

Nuevos métodos para la detección rápida de la resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*

Dihadenys Lemus¹, Ernesto Montoro¹, Miguel Echemendía¹, Sergio L Yzquierdo¹, Anandi Martin², Françoise Portaels², Juan C Palomino²

¹Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", IPK Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, La Lisa, AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba Fax: 204 60 51; E-mail: emontoro@ipk.sld.cu

²Unidad de Micobacterias, Instituto de Medicina Tropical "Príncipe Leopoldo" Amberes, Bélgica

REPORTE

RESUMEN

Los métodos convencionales para la detección de la resistencia en la tuberculosis requieren varias semanas para brindar resultados, mientras que los sistemas comerciales y las herramientas moleculares son costosos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el método de la nitrato reductasa (MNR), los ensayos colorimétricos MTT y la resazurina (RES), como una alternativa para la detección rápida de la resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea. Como referencia se empleó el método de las proporciones (MP). Los puntos de corte obtenidos para los ensayos colorimétricos fueron: mayor que 0.25 µg/mL, mayor que 1 µg/mL, mayor que 4 µg/mL y mayor que 0.25 µg/mL para la isoniacida (INH), la estreptomina (STR), el etambutol (ETH) y la rifampicina (RIF), respectivamente. La sensibilidad fue mayor que 90.0% para todas las drogas y la especificidad, mayor que 88.5% para la INH, la STR y la RIF; para el ETH fue baja (mayor que 57.8%). El MNR mostró buena correlación para las cuatro drogas (sensibilidad y especificidad mayor que 93.7%). La concordancia fue 88.2%, 90.7% y 98.2% para RES, MTT y MNR, respectivamente. Este estudio mostró un alto nivel de concordancia entre los nuevos métodos y el MP para la detección de la resistencia a la INH y a la RIF, por lo que constituye una alternativa que puede ser implementada en laboratorios de escasos recursos.

Introducción

Los métodos convencionales de detección de la resistencia a drogas antituberculosas se basan en el crecimiento de las micobacterias en medios de cultivo que contienen estas drogas y usualmente los resultados demoran varias semanas. Los sistemas comerciales y los métodos moleculares requieren equipos y medios que no son accesibles en la mayoría de los países de recursos escasos, en los que la tuberculosis (TB) y la multidrogorresistencia (MDR) representan un serio problema de salud.

En la actualidad, muchas investigaciones se han encaminado hacia el desarrollo de métodos rápidos y económicos que faciliten la detección de la resistencia, como son los métodos colorimétricos que emplean indicadores de oxidación-reducción. En 1998 fue descrito el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio), y más recientemente, se reportó la aplicación de la resazurina (RES) para estudios de susceptibilidad a drogas de primera y segunda línea [1-3].

Otros métodos que han brindado resultados muy alentadores son el método de la nitrato reductasa (MNR) para estudios de susceptibilidad a drogas de primera línea y la técnica de amplificación de fagos para estudios de susceptibilidad a la rifampicina (RIF) [4, 5].

En Cuba, el fenómeno de la resistencia de micobacterias a drogas antituberculosas no constituye un problema; no obstante, se hacen necesarias herramientas de diagnósticos que brinden resultados confiables de la susceptibilidad y permitan enfrentar el aumento de la MDR a escala mundial. Por ello, el objetivo del presente estudio, en una primera etapa, fue aplicar el método de la nitrato reductasa y los ensayos colorimétricos MTT

y resazurina (RES) para la detección de la resistencia a la RIF, droga que constituye un importante marcador de la MDR y, posteriormente, evaluar estas técnicas para la detección de la resistencia a otras drogas antituberculosas de primera línea.

Los resultados de esta investigación merecieron el Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba, en 2004 con el título: "Baja circulación de cepas *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes en Cuba. Nuevos métodos para detección de resistencia".

Materiales y métodos

Cepas

Se estudiaron 120 cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la colección del Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias del IPK. Para detectar la resistencia a la RIF se emplearon 20 cepas y el resto se evaluaron frente a las cuatro drogas antituberculosas de primera línea. Se incluyeron las cepas de referencia: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) sensible a la isoniacida (INH), la estreptomina (STR), el etambutol (ETH) y la RIF, las cepas ATCC 35822, ATCC 35820, ATCC 35837 y ATCC 35838, resistentes a la INH, a la STR, al ETH y a la RIF, respectivamente.

Drogas antituberculosas

Se preparó una solución (1 000 µg/mL) en agua destilada estéril para la INH, la STR y el ETH. En el caso de la RIF se empleó una mezcla (1:2) de metanol y agua destilada estéril para lograr una mejor disolución.

1. Abate G, Mshana RN, Miorner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:1011-6.

2. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Agent Chemother 2002;46:2720-2.

3. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second line drugs: rapid, simple and inexpensive method. J Antimicrob Agent Chemother 2003;47:3616-9.

4. Ängeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol 2002;40:553-5.

5. McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, Nye PM, Stoker NG. Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. J Antimicrob Chemother 2000;4:69-75.

MTT

Una solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio a una concentración de 5 mg/mL se preparó en PBS, se filtró y mantuvo a 4 °C protegida de la luz. Para realizar la solubilización del fomazán (cristales de MTT reducidos), se utilizó una mezcla 1:1 de duodecil sulfato de sodio al 20% y N,N-dimetilformamida al 50%.

Resazurina

Se preparó una solución de RES al 0.01% en agua destilada estéril, se filtró y conservó a 4 °C protegida de la luz.

Método de la nitrato reductasa

Para la realización del MNR se siguió la metodología descrita por Ängeby *et al.* en el año 2002 [4]. Se empleó el medio Löwenstein-Jensen (LJ) con una concentración de KNO₃ de 1 000 µg/mL. Para cada droga se utilizó la misma concentración crítica empleada en el método de las proporciones (MP). La turbidez del inóculo se ajustó tomando como referencia el tubo 1 de la escala de McFarland y, seguidamente, se diluyó 1:10 en PBS. Los tres tubos controles se inocularon con 200 µL de la suspensión bacteriana diluida y los tubos con droga con 200 µL del inóculo similar al tubo 1 de McFarland. La incubación se realizó a 37 °C y pasados los 7 días se reveló uno de los tubos controles y se añadieron en él 500 µL de la mezcla de reactivos, formada por una parte de ácido clorhídrico al 50%, dos partes de sulfanilamida 0.2% y dos partes de N-1-naftiletilendiamina dihidroclorhidrato al 0.1%. En aquellas cepas en las cuales ocurrió desarrollo de color (rosado) se revelaron los tubos con droga; de lo contrario, los tubos se reincubaron para realizar el revelado pasados los 10 y/o 14 días de incubación. Una cepa se consideró resistente cuando el color desarrollado en el tubo con droga fue más intenso que en el tubo control; de lo contrario, se consideró sensible.

Ensayos colorimétricos

Para la realización de los ensayos colorimétricos MTT y RES se siguieron las metodologías descritas por Abate *et al.* [1] y por Palomino *et al.* [2]. Se depositaron 100 µL del medio Middlebrook 7H9 en cada uno de los 96 pocillos de una placa estéril y se realizaron diluciones dobles seriadas de cada una de las drogas hasta alcanzar el rango de concentración de trabajo establecido para cada una de ellas, 1-0.0312 µg/mL, 8-0.25 µg/mL, 32-1 µg/mL y 2-0.0625 µg/mL para INH, STR, ETH y RIF, respectivamente. Cada uno de los pocillos recibió 100 µL del inóculo que consistió en una dilución 1:20 de una suspensión bacteriana ajustada según la turbidez del tubo 1 de la escala de McFarland. Para cada cepa evaluada se incluyeron pocillos controles de crecimiento. Los pocillos de la periferia de la placa recibieron 200 µL de agua destilada estéril para evitar la evaporación durante la incubación. Las placas se sellaron e incubaron a 37 °C, y pasados los 7 días de incubación, se reveló el ensayo y se añadieron 10 µL de MTT o 30 µL de RES. Un cambio de color de azul a rosado o de amarillo a violeta indicó la reducción de la RES o de la MTT, respectivamente, y por tanto, la viabilidad celular. La concentración mínima inhibitoria

se definió como la menor concentración de la droga en que no ocurrió cambio de color.

Método de las proporciones

Para la realización del MP se empleó la metodología descrita por Canetti *et al.* 1963 [6], con el empleo de las concentraciones críticas recomendadas para cada droga: 0.2 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL y 40 µg/mL para INH, STR, ETH y RIF, respectivamente.

Análisis estadístico de los resultados

El procesamiento de los resultados se realizó mediante el programa estadístico MEDCALC y se emplearon como referencia los resultados obtenidos mediante el MP. Para cada droga se construyeron las curvas ROC (curva de las características operativas para el receptor) para determinar los puntos de corte para los ensayos colorimétricos y calcular los valores de sensibilidad, de especificidad y el coeficiente de concordancia.

Resultados

La aplicación de los ensayos colorimétricos y el MNR en las 20 cepas estudiadas, permitió verificar la utilidad de las nuevas técnicas para la detección rápida de resistencia de las micobacterias a la RIF. Se obtuvo el 100% de concordancia al comparar los resultados con los obtenidos mediante el método de referencia [7].

Al estudiar las 100 cepas de *M. tuberculosis*, los puntos de corte obtenidos mediante los ensayos RES y MTT fueron mayor que 0.25 µg/mL, mayor que 1 µg/mL, mayor que 4 µg/mL y mayor que 0.25 µg/mL para INH, STR, ETH y RIF, respectivamente. Los valores del área bajo la curva no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos, para una $p > 0.05$, con un intervalo de confianza del 95%.

En la tabla 1 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para cada una de las drogas mediante los ensayos colorimétricos y el MNR. Con la aplicación de los métodos colorimétricos se apreciaron valores de sensibilidad y especificidad elevados para INH y RIF, mientras que la especificidad fue baja para STR y ETH debido a un gran número de resultados falsos positivos. Con el MNR, estos parámetros fueron superiores al 93.7% para todas las drogas, y ambos fueron del 100% para la RIF. La concordancia global alcanzada fue 88.2%, 90.7% y 98.2% para el ensayo RES, MTT y MNR, respectivamente [8].

Discusión

Actualmente existe una gran variedad de métodos para evaluar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a las drogas antibacilares, pero ninguno es perfecto y sus resultados aún no satisfacen a los clínicos ante la necesidad de tratamientos efectivos para evitar la diseminación de cepas resistentes [9]. Desde hace varios años se dispone de técnicas convencionales basadas en el cultivo de micobacterias, que son utilizadas en la mayoría de los laboratorios. Entre estas se destaca el MP, descrito por Canetti *et al.* en 1963 [6], que en la actualidad continúa siendo la técnica de referencia para los estudios de susceptibilidad en TB. Estas técnicas son muy laboriosas y tienen el inconveniente de requerir de 4 a 6 semanas de incubación para poder interpretar los resultados, debido al crecimiento lento de *M. tuberculosis*.

6. Canetti G, Rist N, Grosset JM. Measure de la sensibilité du bacille aux drogues antibacilaire pour la methode des proportions, methodologie, critere du resistance, results, interpretation. *Tuberc Pneumol* 1963;27:217-72.

7. Lemus D, Martin A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:130-3.

8. Montoro E, Lemus D, Echেমendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtiter assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:500-5.

9. Kim SJ. Series Drug susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J* 2005;25:564-9.

El creciente aumento de los casos de TB MDR a escala mundial y su implicación en el control de esta enfermedad, así como el tiempo que necesitan las técnicas convencionales basadas en el cultivo de micobacterias para brindar resultados, han motivado el desarrollo de técnicas rápidas de detección de resistencia a drogas antituberculosas. Entre las nuevas técnicas se destacan las fenotípicas, las cuales detectan signos tempranos del metabolismo celular. Varias de ellas, como el sistema radiométrico BACTEC y el MGIT están disponibles comercialmente y muestran resultados comparables con los del MP, pero son sumamente costosas por depender del suministro de medios de cultivo y por el equipamiento que necesitan. BACTEC tiene, además, la desventaja de producir desechos radiactivos que son peligrosos para la salud del hombre [10, 11].

El conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a las drogas de la TB, junto a la disponibilidad de técnicas moleculares, ha permitido desarrollar métodos genotípicos para la detección de la resistencia. Entre las principales ventajas de estos métodos se destaca que los resultados se pueden obtener en 24 horas, no requieren del crecimiento de *M. tuberculosis*, lo cual reduce los riesgos asociados a la bioseguridad, y pueden ser aplicados a muestras clínicas. Desafortunadamente, su empleo se ve limitado debido al costo de los equipos y a las técnicas laboriosas, por lo que son inaccesibles para los países de escasos recursos económicos, los cuales presentan el mayor porcentaje de resistencia de la TB a las drogas antituberculosas.

A pesar de que las técnicas colorimétricas son una alternativa de fácil ejecución que brinda resultados confiables para INH y RIF, drogas principales del tratamiento y que definen la MDR, se siguen evaluando otras técnicas con la intención de lograr un método accesible a todos los laboratorios y que sea confiable para evaluar todas las drogas antituberculosas.

En 2002 se reportó el MNR para detectar la resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea, con el empleo del medio LJ y las drogas a la misma concentración que utiliza el MP. Los resultados se compararon con los obtenidos mediante el sistema radiométrico BACTEC y se obtuvieron en un período de 7 a 14 días. Ángeby *et al.* reportaron una sensibilidad mayor que el 95.0% para INH, STR y RIF y del 75.0% para ETH y una especificidad mayor que el 96.0% para INH, ETH y RIF y del 83.0% para STR [4].

En el presente estudio, al aplicar el MNR para determinar la resistencia a INH, SM, EMB y RMP, se alcanzaron elevados valores de sensibilidad (mayor que el 93.7%) y de especificidad (mayor que el 98.0%) para las cuatro drogas evaluadas, con lo cual se alcanzó una concordancia global del 98.2%. Estos resultados son comparables con los obtenidos mediante el MP para todas las drogas. Ello sugiere que emplear el medio LJ en el MNR y que las drogas estén bajo las mismas condiciones que en el MP (técnica de referencia), son factores que favorecen la obtención de los resultados anteriormente expuestos.

Los resultados del MNR también se han comparado con el MP en agar, y se ha alcanzado el 100% de sensibilidad y de especificidad para INH y RIF [12]. Otra alternativa de aplicación del MNR fue descrita por Syre *et al.*, en 2003 [13], con el empleo del medio

Tabla 1. Parámetros estadísticos obtenidos en 100 cepas de *M. tuberculosis*.

Drogas Anti-TB	Sensibilidad (%)			Especificidad (%)			Concordancia (%)		
	RES	MTT	MNR	RES	MTT	MNR	RES	MTT	MNR
INH	100	100	95.6	96.4	96.4	100	98.0	98.0	98.0
STR	93.8	91.7	93.7	88.5	88.5	98.0	91.0	90.0	96.0
ETH	94.1	94.1	100	57.8	71.1	97.8	64.0	75.0	99.0
RIF	100	100	100	98.4	100	100	99.0	100	100

líquido Middlebrook 7H9. Estos autores utilizaron este ensayo para detectar cepas resistentes a INH y RIF y obtuvieron una sensibilidad del 100 y del 94.0% y una especificidad del 95.0 y del 100%, respectivamente, al comparar los resultados con los obtenidos mediante el sistema radiométrico BACTEC.

Para que las nuevas técnicas de detección de resistencia a las drogas puedan sustituir a los métodos convencionales en el futuro, se requieren estudios de reproducibilidad y la obtención de valores aceptables de sensibilidad y especificidad. Además, deben realizarse investigaciones para comprobar el funcionamiento de estas técnicas bajo diferentes condiciones de trabajo. Como paso inicial para lograr un ensayo que pueda sustituir a las técnicas de referencia, se han diseñado estudios multicéntricos internacionales en los cuales se ha evaluado un mismo panel de cepas de *M. tuberculosis* con susceptibilidad conocida, siguiendo igual metodología de trabajo.

Recientemente, el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias participó en un estudio multicéntrico internacional en el que participaron cuatro países de Latinoamérica y el laboratorio coordinador fue la Unidad de Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical "Príncipe Leopoldo" de Amberes, Bélgica. Con este estudio se determinó la susceptibilidad a las cuatro drogas antituberculosas de primera línea tras aplicar el MNR y los ensayos colorimétricos MTT y RES. El método de referencia para el análisis de los resultados fue el MP en LJ. Con la aplicación de los ensayos colorimétricos se alcanzaron valores de sensibilidad y especificidad mayor que el 91.7% y mayor que el 93.3%, para INH y RIF, respectivamente [14]. El análisis de los resultados del MNR, permitió conocer que para INH, RIF y ETH los resultados de sensibilidad oscilaron entre el 86.6 y el 100%, mientras que la especificidad fue del 100% para RIF y superior al 94.4% para INH y ETH, en todos los laboratorios [15].

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo y los reportes internacionales hasta la fecha, estas técnicas brindan nuevas posibilidades: rapidez, fácil ejecución y resultados confiables, útiles para evaluar drogas de segunda línea, así como para el diagnóstico directo a partir de muestras clínicas. Estos métodos pueden convertirse en una herramienta importante aplicable en países con escasos recursos, ya que solo requieren el equipamiento microbiológico mínimo para su funcionamiento.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Proyecto INCO-Acción Concertada *Improve Diagnosis and drug resistance detection in Latin America*, ICA4-CT-2001-10087.

10. Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, McClatchy JK *et al.* Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:689-96.

11. Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portals F. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:344-8.

12. Coban AY, Birinci A, Ekinçi B, Durupinar B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:106-8.

13. Syre H, Phyu S, Sandven P, Bjorvatn B, Grewal HMS. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5173-7.

14. Martin A, Morcillo N, Lemus D, Montoro E, Da Silva Telles MA, Simboli N *et al.* Multicenter evaluation of colorimetric assays using MTT and resazurin for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*. In press 2005.

15. Martin A, Montoro E, Lemus D, Simboli N, Morcillo N, Velasco M *et al.* Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. In press 2005.