probability also remained in the range at the mean value of 0.59 ± 0.05 (the original a posteriori probability value was 0.6614) (Table 3).

Values of both sensitivity and specificity were used to

determine another value of a posteriori probability by the ROC curve (Figure 2), which was drawn by joining the cut-points represented by six values of each: sensitivity versus 1 - specificity; and the diagonal chance line, (45° line) through the coordinates (0, 0) and (1, 1), was drawn as the lower limit. The area of the upper triangle above the 45° diagonal line (called the chance line) was taken as the total value = 1.0, out of which the AUC (area under the ROC curve) was found to be 0.62 (95% CI, 0.473 to 0.767), determined by using the

Table 1. The generic 2 × 2 table with number of samples assigned to positive and negative results, based on smear test and culture test during TB diagnosis

Smear test results	Culture test results		
	Infection present	Infection absent	Total
Positive	TP Z 33 (0.05769)	FP Z 22 (0.03846)	(TP + FP) Z 55 (0.09615)
Negative	FN Z 62 (0.10839)	TN Z 455 (0.79545)	(FN + TN) Z 517 (0.90385)
Total	(TP + FN) Z 95 (0.1669)	(FP + TN) Z 477 (0.8339)	N Z 572 (1.0, approx.)

TP Z 33 samples were true-positives (smear test positive, culture test positive); FP Z 22 samples were false-positives (smear test positive, culture test negative); FN Z 62 samples were false negatives (smear test negative, culture test positive); and TN Z 455 samples were true-negatives (smear test negative, culture test negative); N Z population size or total number of samples Z 572. Corresponding fraction values are given in parentheses. Prevalence of TB Z 0.1669.

trapezoidal rule [14]. This means that the smear test has a 62% chance of correctly distinguishing a sample from an infected person and a sample from a noninfected individual. This is the second value of a posteriori probability, the first one being 0.6614 or 66.14%.

4. Discussion

The presence of the disease in this population of 572 suspected individuals or the prevalence or a priori probability value of the test was 0.16608 or 16.6%, computed according to Zhou et al [15]. There were 95 positives (TP and FN cases) out of the total sputum samples, based on culture test results. Moreover, from both types of false cases (FN and FP), it was clear that each test was insufficient for the prognosis. Positive predictivity is the conditional probability that a patient had the disease, given that the smear test result was positive. Similarly, negative predictivity is the conditional probability, where the sample does not have the infection, given that the smear test result was negative. The positive predictivity value, 0.6, and the negative predictivity value, 0.88, computed herein are far from

the absolute values of 0.4 and 0.12, respectively. However, both are dependable in terms of determining the prevalence of the disease [16]. In other words, the negative predictivity value is dependable for the smear test.

Sensitivity and specificity are two important test statistics that are conditional to the situation of the stable TB infection with the sample donor, but both of these values are not affected by the prevalence of the disease. In this study, the sensitivity of the smear test was

0.347, a value that strongly undermines the effectivity of the smear test for TB diagnosis in the presence of stable TB infections. However, the specificity value was

0.954, which suggests an absolute dependability of the smear test in the absence of an infection. The correct rather cumulative value of these two test statistics would be $[(1 - 0.347) + (1 - 0.954)] = 0.696$. Therefore, the smear test was dependable for a correct prognosis of the disease in either way, absence/presence of the disease, by 69.6% only, with or without a stable infection. This cumulative value of 69.6% was not at par with the diagnostic accuracy value of 0.853 (85.3%), which signifies how commonly dependable the smear test is, in cases where the result of the culture test was still

Table 2. Computed probability values of different Bayesian test statistics of TB diagnosis

Test statistic	Formula	Value	95% CI

Prevalence or a priori probability	$(TP + FN)/N$	0.166	0.014e0.406
Sensitivity (true positive rate)	$TP/(TP + FN)$	0.347	0.0648e0.5352
Specificity (true negative rate)	$TN/(FP + TN)$	0.954	0.9012e1.0
Diagnostic accuracy	$(TP + TN)/N^a$	0.853	0.5944e1.0
Positive predictivity	$TP/(TP + FP)$	0.6	0.248e1.0
Negative predictivity	$TN/(FN + TN)$	0.88	0.6144e1.0
False positive rate	$FP/(FP + TN)$	0.046	0.0008e0.0792
False negative rate	$FN/(TP + FN)$	0.652	0.4648e0.9352
Positive likelihood ratio	$\text{Sensitivity}/(1 - \text{specificity})$	7.543	0.464e17.556
Negative likelihood ratio	$(1 - \text{sensitivity})/\text{specificity}$	0.685	0.524e0.916
A posteriori probability	$P(E_j E)$	0.6614	0.562e0.758
Area under the ROC curve or AUC (a posteriori probability)		0.62	0.473e0.767

^aAlternately, $Z (\text{sensitivity})/(\text{prevalence}) + (\text{specificity})/(1 - \text{prevalence})$. For abbreviations, see [Table 1](#); for the detailed formula of a posteriori probability, see text.

CI Z confidence interval; FN Z false negative; FP Z false positive; TN Z true negative; TP Z true positive.

Table 3. Different values of sensitivity, specificity and posteriori probability for six values of population and prevalence

(mean standard deviation) of the data (N = 572)

Population fraction	Prevalence	Sensitivity	Specificity	Posteriori probability
100	0.17	0.35	0.02	0.612
100	0.37	0.22	0.03	0.638
100	0.33	0.12	1.0	0.6
100	0.10	0.4	0.06	0.714
100	0.15	0.47	0.09	0.706
72	0.111	0.25	0.03	0.692
Mean SD	0.23 0.12	0.30 0.13	0.21 0.39	0.66 0.05

unknown. The difference between the above values (69.6% vs. 85.3%) could be attributable to the inveterate advice of a clinician for the smear test, when copious cough is present in the URT with other doubtful symptoms, as a preemptive practice, or the limited fallibility of the culture test. However, 455 (79.5%) TN cases from a total 572 are justified for the habitual advice by clinicians for the smear test, as noted.

The 62 (10.84%) FN cases of the total smear test result could be attributable to samples from a healthy person without any bacilli, from newly infected individuals with a paucity of organisms, and unviable infection with *Mycobacterium paratuberculosis* [17], including MOTT or prior *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination, as noted [18]. A high value of FN cases (10.84%) should actually induce a progress in the infection that is present in the body, and it is matter of concern because TB chemotherapy has not been initiated in FN cases. Obviously, error in TB prognosis would cause an individual to become an outcast, because of drug-resistant infections, especially due to FN cases. Nevertheless, samples are concentrated before diagnostic steps are undertaken by default. Indeed, at

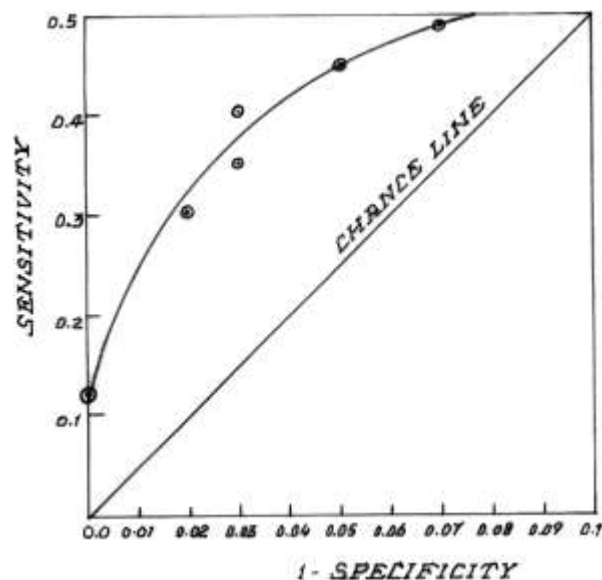


Figure 2. The receiver operating characteristic (ROC) curve.

least, 5×10^3 bacilli/mL must be present in a sample for a smear test result to be considered positive [2,19]. Thus, the insufficiency of the smear test could be attributed to the small number of bacilli in the sample. The pragmatic approach to TB prognosis would definitely be the nucleic acid amplification test with isolation of DNA from bacilli, meant for drug-resistant bacilli, which is not usually followed in resource-limited settings. Thus, a smear test would be inadequate in distinguishing a sick from a nonsick person with latent TB, as the latter would promote evasive FN or FP cases. The dependability of the culture test is challenged by the

22 FP cases; in other words, this test is dependable as

the gold standard for 96.15% only. Virtually, the probability of the culture test result being positive would never be zero, but the probability of the smear test to be totally negative cannot be ruled out, when each sample contains an insufficient amount of bacilli. Moreover, the FP cases are 22 (3.85%), which suggests that the erroneous smear test results may be attributable to a patient undergoing chemotherapy, leading to unviable bacilli for the culture test, but the smear test would be positive because of the presence of dead bacilli. Thus, the FP rate is 0.046 or 4.6%.

With double-checking (arithmetic and graphical), the posttest analysis of the data could be done for numerical assessments with two values of a posteriori probability. The graphical representation value is 0.62 and the arithmetic value is 0.6648. Both values are in close proximity with a distance of 0.4% in derivation. Thus, statistically this signifies the dependability of the smear test with this binocular vision. Moreover, the values of associated test statistics generated in the Bayesian analysis clump around the data set facilitate a multiple evaluation of the ambivalence. Thus, this analysis would provide a methodological framework of quantitative assessment of two test results of diagnosis of pulmonary tuberculosis.

The limitations of this analysis are numerous.

First, an infected individual without any symptom

of infection would have a positive smear test result. Second, both sensitivity and specificity are not affected by the prevalence of the disease, but they are well affected by the inherent fallibility of each test. For example, when the

sensitivity value is higher, it would be easier to detect positivity in a population by the smear test; however, it could also be attributable to individuals with a more advanced stage of the disease [15]. Third, these two test statistics do not directly help in assessing the test results of individual patients as both are based on the data set of the population. Lastly, the habitual advice of clinicians to individuals with URT infections to undergo a smear test promotes ambiguous FN cases.

This Bayesian analysis on test results could represent an opportunity for the numerical assessment of two diagnostic methods by generation of a set of values of test statistics, which cumulatively qualify the smear test to be moderately dependable (69.6e85.3%), i.e., lesser dependability when the infection is present in the individual, and greater only when the infection is not present. The gold standard culture test was found to be almost exquisitely dependable for the prognosis of pulmonary tuberculosis, as known. The posttest or post hoc analysis of the data set generating two values of a posteriori probability, falling within 62.0% and

66.48%, however, neither advocates strongly for, nor

undermines both diagnostic methods. It should be noted, however, the recent outbreak of multidrug-resistant TB worldwide must be controlled with more rigorous measures, for which both these methods are insufficient.

Acknowledgments

S. Rath is a SRF supported by CSIR, New Delhi. Part of the project was financed by a UGC-MRP in Botany (grant no. 39-388/2010/SR) to R.N. Padhy, the CSIR Scientist of the institute. We are grateful Dr. D.K. Roy, Dean, IMS & Sum Hospital, Siksha 'O' Anusandhan University, Bhubaneswar. We are thankful to Somadatta Das, DEO, IMS & Sum Hospital, for the photomicrograph.

References

1. Cattamanchi A, Dowdy DW, Davis JL, et al. Sensitivity of direct versus concentrated sputum smear microscopy in HIV-infected patients suspected of having pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2009 May;9:53.

2. Gopi PG, Chandrasekaran V, Subramani R, et al. Association of conversion and cure with initial smear grading among new smear positive pulmonary tuberculosis patients treated with Category I regimen. *Indian J Med Res* 2006 Jun;123(6):807e14.
3. Brodie D, Schluger NW. The diagnosis of tuberculosis. *Clin Chest Med* 2005 Jun;26(2):247e71.
4. Swai HF, Mugusi FM, Mbwambo JK. Sputum smear-negative pulmonary tuberculosis: sensitivity and specificity of diagnostic algorithm. *BMC Res Notes* 2011 Nov 1;4:475.
5. WHO. Research for action. Understanding and controlling tuberculosis in India. New Delhi: WHO, Regional Office for South-East Asia; 2000. p. 33e40.
6. Dubey D, Rath S, Sahu MC, Nayak N, Debata NK, Padhy RN. Status of multidrug resistance in tubercle bacillus and phyto-chemicals for the control. *J Publ Health* 2013;21:115e9.
7. Grover GS, Takkar J. Recent advances in multi-drug-resistant tuberculosis and RNTCP. *Indian J Community Med* 2008 Oct; 33(4):219e23.
8. Sahu MC, Rath S, Dubey D, Debata NK, Padhy RN. Evaluation of two microbiological diagnostic methods for the pulmonary tuberculosis based on Bayes rule. *J Publ Health* 2011 Jun;3(2):138e43. <http://dx.doi.org/10.1007/s10389-012-0517-8>.
9. Pennello GA. Bayesian analysis of diagnostic test accuracy when disease state is unverified for some subjects. *J Biopharm Stat* 2011 Sep;21(5):954e70.
10. Behr MA, Warren SA, Salamon H, et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients' smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999 Feb 6;353(9151):444e9.
11. Dunson DB. Commentary: practical advantages of Bayesian analysis of epidemiologic data. *Am J Epidemiol* 2001 Jun 15; 153(12):1222e6.
12. Idrees M, Bhatti AH, Khan SU, Riazuddin S. Drug resistance in M. tuberculosis isolated from a group of patients referred to PMRC, TB Research Center at Mayo Hospital, Lahore, Pakistan. *Pak J Zool* 1998;30:335e9.
13. Mahon CR, Mahon C, Lehman DC, Manuselis G, Manuselis Jr G. Textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, PA: Saunders; 2010. p. 636e76.
14. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 5th ed. Pacific Grove, CA: Duxbury; 2000.
15. Zhou XH, Obuchowski NA, McClish DK. Statistical methods in diagnostic medicine. 2nd ed. New York: Wiley; 2011.
16. Altman DG, Bland JM. Statistics notes: diagnostic tests 2: predictive values. *Br Med J* 1994 Jul 9;309(6947):102.
17. Cocito C, Gilot P, Coene M, et al. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 1994 Jul;7(3):328e45.
18. Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, et al. Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis. *Eur Respir J* 2007 Oct;30(4):722e8.
19. Takahashi S. Handbook of direct smear examinations of sputum for tubercle bacilli. Tokyo: South-East Asian Medical Information Centre; 1975.

Seminarios de la Fundación Española de Reumatología

www.elsevier.es/semreuma

Revisión

Microbiología de la tuberculosis

Julià González-Martin



Servicio de Microbiología-CDB, Hospital Clínic-CRESIB-UB, Barcelona, España

información del artículo

Historia del artículo:

Recibido el 8 de enero de 2014

Aceptado el 10 de enero de 2014

Palabras clave:

Tuberculosis

Diagnóstico microbiológico

Técnicas micobacteriológicas

r e s u m e n

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas con mayor número de casos, sobre todo en países de baja renta. A pesar de tener un tratamiento eficaz, su control es difícil debido a las características de la bacteria y al mecanismo de transmisión de la enfermedad. El diagnóstico microbiológico establece la etiología y la confirmación de la enfermedad. Se basa en la microscopía con tinciones específicas, el cultivo y la confirmación, sobre todo en medios líquidos, y la amplificación génica cuando el grado de sospecha es moderado-alto. Es necesario identificar siempre los cultivos positivos, debido a que en los últimos años se observa un aumento de micobacterias no tuberculosas con tratamiento distinto a la TB. El tratamiento de los casos resistentes es complejo y con pocos fármacos alternativos. Por ello debe hacerse antibiograma sistemático de todos los pacientes con aislamientos positivos. Las pruebas de detección de mutaciones de resistencia adelantan la información de la resistencia de 3-4 semanas a 2-3 días. Están indicadas cuando se sospeche resistencia en pacientes previamente tratados, contactos de resistentes, fracasos clínicos, recidivas y originarios de países de alta prevalencia de TB.

Se necesitan nuevas pruebas diagnósticas que incidan en las limitaciones de las actuales, como son la sensibilidad y la lentitud en crecer de *Mycobacterium tuberculosis*.

© 2014 SER. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Microbiology of tuberculosis

a b s t r a c t

Tuberculosis (TB) is one of the infectious diseases with a larger number of cases, especially in low-income countries. Despite having an effective treatment, its control is difficult due to the characteristics of the bacterium and the transmission mechanism of the disease. The microbiological diagnosis establishes the etiology and confirms the disease. It is based on specific staining microscopy, culture, especially liquid media, and gene amplification, when the suspicion is moderate to high. It is always necessary to identify positive cultures, since in the recent years an increase in non-tuberculous Mycobacteria (NMT), with different TB treatment, has been observed. The treatment of resistant cases is complicated and also limited due to the lack of alternative drugs. Therefore, systematic susceptibility testing should be performed on all patients with positive isolates. The detection of mutations associated with resistance provides information in 2-3 days instead of 3-4 weeks. It is indicated in previously treated patients, contacts with resistant cases, in clinical failures or recurrences, and in patients originating from countries with a high incidence of TB.

The New England Journal of Medicine

Keywords: Tuberculosis
Microbiological diagnosis
Mycobacterial methods



Introducción

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas con mayor número de casos responsable de un único agente. Junto con la malaria y la infección por el VIH, está considerada una prioridad por la OMS. En 2012 se comunicaron 8,6 millones de casos

nuevos en el mundo, con 1,2 millones de muertos, más del 95% en países de baja renta¹. La transmisión aérea, la instauración progresiva de la clínica y la capacidad latente del bacilo de Koch son algunas de las causas que explican su difícil control. Factores como el VIH y la resistencia a los fármacos agravan la clínica y complican su manejo. Durante la década de 1980 hubo un aumento en la incidencia de casos debidos a la inmunodepresión por el VIH, llegando a ser VIH+ el 25-50% de los pacientes con TB. La introducción de los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia disminuyó

Correo electrónico: gonzalez@clinic.ub.es

esta influencia y en 2012 se comunicó VIH+ en el 12,7% de los pacientes¹.

La OMS y los programas nacionales de control recomiendan un tratamiento basado en la administración de 3 o 4 fármacos durante

6 meses, con curación teórica superior al 95%. Sin embargo, la aparición de resistencia a uno o más fármacos requiere modificaciones terapéuticas complejas por el escaso número de antibióticos alternativos, y conlleva mayor duración del tratamiento, más efectos adversos y menos garantías de curación. A pesar de que hace más de 50 años que existen tratamientos eficaces, en 2012 se comunicaron 450.000 casos de TB multirresistente (MDR TB), de los que el

9% fueron de resistencia extrema (XDR TB)¹.

La distribución de casos de TB no es homogénea en todo el mundo, con incidencia mayor en los países de baja renta, indirectamente proporcional al desarrollo económico. Por este motivo, más del 80% de los casos se concentran en 20 países, como China, India, Pakistán, la Federación Rusa y Sudáfrica, entre otros. En Estados Unidos y Europa Occidental la mayoría corresponden a pacientes inmigrantes de lugares con elevada incidencia. La incidencia en España durante 2012² ha sido de 13,10/100.000 habitantes, el 8,8% coinfectados por el VIH.

La TB se transmite por vía aérea y la fuente son pacientes con TB pulmonar. Tras la exposición y contagio ocurre una respuesta local de la inmunidad celular, que resulta en la formación de granulomas, en cuyo interior un número limitado de bacterias se mantienen latentes, en más del 90% de casos de forma indefinida. Esta situación se conoce como infección tuberculosa o tuberculosis latente (TBL). El 10% de estas personas desarrollarán la enfermedad tuberculosa en algún momento de su vida, la mitad durante los primeros

18 meses, siendo en el resto impredecible. Existen 2 billones de personas con TBL. El diagnóstico precoz y el control del tratamiento son 2 de los factores más importantes para disminuir la incidencia de TB.

El agente causal

Mycobacterium tuberculosis fue descubierto por Robert Koch en 1882. Pertenece al género *Mycobacterium*, que agrupa a más de

120 especies, la mayoría de ellas ambientales y no patógenas, y a las que se conoce como micobacterias no tuberculosas (MNT). *M. tuberculosis* está integrado en el complejo *M. tuberculosis* (MTC), con otras 5 especies: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. canetti*³. *M. tuberculosis* es, con mucho, la más frecuente. *M. bovis* BCG es una variedad de *M. bovis* que en 1921 dio lugar a la vacuna BCG (bacilo de Calmette y Guérin), aún utilizada en algunos países. *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular obligado y desencadena respuesta de la inmunidad celular. Aunque también afecta a animales domésticos o salvajes, los humanos son el hospedador preferente. Se divide lentamente, cada

18-20 h, en comparación a los 20 min de la mayoría de bacterias. La pared celular es rica en lípidos, con una capa característica de ácidos micólicos, que le confiere néjm-alcohol resistencia, en las tinciones. Las 2 últimas propiedades, junto con la capacidad de entrar en metabolismo latente cuando se ve agredida, le confieren una especificidad que explica la clínica y la respuesta a las pruebas diagnósticas y al tratamiento. En la práctica diagnóstica, los

integrantes de MTC son difícilmente diferenciables entre sí por características fenotípicas, por lo que se identifican como MTC sin diferenciar, aunque en más del 95% se trata de *M. tuberculosis*.

En 1998 se secuenció el genoma completo de *M. tuberculosis*, dando inicio a numerosas investigaciones. Entre otras cosas, han evidenciado la diversidad genética de *M. tuberculosis*⁴, con 6 linajes, predominando cada uno de ellos en distintos lugares del mundo. Esta diversidad se traduciría también en características fenotípicas, con repercusiones clínicas y diagnósticas. Se han observado

diferencias entre linajes en el tropismo por localizaciones y en la virulencia. Las cepas de las familias genéticas Beijing y W, predominantes en Asia, se asocian a mayor transmisión y virulencia.

Obtención de las muestras

Las muestras deben ser representativas de la localización. En las formas pulmonares son las secreciones respiratorias. La más habitual es el esputo. Para obtener el máximo rendimiento ha de ser de buena calidad. Los pacientes deben ser instruidos en la producción de secreciones profundas, con predominio de neutrófilos y sin saliva. En pacientes que no expectoran, el aspirado gástrico o el esputo inducido pueden ser alternativas, como sucede en menores de 12 años. Las muestras por broncoscopio están indicadas cuando las anteriores no son posibles o cuando está indicado diagnosticar otras causas infecciosas. Un volumen de 3-10 ml es adecuado para la mayoría de muestras respiratorias. Para el jugo gástrico puede bastar con 3-5 ml. Debe procesarse con rapidez o neutralizar el pH ácido para evitar dañar a las micobacterias. En nuestra área geográfica la TB extrarrespiratoria supone alrededor del 15-20%². Las localizaciones más frecuentes son la pleural y la ganglionar. En las adenitis, la muestra adecuada es la punción con aguja fina (PAAF) si fluctúan y son superficiales, o la biopsia. En la pleuritis tuberculosa la muestra más rentable es la biopsia, aunque la más usual es el líquido obtenido por toracocentesis. Entre 5 y 10 ml serán suficientes. Idéntico volumen es adecuado para la ascitis tuberculosa. En otras serositis tuberculosas, como meningitis o artritis, en que el volumen de líquido difícilmente puede alcanzar 5-10 ml, un mínimo de 1 ml es necesario. Cuando los volúmenes son insuficientes es preferible obviar la microscopia. Aproximadamente el 10% de las TB extrapulmonares son esqueléticas, y de estas, el 50% en la columna vertebral^{5,6}. El dolor es el síntoma más común (80% de los casos). El diagnóstico y tratamiento precoz son esenciales para el buen pronóstico funcional. La muestra adecuada puede obtenerse por biopsia o drenaje, a través de punción guiada por TAC o cirugía. Si las muestras son óptimas el rendimiento de punción o biopsia son equivalentes^{7,8}. El hallazgo en la histología de inflamación granulomatosa con necrosis caseosa se considera diagnóstico y suficiente para iniciar el tratamiento⁵, aunque la confirmación microbiológica es el diagnóstico definitivo y permite, además, comprobar la sensibilidad a los fármacos. Una revisión reciente⁶ indica sensibilidad del 59,3% para el cultivo y del 45,2% para la baciloscopia, así como el hallazgo de cepas resistentes en el 58% de los pacientes, que estaría relacionado con la procedencia de los estudios analizados, en mayor proporción de países con elevada incidencia de TB y de resistencia. El cultivo de sangre es poco útil en pacientes no inmunodeprimidos, ya que el MTC es poco bacteriémico. Si se procesa, son suficientes 5-10 ml de sangre total con heparina. No se realiza la microscopia, ya que los hematíes no permiten diferenciar bien los colorantes y la sensibilidad es muy baja. Las muestras de heces pueden ser útiles en formas diseminadas, aunque es frecuente que el cultivo se contamine con la elevada cantidad de flora intestinal. Las muestras deben obtenerse en recipientes estériles, adecuados al volumen y sin aditivos. Muestras sólidas como biopsias y tejidos deben mantenerse húmedas con agua destilada estéril. Es importante evitar introducir las muestras en formol, que inactiva totalmente la viabilidad de los microorganismos. Por este motivo es aconsejable usar recipientes separados para las muestras destinadas a estudio microbiológico y anatomopatológico. También es de suma importancia que el volumen sea adecuado, sobre todo en las muestras obtenidas de forma traumática y difícilmente repetibles. Un diagnóstico diferencial adecuado priorizará las pruebas. Atomizar las muestras para alcanzar más pruebas únicamente consigue disminuir la sensibilidad del diagnóstico real. Las muestras conservadas en parafina pueden ser utilizadas para amplificación génica,

después de ser desparafinadas; la sensibilidad es menor que en las muestras frescas, por lo que deben usarse como último recurso.

Métodos diagnósticos establecidos

El diagnóstico de la TB se establece a partir de signos y síntomas clínicos de sospecha, pruebas de imagen y confirmación microbiológica. El diagnóstico microbiológico se basa en la utilización de la microscopía y el cultivo. En los últimos años se han incorporado técnicas de amplificación genética. Ningún método cumple el 100% de diagnóstico, por lo que el 10-15% de casos de TB pulmonar y hasta el 50% en algunas formas de TB extrapulmonar no tendrán confirmación microbiológica y se apoyarán en la clínica y en la respuesta al tratamiento. Aunque su sensibilidad no alcance el 100%, el cultivo se considera la prueba de referencia.

Microscopía

Es la demostración de MTC por técnicas de tinción específica. La composición lipídica de la pared micobacteriana le permite retener los colorantes de tinción, resistiendo la acción de decolorantes como la combinación de un ácido (sulfúrico o nítrico) con alcohol. La ácido-alcohol resistencia diferencia específicamente a las micobacterias (bacilos ácido-alcohol resistentes [BAAR]) del resto de bacterias. La tinción más utilizada es la descrita por Zhiel y Neelsen, que tiñe las micobacterias de rojo sobre fondo azul, en contraposición a las demás bacterias, que se tiñen de azul. En los países de alta renta se usan ampliamente las tinciones basadas en colorantes fluorescentes, en que las micobacterias son luminosas sobre fondo oscuro. La más conocida es la tinción de auraminarodamina. La sensibilidad de las tinciones fluorescentes es un 10% superior. Requieren mayor experiencia del observador y disponer de microscopio de fluorescencia. Recientemente se han diseñado microscopios basados en tecnología light-emitting diode (LED), más económicos y con menor mantenimiento, que permiten su instalación en países de baja renta.

La microscopía o baciloscopia es la prueba más rápida, posible en menos de 2 h, y la más económica. En muchos países de baja renta es la única prueba diagnóstica. Su principal limitación es la sensibilidad. Requiere en la muestra 5.000-10.000 bacterias/ml para ser positiva⁹. La sensibilidad está relacionada con la carga bacteriana en las lesiones. El retraso diagnóstico y la evolución de la

enfermedad influyen sobre la carga bacteriana. Por este motivo, la sensibilidad de la tinción en países de incidencia elevada es mayor. En nuestro entorno, la sensibilidad en la TB pulmonar está alrededor del 55-60%. En la TB extrapulmonar varía según la localización. En formas ganglionares es similar a la TB pulmonar, siendo inferior al 15% en líquidos biológicos, como líquido pleural, articular, ascítico, peritoneal o LCR. En pacientes con TB e infección por VIH con inmunodepresión severa el rendimiento de la microscopía es menor.

La especificidad de la tinción es muy elevada. The New England Journal of Medicine
tiene experiencia, y la calidad de algunos de Septiembre 28, 2015. For personal use only. No other uses without permission.
cialmente ácido-alcohol resistentes. Copyright © 2014 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.
su incidencia es baja y no plantean dificultades de diagnóstico diferencial.

El resultado de la tinción se expresa en una escala de 0 a

4 cruces, una aproximación semicuantitativa a la carga bacteriana. En la TB pulmonar la intensidad de la baciloscopia tiene un triple uso: diagnóstico y extensión de la TB, monitorización de la respuesta al tratamiento e indicador de contagiosidad del paciente. Dependiendo de la intensidad de la positividad al inicio del tratamiento, la negativación será más o menos rápida, generalmente durante el primer mes, aunque con intensidad 4+ y lesiones extensas puede requerir hasta 2 meses o más, sin que signifique evolución

inadecuada. No deben esperarse que baciloscopias intensamente positivas se negativicen en pocos días. Como recomendación general, las muestras para evaluar la negativización no deben cursarse con intervalos inferiores a una semana.

La tinción también evalúa la contagiosidad del paciente, y es uno de los criterios utilizados para cesar el aislamiento de los pacientes, estén o no ingresados. El riesgo de transmisión es muy reducido cuando la tinción se ha negativizado o después de 2-3 semanas de tratamiento efectivo aunque persista positiva, con excepción de que se sospeche resistencia a fármacos del tratamiento. No obstante, este es un aspecto controvertido sobre el que no hay un acuerdo total.

Cultivo

Es la prueba diagnóstica más sensible y la considerada de referencia. El dintel de positividad está en 100-1.000 bacterias/ml, de

50-100 veces más sensible que la microscopia. Debido al crecimiento lento de las micobacterias, la muestra debe someterse a un proceso previo de eliminación de la flora bacteriana acompañante, conocido como descontaminación, especialmente importante en esputo, en el que siempre están presentes bacterias de la flora oral. La descontaminación se consigue sometiendo la muestra a pH intensamente alcalino con NaOH durante 20 min, en los que la mayoría de bacterias presentes se lisarán. Transcurrido este tiempo, se revierte a pH neutro y se concentra. Las micobacterias sobreviven a la descontaminación gracias a la estructura de su pared bacteriana. Sin embargo, la descontaminación tampoco es inocua para ellas. Debe seguirse un especial cuidado en neutralizar el pH y en centrifugar la muestra en condiciones de refrigeración. Aun así, se calcula que hasta el 30% de las micobacterias en la muestra morirán, por lo que es conveniente evitar la descontaminación en muestras estériles. Este proceso confiere al cultivo una complejidad específica y exige condiciones de seguridad superiores a las necesarias para la mayoría de los microorganismos.

Los medios para cultivar micobacterias son específicos. Los más conocidos son los sólidos que incorporan huevo entre sus componentes, como el de Löwenstein-Jensen, diseñado durante el primer tercio del siglo xx. Con menor difusión también se utilizan otros sólidos, como Coletsos, Trudeau, Ogawa, etc. Entre los medios sólidos con agar y sin huevo los más usados son Middlebrook 7H10 y

7H11. Durante décadas no se han usado medios de cultivo líquidos, más sensibles que los sólidos, debido a la dificultad en interpretarlos macroscópicamente, ya que el MTC no enturbia los medios líquidos. En los últimos 25 años se han desarrollado diferentes sistemas que permiten detectar el crecimiento de los cultivos líquidos. El primero fue el método radiométrico BACTEC 460TB (Becton Dickinson, MD, EE. UU.), basado en la utilización de medio líquido 12B

que contiene ácido palmítico marcado con C^{14} . En presencia de cre-

cimiento se metaboliza este sustrato y las micobacterias liberan C^{14} como producto de excreción. El sistema dispone de un lector que detecta C^{14} cuando el crecimiento es precoz. Posteriormente se han desarrollado métodos más automáticos, basados en fluorescencia, que evitan los inconvenientes de la radiactividad. Estos incorporan en cada tubo de cultivo un marcador de fluorescencia sensible a cambios en la presión de oxígeno o en la concentración de CO_2 en el recipiente del cultivo y que expresan crecimiento bacteriano. Los recipientes con las muestras se introducen en incubadoras

a

35-37 °C que monitorizan cada hora los sensores de cada cultivo

a través de un láser, de forma que el equipo incubador indica la presencia de cultivos positivos, así como de los negativos que han cumplido el protocolo de incubación. Actualmente se dispone de

3 sistemas fluorimétricos validados: BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, MD, EE. UU.), MB BacT (BioMerieux, Francia) y VersaTREK (Termo Fisher, MA, EE. UU.).

El rendimiento de los cultivos líquidos es superior a los sólidos, por lo que deben hacerse siempre.

El cultivo es positivo en alrededor del 85-90% de las TB pulmonares. En localizaciones extrapulmonares el rendimiento es más bajo, raramente superior al 50%, exceptuando la localización linfática o en órganos sólidos, similares a la pulmonar⁹.

Una limitación importante del cultivo es la lentitud del resultado, que puede requerir varias semanas. Las muestras en las que la tinción ha sido positiva suelen crecer en 3-12 días, mientras que en las tinciones negativas puede tardar 15-30 días. Los cultivos líquidos suelen positivizarse antes, en la franja inferior de estos intervalos. La sensibilidad de los cultivos líquidos es ligeramente superior a la de los sólidos, sobre todo en las muestras extrapulmonares y en el aislamiento de MNT. El protocolo de cultivo internacionalmente aceptado mantiene la incubación de cultivos hasta 42 días^{10,11}.

Cuando los cultivos se positivizan es necesario identificar la especie de la micobacteria. En nuestro entorno, MTC supone alrededor del 80% de los aislamientos. No obstante, el aislamiento de MNT es creciente debido en parte a la mejora de las técnicas de laboratorio y también a la mayor proporción de pacientes susceptibles a estas infecciones, como son los pacientes inmunodeprimidos o con patología pulmonar crónica. Hasta hace unos años la identificación se apoyaba en características morfológicas y en lentas pruebas bioquímicas que requerían semanas. Actualmente la identificación se basa en pruebas más rápidas, muchas de ellas moleculares. La morfología macroscópica y microscópica de los cultivos orienta los sucesos tests a utilizar. La identificación de MTC puede realizarse con diversas aproximaciones. Recientemente se ha introducido una prueba rápida de inmunocromatografía capaz de detectar el antígeno MPT64 de MTC¹². A partir de un cultivo positivo puede confirmarse la identificación de MTC en 15 min sin infraestructura ni equipos adicionales. Su límite de detección son 100.000 bacterias/ml, por lo que la sensibilidad de la prueba es superior al 95% de los cultivos positivos. Existen varias presentaciones comerciales validadas (Becton Dickinson MGIT TBc Identification Test, MD, EE. UU., y SD Bioline TB Ag MTP64 Rapid, Standard Diagnostics, Corea del Sur). Asimismo, se han descrito numerosos opciones caseras o comerciales para identificar MTC mediante PCR. La mayoría amplifica fragmentos de la secuencia de inserción IS6110. No suele ser necesario diferenciar las especies del complejo MTC dada la elevada proporción de casos en que corresponde a *M. tuberculosis*. No obstante, se requiere en algunas situaciones. Cuando se observa resistencia a la pirazinamida es importante descartar *M. bovis*, ya que la mayoría de las cepas son resistentes a este fármaco. También estaría indicado en pacientes sometidos a terapia antitumoral con BCG en neoplasias de vejiga y con sospecha de infección por *M. bovis* BCG o en pacientes de África del Oeste con sospecha de *M. africanum*. En estas situaciones puede utilizarse una técnica Line Probe Assay (LiPA) de diferenciación de las especies del complejo basada en amplificación por PCR de varias zonas genéticas, como son el gen 23S, la zona RD1 y diversos polimorfismos de GyrB¹³. En las técnicas de LiPA el producto de la amplificación se incuba sobre una tira de nitrocelulosa en la que están inmovilizadas diversas sondas que identifican de forma específica a cada una de las especies. El producto de amplificación híbrida con su sonda complementaria y el resultado puede evidenciarse por un revelado enzimático comercializado de esta técnica, utilizadas ampliamente en laboratorios de muchos países para la identificación de especies de micobacterias^{14,15}. La identificación de otras especies de micobacterias está fuera del propósito de esta revisión. Cabe comentar que se basa principalmente en métodos de LiPA de amplificación e hibridación reversa, como el descrito para MTC, y puede identificar alrededor de 35 especies distintas con la aplicación secuencial de diversas modalidades de la prueba.

En la identificación de especie la prueba de referencia actual es la secuenciación de genes que contienen zonas conservadas diferenciales de cada especie. Los genes más utilizados son 16S, 23S, rpoB y hsp65¹⁶. Actualizarse en la identificación de especies asistidas a MTC puede realizarse en 4-7 días en condiciones de rutina asistida.

Detección genética directa en las muestras

Se basa en la amplificación de ácidos nucleicos de secuencias específicas de MTC, generalmente por PCR u otras técnicas de amplificación. La mayoría de las técnicas de inserción ADN, y la diana genética más frecuente es la técnica de inserción IS6110. El paso previo a la amplificación es la extracción de ADN del interior de las micobacterias. Este es un aspecto de suma importancia debido a la dificultad en romper la pared y separar los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares, a diferencia de lo que ocurre con las restantes bacterias. Se utilizan técnicas manuales de extracción y también métodos automatizados o semiautomatizados. Los métodos manuales pueden conseguir una extracción más eficiente, aunque requieren manipulación y dedicación importante y el riesgo de contaminaciones cruzadas entre las muestras.

Se han descrito numerosos métodos caseros (home made) con variantes en las dianas elegidas (IS6110, HSP-65KD, rpoB), en el método de revelado o lectura (electroforesis, real time) o en el sistema de revelado o lectura (electroforesis, real time, ELISA, real time). También están disponibles métodos comerciales validados, como son Amplified MT Direct Test MTD (GenProbe, CA, EE. UU.), Amplicor MT (Roche Molecular Diagnostics, CA, EE. UU.) y BD Probe TEC ET Assay (Becton Dickinson Biosciences, MD, EE. UU.). Los tests caseros se utilizan ampliamente en la etapa de desarrollo de las técnicas y se usan aún en el ámbito de la investigación y en países de baja renta debido a su menor coste económico. Se acepta que los métodos caseros son más sensibles, por ser más adaptables a cada situación, pero también son más inconsistentes y variables. La convicción general es que debe tenderse a la utilización de métodos comerciales, que deben ser sencillos, robustos y con requerimiento de experiencia mínima¹⁷. En los estudios

iniciales se estableció el límite de sensibilidad de las técnicas de amplificación en el genoma de 2-3 bacterias en condiciones ideales. Sin embargo, en las muestras clínicas reales existen obstáculos a la extracción, como puede ser el moco y detritus celulares, así como sustancias tales como iones, proteínas o compuestos de mayor tamaño, que inhiben total o parcialmente la amplificación. Por este motivo, en la práctica difícilmente se consigue amplificar muestras con menos de 3.000-5.000 bacterias/ml. Esta sensibilidad sitúa a las pruebas de amplificación en una posición intermedia entre la microscopia y el cultivo, con una rapidez parecida a la primera. En general, en las muestras con microscopia positiva la sensibilidad es del 97-98%, y en muestras con microscopia negativa, alrededor del 65-70%.

La especificidad de las pruebas de amplificación es elevada cuando el grado de sospecha clínica de TB también lo es. Sin embargo, disminuye cuando el grado de sospecha es bajo.

Las expectativas generadas sobre los métodos de amplificación de MTC en muestras clínicas no se han cumplido. Es debido principalmente a las

1. Sensibilidad inferior al cultivo, que sigue siendo la prueba de referencia, sobre todo en muestras con microscopia negativa.
2. No sustituyen a ninguna de las pruebas establecidas.
3. La manipulación comporta el riesgo de contaminaciones cruzadas entre las muestras, con la génesis de falsos positivos.
4. Requieren instalaciones adecuadas que permitan separar físicamente las zonas de extracción de las de amplificación y revelado. Es frecuente que en países y áreas con mayor incidencia de TB

se carezca de esta infraestructura, y a menudo tampoco puede garantizarse mantener la cadena de frío de los reactivos.

5. El nivel de experiencia del personal técnico que realiza las técnicas debe ser elevado.
6. No se ha establecido claramente el coste/beneficio de la implantación de estas pruebas.

Actualmente las indicaciones de las técnicas de amplificación serían las siguientes:

1. Sospecha elevada o medianamente elevada de TB. Debe evitarse su utilización como prueba de cribado o como apoyo para descartar el diagnóstico.
2. Confirmación de microscopia positiva.

En países con alta incidencia, la baciloscopia positiva es sinónimo de TB. En nuestro entorno geográfico está justificada la confirmación por la creciente incidencia de infecciones por MNT. El resultado comportará decisiones importantes respecto al aislamiento del paciente y a la pauta de tratamiento elegida.

Recientemente, en 2010, la OMS ha avalado la utilización del método GenXpert¹⁸ como técnica de diagnóstico de TB y de detección de resistencia a la rifampicina. Se describe más adelante en esta revisión.

Pruebas de sensibilidad a los fármacos

La TB es una de las pocas enfermedades infecciosas con un tratamiento claramente establecido a nivel mundial. La recomendación actual de la OMS para todos los países es la indicación de

4 fármacos administrados en un periodo de 6 meses, de acuerdo con el siguiente esquema: isoniazida (H), rifampicina (R), etambutol (E) y pirazinamida (Z) durante 2 meses, y H más R en los 4 meses restantes (2HREZ/4HR)¹. Diversas sociedades científicas españolas recomiendan la misma pauta¹⁹.

Bases del tratamiento de la tuberculosis

La estreptomicina fue el primer fármaco antituberculoso eficaz que se utilizó en el tratamiento, en 1946. Poco tiempo después se observó que los pacientes experimentaban una mejoría inicial con una rápida recaída como consecuencia del desarrollo de resistencia al fármaco. M. tuberculosis presenta mutaciones espontáneas en los genes cromosómicos e irreversibles. Se estima que una población de alrededor de 1×10^6 bacterias/ml puede generar una bacteria mutante frente a un fármaco. Por ello, si se administra un único fármaco es seguro que se desarrollará resistencia, debido a que la población de bacterias en las lesiones supera este número y que una vez el fármaco haya eliminado las susceptibles, la mutante se regenerará de nuevo. Si se administran 2 fármacos de forma simultánea, será preciso que haya una población bacteriana alrededor de 10^{10} a 10^{12} bacterias/ml para generar una mutante a ambos fár-

macos. Esta es una población elevada poco frecuente de alcanzar en las lesiones. Con la administración conjunta de 3 fármacos se eleva hasta 10^{15} a 10^{18} bacterias/ml el número necesario para generar una mutante a los 3 fármacos. Es una población imposible de alcanzar. Por tanto, administrar 3 fármacos eficaces es el objetivo. La pauta de 4 fármacos se justifica por la posibilidad de contagio de una cepa resistente a uno de ellos.

Los fármacos actúan sobre dianas diferentes para evitar las resistencias cruzadas. Así R y estreptomicina (S) inciden sobre la síntesis de proteínas, aunque en distintos puntos de acción. H, E y Z bloquean diferentes pasos metabólicos de la síntesis de la pared bacteriana. De gran importancia es que los fármacos tengan

actividad sobre distintos estados metabólicos de la bacteria, dada su facilidad para pasar a situación de latencia en la que es refractaria a la acción de los fármacos. A título de ejemplo, H tiene su máxima eficacia sobre la población en fase exponencial de crecimiento, mientras que Z actúa sobre la población semilátente. R tiene un espectro de acción amplio, desde la fase de crecimiento exponencial hasta la fase de crecimiento estacionario.

Concepto de resistencia a los fármacos

La resistencia a los fármacos antituberculosos es debida a mutaciones cromosómicas permanentes. Desde un punto de vista epidemiológico se distinguen 2 tipos de resistencia: a) la observada en pacientes que han recibido tratamiento previo, en los que podría haberse generado debido a un uso, indicación u absorción inadecuados de los fármacos; b) la asociada a pacientes que no han recibido tratamiento antes y que podría ser debida al contagio de un paciente con TB resistente o ser generada en el propio paciente de forma espontánea. Las primeras pueden evitarse con un control adecuado del tratamiento. Las segundas deben detectarse lo antes posible¹.

Respecto al número de fármacos afectados, distinguimos entre: a) monorresistencia: cuando afecta a un solo fármaco; los más frecuentes en nuestro entorno son H y S; b) polirresistencia: afecta a 2 o más fármacos, pero nunca simultáneamente a H y R; c) multirresistencia (MDR): afecta simultáneamente a R y a H, con o sin otras resistencias asociadas, y d) resistencia extrema (XDR): afecta R y a H, y además al menos a un fármaco inyectable y a las fluoroquinolonas¹.

La resistencia MDR, y especialmente la XDR, representan un grave problema de tratamiento que con frecuencia no puede resolverse, sobre todo en países de alta incidencia y pocos recursos.

La distribución de la resistencia en el mundo es variable según los países, aunque podría superponerse a un mapa de desarrollo económico, con una relación inversamente proporcional. Globalmente son resistentes más del 10% de los casos nuevos, pero con amplias diferencias entre países, como Holanda y los Países Escandinavos, con menos del 1%, hasta porcentajes superiores a 15-30% en China, en India o en los Países Bálticos. Ochenta y siete países ya han comunicado al menos un caso de resistencia XDR. Aunque no se conocen con exactitud, el porcentaje de resistencia en España estaría alrededor del 8,3%, con el 1,3% de casos MDR. El 33,6% de los casos

resistentes corresponderían a nacidos en otros países²⁰. Los anti-

biogramas resistentes deben confirmarse repitiéndolos y, si está disponible, usar una técnica genética de detección de resistencia.

Detección fenotípica de resistencia. El antibiograma

Desde un punto de vista microbiológico, una cepa de MTC es resistente a un antibiótico cuando el 1% o más de la población bacteriana de un cultivo es capaz de crecer y multiplicarse en presencia de una concentración determinada de este fármaco. Para detectar la resistencia se establece la proporción de bacterias resistentes comparando el crecimiento de la cepa con antibiótico con una dilución 1/100 de la cepa sin antibiótico que actúa como control. Esta interpretación se conoce como método de las proporciones y las concentraciones críticas, y fue establecido por Cannetti y Grosset en 1963. Todos los sistemas de antibiograma desarrollados posteriormente se basan en este principio. Hasta la segunda mitad de la década de 1980 los antibiogramas se realizaron utilizando medio de cultivo sólido, siendo los más utilizados Löwenstein-Jensen y Middlebrook 7H10. La dificultad residía en preparar adecuadamente el inóculo de MTC para poder calcular la proporción

de micobacterias resistentes. Estos métodos requerían además 4 semanas de incubación antes de llegar a un resultado.

Actualmente se usan los mismos métodos semiautomatizados de los cultivos líquidos mencionados anteriormente, aplicándose

idéntico principio de detección. Para cada antibiótico o cada concentración se utiliza un tubo (o botella, dependiendo del método) al que se añaden concentraciones prefijadas del antibiótico y un inóculo alrededor de 5×10^5 bacterias/ml. Se utilizan tantos tubos como concentraciones de antibióticos a estudiar. También se incluye un tubo control, con un inóculo 100 veces menor. El antibiograma se incuba entre 5 y 12 días y se interpreta de acuerdo a algoritmos establecidos por el sistema. El antibiograma estándar incluye los 5 fármacos considerados de primera línea (H, R, E, S y Z). Los 4 primeros se analizan simultáneamente utilizando un control común. La Z únicamente es activa a pH ácido alrededor de 5, in vivo e in vitro, por lo que debe testarse en un medio de cultivo acidificado. Debido a que una proporción de cepas podrían tener dificultades de crecimiento en estas condiciones, el medio de cultivo se sitúa a pH 6, incrementando hasta 4 veces la concentración de antibiótico para compensar la proporción de este que será inactiva a este pH e incluyendo un control con un inóculo 10 veces menor. Durante 20 años el método más utilizado para la realización del antibiograma en medio líquido fue el sistema radiométrico BACTEC 460TB, convirtiéndose en el método de referencia. Recientemente se ha retirado del mercado, siendo los métodos más utilizados BACTEC MGIT960, MB BacT y VersaTREK. Se han realizado numerosos estudios comparativos que concluyen que los 3 sistemas son equivalentes entre sí y también respecto al radiométrico^{21,22}. Como excepción, MB BacT no incorpora la tecnología para estudiar la sensibilidad a la Z.

intensidad al final de la primera fase del tratamiento o pacientes contactos de casos con resistencia probada.

La correlación entre los resultados del antibiograma y la clínica es muy alta, sobre todo para H y R, por lo que un resultado de resistencia implica una modificación del tratamiento. Actualmente el antibiograma incluye 2 concentraciones fijas para 3 de los fármacos: H (0,1 g/ml, 1 g/ml), E (2,5 g/ml, 5 g/ml) y S (1 g/ml, 4 g/ml), y una para R (1 g/ml) y Z (100 g/ml). Según el sistema utilizado, pueden variar ligeramente. Se consideran resistencias de bajo nivel las que afectan a las concentraciones menores, y de alto nivel las que afectan a ambas. La implicación práctica del nivel de resistencia es que probablemente no sea necesario retirar los fármacos cuando es de bajo nivel, aunque sí deben añadirse otros. Tradicionalmente no se ha utilizado el concepto de concentración mínima inhibitoria (CMI) para el antibiograma de MTC, por lo que es muy importante que el resultado sea fiable. A nivel práctico, cuando los laboratorios detectan resistencia en el antibiograma se comprueba una segunda vez o se confirma con una prueba genética. La resistencia a la Z es poco frecuente, por lo que es usual en este caso descartar si se trata de *M. bovis*.

El antibiograma frente a fármacos de primera línea está plenamente estandarizado y validado. Por este motivo es realizado en muchos laboratorios que disponen de cultivos líquidos. Cuando se detecta resistencia, está indicado analizar la sensibilidad para fármacos de segunda línea. En este caso no hay protocolos unificados respecto al procedimiento ni tampoco referente a los fármacos y concentraciones a estudiar, aunque se han realizado

algunas propuestas²³. Es frecuente incluir gran parte de los siguientes:

rifabutina, amikacina, tobramicina, kanamicina, capreomicina, etionamida, cicloserina, ofloxacino (u otras fluoroquinolonas como levofloxacina o moxifloxacino), clofazimina y linezolid. Es recomendable que los antibiogramas de segunda línea se realicen en laboratorios con experiencia. Asimismo, la interpretación debe hacerse con cautela.

El antibiograma de primera línea está indicado en todos los aislamientos de casos nuevos. Esta es la forma más frecuente de diagnóstico de bajo nivel de resistencia. Si la resistencia a la Z es detectada durante la primera fase del tratamiento, es imprescindible ante fracasos clínicos del tratamiento, recidivas o persistencia de la baciloscopia positiva sin disminuir su

Detección genotípica de resistencia

La lentitud del antibiograma ha estimulado en los últimos años el desarrollo de métodos rápidos de detección molecular de la resistencia. Se basan en la premisa de que el mecanismo principal de resistencia a los fármacos son mutaciones cromosómicas irreversibles, por lo que detectando las mutaciones se diagnostica la resistencia. Las principales mutaciones de resistencia a los fármacos se describen en la [tabla 1](#). La ventaja más importante de los métodos genéticos de detección de resistencias es la rapidez. En condiciones de rutina asistencial permite obtener resultados en 2-3 días. Cuando se aplica sobre cultivos positivos, la sensibilidad es cercana al 100% para detectar las mutaciones incluidas en el diseño de la técnica. También puede utilizarse directamente sobre muestras clínicas. La sensibilidad dependerá de la concentración de bacterias en la muestra, siendo mayor en las muestras con microscopia positiva intensa y menor en las muestras con baciloscopia negativa. Existen numerosos métodos comerciales y caseros para detectar las mutaciones de resistencia, sobre todo las relacionadas con H y con R. Los más usados son los métodos de LiPA, basados en los mismos principios descritos para los test de identificación de especies: amplificación por PCR de los genes diana, hibridación del amplificado con diversas sondas inmovilizadas sobre un soporte de nitrocelulosa y revelado colorimétrico que indica la hibridación específica en forma de franjas transversales sobre la tira de nitrocelulosa. Esta tecnología ha sido recomendada por la OMS para ser utilizada por los programas nacionales de TB. Hasta el momento existen 3 presentaciones comerciales. InnoLiPA Rif TB (Biomerieux, Francia) está diseñado para detectar el 95-98% de las mutaciones de resistencia a R, y un metaanálisis reciente²⁴ indica sensibilidad global del 80-100%. GenoType MTBDRplus (HAIN, Alemania) permite la detección del 95-98% de mutaciones de resistencia a la R y también las asociadas a los genes katG e inhA de resistencia a la H, que cubren el 85-87% de las resistencias a este fármaco. Este método ha demostrado una sensibilidad del 84% para detectar resistencia a H y del 98% para la resistencia de R. La especificidad en ambos casos es cercana al 100%. Recientemente el mismo fabricante ha diseñado un nuevo kit, MTBDRsl, para estudiar las mutaciones de otros fármacos. Permite detectar aminoglucósidos de segunda línea, etambutol y quinolonas. Funciona bastante bien para detectar resistencias a amikacina y quinolonas. Capreomicina y kanamicina comparten el mismo mecanismo de resistencia que amikacina, aunque el método es menos eficaz para estos fármacos. Esto último es extensible también para etambutol²⁵.

Recientemente ha aparecido en el mercado el sistema GenXpert dirigido a detectar la resistencia a la R, considerada como marcador de TB multirresistente²⁶. En 2010 la OMS avaló su utilización en el diagnóstico de la TB y en la detección de resistencia a la R. En 2 años, dos tercios de los países con más TB del mundo ya lo adoptaron en sus programas de control de TB¹⁸. GenXpert es una plataforma integrada que puede usarse con manipulación y experiencia mínimas. A diferencia del resto de métodos, el kit consiste en un cartucho cerrado en el que se introduce la muestra, tratada previamente para el cultivo, o directamente después de diluirla con un tampón. El cartucho incluye todos los reactivos necesarios para lisar las bacterias, extraer y purificar el ADN, amplificar los fragmentos diana, con una técnica de PCR a tiempo real que incorpora sondas específicas que cubren toda la zona de mutaciones de resistencia de R en el gen rpoB. El cartucho es introducido en el equipo, que controla la secuencia de acciones que ocurren en su interior. El resultado, presentado a través del software informático, indica presencia o ausencia de ADN de MTC y también si se detectan o no mutaciones de resistencia a la R. Este sistema, también aplicado a otros microorganismos como gripe, estreptococos grupo B o Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, ha supuesto un cambio muy importante en la utilización de las pruebas de

Tabla 1

Mecanismo de acción y mutaciones de resistencia más conocidos de los fármacos antituberculosos

Nombre del fármaco	Acción del fármaco	Gen de la mutación	Consecuencia de la mutación	Frecuencia ^a	Tipo de resistencia	Mutaciones más frecuentes
Isoniazida (H)	Inhibe síntesis de ácidos micólicos de pared celular	katG	No se activa el profármaco	55%	Alto nivel > 1 g/ml	Codón 315
		inhA	Altera enzima en la síntesis de pared	32%	Bajo nivel < 1 g/ml	Posiciones -15, -17
		ahpC	Disminuye actividad de inhA o elimina profármaco activo	–	Possible mutación compensatoria. Acompaña a otras mutaciones	–
		kasA	–	–	Possible mutación compensatoria. Acompaña a otras mutaciones	–
Rifampicina (R)	Inhibe ARN polimerasa en síntesis de proteínas	rpoB	Altera la diana del fármaco	95-98%	En general alto nivel	Codones 526 y 531
Etambutol (E)	Inhibe síntesis de arabinogalactano de pared	embB	Altera la diana del fármaco	50-68%	–	Codones 306 y 406
Pirazinamida (Z)	Inhibe síntesis de ácidos micólicos. Altera equilibrio energético transmembrana	pncA	No se altera el profármaco	74-94%	–	Mutaciones a lo largo del gen, sin predominio
Estreptomina (S)	Inhibe proteína ribosomal y 16rRNA en síntesis de proteínas	rpsL	Altera diana ribosomal S12	24%	Alto nivel	Codones 43 y 88
		rrs	16 rRNA	13%	Nivel moderado	Regiones 530 y 516
Amikacina (AK), Kanamicina (KM), Capreomicina (CAP)	Síntesis de proteínas	rrs, tlyA (CAP) eis (KM)	16 rRNA	–	–	Región 1400
Fluorquinolonas (FQ)	Inhibe ADN girasa en síntesis de ADN	gyrA	Altera la diana del fármaco	55-80%	Variable	Codones 90 y 94

Datos de Coll et al.³⁹ y Ramaswamy y Musser⁴⁰.^a La frecuencia varía según el área geográfica.

amplificación genética en el diagnóstico de la TB, ya que la ha hecho accesible a entornos de laboratorio que no pueden acceder a otros métodos. En un estudio de la Foundation for Innovative Diagnostics (FIND)²⁷ se observó una sensibilidad del 98% para casos con microscopía positiva y del 72% para microscopía negativa. El rendimiento aumenta si se estudian 3 muestras en lugar de una (72% una muestra respecto al 90,2% con 3). El aspecto más problemático de este método es el coste económico. FIND negoció con el fabricante un precio reducido para los 145 países con más incidencia, que actualmente se sitúa alrededor de los 10 dólares. El coste en nuestro entorno está en el orden de 60-65 D.

En nuestro entorno la detección de mutaciones de resistencia en pacientes con TB estaría indicada en las situaciones siguientes: TB previa, sobre todo si es reciente, ser contacto de pacientes con resistencia, ser originario de un país con tasa de resistencia superior al nuestro, y fracaso en el tratamiento. Puede realizarse cuando el cultivo es positivo o a partir de muestras con microscopía positiva. Cuando el grado de sospecha sea muy elevado, está indicado realizarla sobre muestras con microscopía negativa. La detección precoz y reducir la morbilidad, la mortalidad y la transmisión a otras personas del círculo del paciente.

Existe la percepción de que los métodos clásicos de tinción y cultivo no pueden progresar más allá de su tinción actual²⁵⁻²⁷, mientras que las técnicas de amplificación genética tendrían aún recorrido, sobre todo mejorando la extracción de ácidos nucleicos de la célula bacteriana, disminuyendo las contaminaciones cruzadas y simplificando la técnica. Parte de estas mejoras las están

aportando los métodos con presentaciones compactas e integradas, como GenXpert. Otra opción interesante es la técnica LAMP (loop mediated isothermal amplification), desarrollada en 2001²⁹. Se basa en la amplificación isotérmica de 6 regiones genéticas utilizando diversos iniciadores. La detección es visual, por la observación de un precipitado blanco de pirofosfato, generado como subproducto durante la amplificación. Se han diseñado variantes para detección fluorescente. Como infraestructura podría requerir únicamente un baño maría o un bloque térmico. Su sensibilidad sería adecuada para muestras con microscopia positiva (> 97%), aunque discreta para muestras con microscopia negativa (alrededor de 48%).

Aun siendo una técnica basada en metodología de cultivo, merece ser comentado el método MODS (microscopic observation drug susceptibility assay). Se basa en un cultivo en medio líquido

7H9 monitorizado a través de observación microscópica (microscopio invertido) observando la formación de cuerdas, que son visibles antes que las colonias, en una media de 8 días. Tecnológicamente es barato y aplicable a países de alta incidencia y bajos recursos³⁰. Su futuro pasa por encontrar un sistema de lectura que permita evitar el microscopio y el tiempo que consume, sobre todo pensando en

el procesamiento de un elevado número de muestras.

Una variante muy interesante de la amplificación son los bio-chips de microarrays de ADN, basados en obtener en una única reacción la amplificación de numerosos genes, identificando o detectando mutaciones de resistencia. Se han desarrollado diversos intentos, pero después de una década no han cuajado, sobre todo debido a limitaciones con la sensibilidad^{31,32}.

Otra limitación importante en el diagnóstico convencional es la ausencia de una muestra universal, como pudiera ser suero u orina, independiente de variaciones y fácil de obtener. Un esfuerzo en este sentido es la detección de lipoarabinomanano (LAM) de la pared

Tabla 2

Prestaciones que pueden ofrecer los laboratorios de microbiología en relación a la tuberculosis	
Prestación	Comentarios
Observación microscópica	Ofrecer a todas las muestras (excepto sangre, ya que los hematiás dificultan una tinción adecuada) Nunca realizar microscopia como única técnica, es poco sensible Proporcionar respuesta en las primeras 24 h. Implicaciones en el diagnóstico y la prevención de la transmisión. Si no es posible, máximo a las 48 h
Cultivo	Todo tipo de muestra es cultivable. Sobre todo incluir cultivos líquidos. Complementar con sólidos aumenta la sensibilidad. El protocolo de incubación dura 42 días
Identificación	Mínimo el complejo M. tuberculosis. Si es posible, las micobacterias no tuberculosas (MNT) más frecuentes
Amplificación génica (por PCR o similar)	Indicado si el grado de sospecha es moderado-alto. Usar junto a microscopia y cultivo, nunca exclusivamente. Utilizar métodos comerciales, son más robustos
Antibiograma de primera línea	Realizar en todos los pacientes con cultivo positivo. Utilizar un sistema semiautomatizado con medio de cultivo líquido. Si se detectan resistencias, repetir para confirmar y/o usar un método de detección de mutaciones de resistencias
Antibiograma de segunda línea	No está al alcance muchos laboratorios. Si no es posible, debe utilizarse un laboratorio de referencia

Detección de mutaciones de resistencia	Indicado en pacientes con tratamiento previo, fracasos clínicos, recidivas resistentes, originarios de países con mayor frecuencia de resistencias. Usar métodos comerciales: GenXpert y/o métodos de LiPA
Pruebas IGRA	Quantiferon o Spot TB en pacientes que se beneficiaran de tratamiento según resultado: contactos de pacientes, inmunosupresión de la inmunidad celular, tratamiento con anti-TNF
Información de resultados	A través del sistema informático. Comunicación personalizada de la microscopia positiva
Declaración de casos	Comunicación personalizada de la muestra positiva (microscopia/cultivo)

Tabla 3

Requerimientos para obtener el máximo rendimiento de las pruebas de microbiología en relación a la tuberculosis

Actividad	Comentarios
Muestras adecuadas	Representativas del lugar de la infección. Cantidad adecuada. Transporte rápido con mínimo de aditivos
Diagnóstico	Diagnóstico diferencial lo más exacto posible. Dividir las muestras excesivamente para satisfacer muchas pruebas disminuye la sensibilidad
Comunicación	Comunicar y comentar los casos más probables para dirigir y optimizar la rentabilidad de las pruebas. Preferentemente antes de obtenerlas

inmunosupresión severa y en pacientes de patologías que requieren tratamiento con fármacos con actividad anti-TNF. Los 2 últimos grupos son tributarios de quimioprofilaxis. Se dispone de 2 tipos

de test: la prueba de tuberculina (PT) y las técnicas de detección de producción de interferón gamma (IGRA). Estas últimas han aparecido durante la reciente década. Hay 2 métodos comerciali-

zados: Quantiferon TB Gold in Tube (Celestis, Australia) y T Spot TB (Oxford Immunotec, Reino Unido). Ambas detectan la producción de interferón gamma por parte de los linfocitos después de ser estimulados con antígenos específicos de M. tuberculosis, como son ESAT-6, CFP-10 y TB7.7, sin que existan reacciones cruzadas con M. bovis BCG ni con las otras micobacterias³⁶. Las 2 ventajas

más importantes respecto a la PT son que no están influidas por la

vacunación BCG y que son más sensibles en pacientes inmunode-

primidos. Quantiferon TB se basa en una técnica de ELISA y T Spot TB es la técnica de ELISPOT, por lo que la primera es sensiblemente más asequible a la mayoría de laboratorios de microbiología. La sensibilidad en el diagnóstico de la TBL es desconocida por la inexistencia de una prueba gold standard con la que comparar.

Por este motivo es difícil saber su sensibilidad respecto a la PT. En 2005, los CDC de Estados Unidos recomendaron la realización de

37

IGRA en lugar de PT. En 2006 el National Institute of Health and

micobacteriana en orina, por técnica de inmunocromatografía³³. Podría detectarse en dos tercios de los pacientes y sería más sensible en pacientes con alta carga bacteriana que por ejemplo en pacientes con estado inmunitario deficiente. Otra potencialidad interesante es la detección de antígenos volátiles de la bacteria en el aliento³⁴, o presentes en las muestras, utilizando detectores químicos, lo

que se ha llamado nari- ces electrónicas³⁵. Aunque necesitan más desarrollo, abren nuevas vías en la búsqueda de métodos diagnósticos, por lo que se inicia un periodo científicamente muy interesante. No obstante, en la práctica actual del día a día es necesario optimizar y rentabilizar al máximo las pruebas diagnósticas, tanto desde la oferta de los laboratorios (tabla 2) como desde la clínica en obtener muestras adecuadas y compartir información relevante (tabla 3).

Diagnóstico de la tuberculosis latente

El diagnóstico de la tuberculosis latente (TBL) o infección tuberculosa está indicado fundamentalmente en 3 situaciones: el estudio de contactos de pacientes con TB, en pacientes con

Clinical Excellence, de Gran Bretaña, recomendó utilizar las pruebas de forma secuencial, primero PT y después IGRA. En España se ha recomendado también la utilización secuencial, realizando inicialmente la PT. Si es positiva y el paciente está vacunado o se desconoce, se recomienda la prueba IGRA. Si es negativa y el paciente está inmunodeprimido, se indica IGRA, por su mayor sensibilidad en este colectivo¹⁹. No está muy clara en la literatura la interpretación de las discrepancias entre la PT y las pruebas IGRA.

IGRA no pueden diferenciar entre TBL y enfermedad TB. Puede tener cierto valor de descarte una prueba negativa en países de baja incidencia y en inmunocompetentes. No obstante, la sensibilidad en los casos de TB es de alrededor del 85% (ligeramente superior para T Spot TB)³⁸. Algunos autores han sugerido que los casos con IGRA positivos tendrían más probabilidad de progresar a enfermedad tuberculosa²⁸.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. WHO Global TB report 2013. Disponible en: who.int/tb/publications/globalreport/en.
2. Informe epidemiológico sobre la situación de la TB en España. Año 2012. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Disponible en: isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/TB-Informe-2012-CNE-web-2.pdf.
3. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378:5
4. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*.
5. Fuentes Ferrer M, Gutiérrez Torres L, Ayala Ramírez O, Rumayor Zarzuelo M, del Prado González N. Tuberculosis of the spine. A systematic review of case series. *Int Orthop*. 2012;36:221–31.
6. Merino P, Candel FJ, Gestoso I, Baos E, Picazo J. Microbiological diagnosis of spinal tuberculosis. *Int Orthop*. 2012;36:233–8.
7. Weng CY, Chi CY, Shih PJ, Ho CM, Lin PC, Chou CH, et al. Spinal tuberculosis in non HIV infected patients. A ten years experience of a medical center in central Taiwan. *J Clin Immunol Infect*. 2010;43:464–9.
8. Pertuiset E, Beudrenil J, Lioté F, Hrusitzky A, Kemiche F, Richette P, et al. Spinal tuberculosis in adults. A study of 103 cases in a developed country, 1980-1994. *Med (Balt)*. 1999;78:309–20.
9. Parsons LM, Somoskovi A, Gutiérrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimuku A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource poor countries: Challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:314–50.
10. Alcaide F, Benítez MA, Escribà JM, Martín R. Evaluation of the Bactec MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol*.
11. Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy T. Clinical evaluation of DIFCO ESP culture System II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*.

12. Brent AJ, Mungo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth S, Levin M, et al. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MTP64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid culture. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4343–6.
13. Kjeldsen MK, Bek D, Rasmussen EM, Priemé A, Thomsen VO. Line probe assay for differentiation within *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evaluation on clinical specimens and isolates including *Mycobacterium pinnipedii*. *Scand J Infect Dis*. 2009;41:635–41.
14. Padilla E, González V, Manterola JM, Pérez A, Quesada MD, Gordillo S, et al. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA *Mycobacteria* in genotype *Mycobacterium* assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with *Mycobacterium* strains. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3083–8.
15. Tortoli E, Pecroni M, Fabio G, Messino M, Fabio A. Commercial DNA probes for *Mycobacterium* incorrectly identify a number of less frequently encountered species. *J Clin Microbiol*. 2010;48:307–10.
16. Tortoli E. Standard operating procedure for optimal identification of *Mycobacteria* using 16S rRNA gene sequencing. *Stand Genomic Sci*. 2010;3:
17. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6:423–32.
18. Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, et al. Advances in TB diagnostics: The Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point of care test. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:349–61.
19. Gonzalez-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enf Infect Microbiol Clin*. 2010;28:297.e1–20.
20. Jiménez MS, Casal M. Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Situación de las resistencias a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* en España. *Rev Esp Quimioter*. 2008;21:22–5.
21. Garrigó M, Aragón LM, Alcaide F, Borrell S, Cardeñosa E, Galán JJ, et al. Multi-center laboratory evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* detection system and the Bactec MGIT 960 system in comparison with the Bactec 460TB system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:488–91.
23. Lin SY, Desmond E, Bonato D, Gross W, Siddiqi S. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3630–4.
24. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A cobercium line probe assay for the rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2005;5:62.
25. Wilson ML. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and drug susceptibility testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137:812–9.
26. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance by use of on-demand near-patient technology. *J Clin Microbiol*. 2010;48:229–37.
27. Boehme C, Nabeta P, Hillemann P, Nicol MP, Shenais S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*. 2010;363:1005–15.
28. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6:413–22.
29. Iwamoto T, Sorobe T, Hayashi K. Loop mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2616–22.
30. Moore DA, Mendoza D, Gilman RH, Evans CA, Hollm Delgado MG, Guerra J, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid reliable diagnostic test for multidrug resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4432–7.
31. Moure R, Tudó G, Medina R, Vicente E, Caldito JM, Codina MG, et al. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a low density DNA array. *Tuberculosis*. 2013;93:508–14.
32. Aragón LM, Navarro F, Heiser V, Garrigó M, Español M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using a non-fluorescent low density DNA microarray. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:825–31.
33. Lawn SD. Point of care detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine for diagnosis of HIV associated tuberculosis. A state of the art review. *BMC Infect Dis*. 2012;12:103.
34. McNerney R, Wondafrash BA, Amena K, Tesfaye A, McCash EM, Murray NJ. Field test of a novel detection device for *Mycobacterium tuberculosis* antigen in cough. *BMC Infect Dis*. 2010;10:161.
35. Kolk A, Hoelscher M, Maboko I, Junq J, Kuijper S, Cauchi M, et al. Electronic technology using sputum samples in diagnosis of patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2010;48:4235–8.
36. Dheda K, Pooran A, Pai M, Miller RF, Lesley K, Booth HC, et al. Interpretation of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific IFN-gamma release assays (T SpOT TB) and factors that may modulate test results. *J Infect*. 2007;55:169–73.
37. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Golberg S, Castro K, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. *United States 2010. MMWR Recomm Rep*. 2010;59:1–25.
38. Latorre I, Altet N, de Souza-Galvao M, Ruiz-Manzano J, Lacombe A, Prat C, et al. Specific *Mycobacterium tuberculosis* T cell responses to RD1-selected peptides for the monitoring of anti-tuberculosis therapy. *Scand J Infect Dis*. 2012;44:161–7.
39. Coll P, Aragón LM, Alcaide F, Espasa M, Garrigó M, Gonzalez J, et al. Molecular analysis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Barcelona. *Microb Drug Resist*. 2005;11:107–14.
40. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998;79:3–29

