

Premio Bienal FAB A 2012

Meta-análisis: diagnóstico de tuberculosis resistente por técnicas no comerciales de amplificación*

Meta-analysis: drug-resistant tuberculosis diagnosis by non commercial amplification techniques

Meta-análise: diagnóstico de tuberculose resistente por técnicas não comerciais de amplificação

► Belén Rocío Imperiale¹

¹ Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Área Farmacia y Bioquímica, Microbiología.

* Lugar de trabajo: Hospital Dr. Antonio A. Ce-trángolo (Laboratorio de Referencia del Programa de Control de la Tuberculosis de la Provincia de Buenos Aires). Italia 1750, Florida, Vicente López (CP: 1602). Argentina.

Resumen

La emergencia de tuberculosis (TB) multidrogo y extensivamente-resistente reactivó la necesidad de contar con métodos rápidos para detectar resistencia a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF). Por tal motivo, los objetivos de este trabajo fueron evaluar, mediante meta-análisis, la exactitud global y la posible utilidad de métodos caseros basados en PCR para la detección rápida de resistencia a INH y RIF en aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. La búsqueda bibliográfica incluyó Medline/PubMed, BioMedLib. Para estimar la variabilidad entre los resultados de los estudios y el grado de exactitud diagnóstica de los métodos utilizados se realizaron gráficos "forest plot" y curvas SROC (*summary receiver operating characteristic*) mediante el software Meta-DiSc. Fueron seleccionados 15 estudios, conteniendo 1311 aislamientos resistentes a INH y 953 a RIF. Para la detección de resistencia a INH la sensibilidad y especificidad globales fueron: 84,0% y 96,0% respectivamente, mientras que para la detección de resistencia a RIF esos valores fueron 92,0% y 97,0%. Además, estos métodos mostraron alta exactitud diagnóstica, con áreas bajo la curva SROC > 0,9. La alta sensibilidad y especificidad obtenidas con métodos moleculares caseros sugieren que algunos de ellos podrían ser aplicados para el diagnóstico rápido de resistencia a partir del aislamiento de *M. tuberculosis*.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis* * tuberculosis * sensibilidad a drogas * rifampicina * isoniacida * métodos moleculares * reacción en cadena de la polimerasa * métodos rápidos

Summary

Due to the emergency of multidrug and extensively-drug resistant tuberculosis, molecular methods for a rapid detection of isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) resistance are urgently needed. For that reason, the objectives

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Incorporada al Chemical Abstract Service.
Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

of this study were to assess through a meta-analysis the global accuracy and the utility of the home-made molecular methods based in PCR for INH and RIF resistance rapid detection from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. The articles were searched using Medline/PubMed, BioMedLib. The variability among different studies results and the diagnostic accuracy of the used methods were estimated by forest plot and summary receiver operating characteristic (SROC) curves performed with software Meta-DiSc. Fifteen studies were chosen: 1311 containing INH resistant and 953 RIF resistant isolates. The pooled sensitivity and specificity for INH resistance detection was 84.0% and 96.0% respectively, while 92.0% and 97.0% were the pooled values for RIF resistance detection. Besides, these methods showed a high diagnostic accuracy, with the area under the SROC curve >0.9. Due to the high sensitivity and specificity obtained with the home-made molecular methods, some of these tests could be applied for a rapid detection of *M. tuberculosis* drug resistance in clinical practice.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* * tuberculosis * drug susceptibility * rifampicin * isoniazid * molecular methods * polymerase chain reaction * rapid methods

Resumo

A emergência de tuberculose (TB) multidrogas e extensivamente-resistente reativou a necessidade de contar com métodos rápidos para detectar resistência à isoniazida (INH) e rifampicina (RIF). Por isso, o objetivo deste trabalho foi a avaliação através da meta-análise, da exatidão global e da possível utilidade de métodos caseiros baseados em PCR para detectar rapidamente a resistência a INH e RIF em isolamentos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. A pesquisa bibliográfica incluiu Medline/PubMed, Bio MedLib. Para estimar a variabilidade entre os resultados dos estudos e o grau de exatidão diagnóstica dos métodos utilizados, foram realizados gráficos "forest plot" e curvas SROC (summary receiver operating characteristic) com o software Meta-Disc. Foram selecionados 15 estudos, contendo 1311 isolamentos resistentes a INH e 953 a RIF. Para a detecção de resistência a INH, a sensibilidade e especificidade globais foram 84,0% e 96,0% respectivamente, enquanto que para a detecção de resistência a RIF esses valores foram de 92,0% e 97,0%. Além disso, os mesmos métodos mostraram elevada exatidão diagnóstica, com áreas inferiores à curva SROC >0,9. A elevada sensibilidade e especificidade obtida através de métodos moleculares caseiros sugere que alguns deles poderiam ser aplicados para o diagnóstico rápido de resistência a partir do isolamento de *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis* * tuberculose * sensibilidade às drogas * rifampicina * isoniazida * métodos moleculares * reação em cadeia da polimerase * métodos rápidos

Introducción

La tuberculosis (TB) y especialmente la TB multidrogo-resistente (TB MDR), causada por *Mycobacterium tuberculosis* simultáneamente resistentes a isoniácida (INH) y rifampicina (RIF) (1)(2) y la TB extensivamente resistente (TB XDR), que además de ser MDR presenta resistencia agregada a ampicacina, capreomicina o kanamicina más una fluoroquinolona, están propagándose mundialmente y convirtiéndose en problemas de salud muy serios (1)(2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año ocurren aproximadamente 500.000 nuevos casos de TB MDR (3) de los cuales un 5-7% de los casos terminarán siendo XDR (4)(5). Estas cifras alarmantes llevan a la urgente necesidad de contar con métodos rápidos de detección de resistencia a los principales fármacos con actividad anti-tuberculosa (anti-TB) especialmente para ser aplicados en aquellos pacientes con un alto riesgo de tener TB MDR/XDR, como ocu-

rrer, por ejemplo, en casos de transmisión nosocomial de cepas resistentes, de co-infección con el VIH o en inmunosuprimidos en general (6).

La INH y RIF son las principales drogas anti-tuberculosas de primera línea que se usan en los regímenes estándares para el tratamiento de la TB (7). La resistencia a INH es generalmente adquirida en una primera instancia y es el primer paso para desarrollar TB MDR. En la mayoría de las regiones del mundo, la resistencia a RIF (RIF-R) es un excelente marcador de TB MDR, ya que más del 90,0% de las cepas de *M. tuberculosis* RIF-R también presentan INH-R (8)(9). Además, la INH también es la droga utilizada para la quimioprofilaxis en niños que son contactos de casos de TB sensibles (10).

Ha sido previamente descrito que la drogo-resistencia (DR) en *M. tuberculosis* es causada principalmente por mutaciones puntuales en ciertos genes (11). La principal mutación asociada a INH-R es la del codón 315 del gen *katG* de *M. tuberculosis*, seguida por la mutación del sitio -15 del promotor del gen *inhA* (12-16). Se-

gún lo hallado internacionalmente, las mutaciones ocurridas dentro de la región de 81 pares de bases llamada "hot spot region" del gen *rpoB* de *M. tuberculosis*, principalmente en los codones 516, 526 y 531, son responsables de aproximadamente el 95-97% de la RIF-R (17-19).

Durante los últimos años, un gran número de estudios ha evaluado el uso de métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos (AAN) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección rápida de *M. tuberculosis* resistente a drogas, principalmente a INH y RIF. Estos estudios se han llevado a cabo en distintas zonas geográficas y han incluido los genes antes mencionados (15) (20-23). Estos métodos han surgido como alternativas prometedoras para el diagnóstico rápido de la enfermedad y su resistencia.

Los sistemas diagnósticos utilizando la AAN han sido separados en dos grupos: "comerciales" o "caseros" (24-28). Dentro de los métodos comerciales para la detección molecular de resistencia a RIF se encuentran el INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Bélgica) (8) (29) (30) utilizado mayormente en países de Europa y el GenoType MTBDR_{plus} (Hain Lifescience, GmbH, Alemania), que también detecta resistencia a INH, aprobado recientemente por el ANMAT y utilizado ampliamente a nivel mundial (31-33). Los métodos caseros son utilizados principalmente en países en vías de desarrollo, como es el caso de la Argentina donde las posibilidades de adquirir los equipos comerciales y mantener su provisión constante en el tiempo son escasas (11) (15) (16) (19) (34-36). En general, los métodos caseros basados en AAN tienen una sensibilidad y especificidad más variable que las que se obtienen con los métodos comerciales (31) (37) (38).

Los estudios sistemáticos de revisión son importantes para resumir evidencia sobre la exactitud de las pruebas diagnósticas y, generalmente, preceden a su incorporación en la práctica clínica, proporcionando una visión global y sintética del rendimiento de estas pruebas y permitiendo la elección por parte del futuro usuario. Por lo expuesto, se puede decir que este artículo de revisión tiene como objetivos evaluar la exactitud global y la utilidad de los métodos moleculares no comerciales de AAN mediante PCR (MMNC-PCR) para la detección rápida de resistencia a INH y RIF en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y examinar su utilidad como herramientas útiles destinadas a la detección preliminar de TB MDR principalmente en aquellos países con bajos a medianos ingresos, en los cuales ya han sido implementados.

En Argentina y en general en los países en vías de desarrollo, la detección de resistencia se basa principalmente en los métodos fenotípicos de pruebas de sensibilidad a drogas (PS). Estos métodos están basados en el desarrollo microbiano en medios de cultivo y demoran entre 15 a 42 días a partir de la obtención del primo-cultivo, ya que el tiempo de generación del *M. tuberculosis* oscila entre 18-24 horas (39) (40). Métodos rápidos para la detección de DR para evitar tratamientos

anti-TB erróneos así como para prevenir la transmisión de formas resistentes de la enfermedad en la comunidad, son urgentemente necesarios.

Materiales y Métodos

MÉTODOS DE LOCALIZACIÓN

La fuente primaria de información para esta revisión fue seleccionada mediante búsquedas en distintas bases de datos, como ser Medline/PubMed (NCBI), BioMedLib. También se accedió a la bibliografía mediante la intranet de los proyectos de investigación financiados por la Comisión Europea "OLIGOCOLOR y FAST-XDR DETECT" (Proyecto N°: C. E. 516028 y C. E. 201690). En forma complementaria fue realizada una búsqueda en libros de resúmenes de Congresos y se revisó la bibliografía de los seleccionados, para localizar otras publicaciones de interés.

Las palabras claves utilizadas para la búsqueda fueron "Mycobacterium tuberculosis", "tuberculosis", "sensibilidad a drogas", "resistencia", "rifampicina", "isoniazida", "métodos", "moleculares", "métodos rápidos", "reacción en cadena de la polimerasa". La búsqueda incluyó artículos desde el año 1996 sin limitaciones geográficas. Se incluyeron manuscritos escritos en español e inglés. Fueron revisados todos los manuscritos sobre MMNC-PCR para la detección de resistencia a INH y/o RIF de *M. tuberculosis*.

SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS

Criterios de inclusión: fueron seleccionados artículos en los que los autores detectaron aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH y/o RIF mediante MMNC-PCR y compararon los resultados hallados con los obtenidos con un método de referencia (método de las proporciones, MGIT 960 SIRE, por ejemplo).

Criterios de exclusión: no fueron incluidos estudios basados en PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). Además se excluyeron estudios donde el material de estudio no correspondió a aislamientos clínicos sino que se partió desde esputos con baciloscopia positiva.

ANÁLISIS DE LOS DATOS Y SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS

Los datos más importantes correspondientes a cada uno de los artículos analizados fueron presentados en las Tabla I y II, conteniendo el número de aislamientos clínicos totales, números de aislamientos sensibles y resistentes a INH y RIF, MMNC-PCR utilizado para determinar DR, método fenotípico de referencia utilizado para la determinación de susceptibilidad a drogas de primera línea, valores de sensibilidad y especificidad hallados.

Tabla 1. Características de los estudios para el análisis de los métodos de detección de resistencia a Isoniacida

Año	Revista	Autor principal	Origen de los aislamientos	Método	Sistema de detección	N aislamientos clínicos				Método de Referencia	SE (%)	ES (%)
						S	INH	R	MDR			
2012	J Clin Microbiol	Engström A	Europa, Asia, África, Argentina	PCR	Pirosecuenciación	75	215			MGIT 960	94,4	100,0
2011	Int J Tuberc Lung Dis	Tho D	Vietnam	MAS-PCR	EGA	50	100	0		MPLJ	90,0	100,0
2011	Int J Tuberc Lung Dis	Imperiale B	Argentina	MAS-PCR	EGA	47	66	69		MPLJ MGIT960	83,7	100,0
2010	J Clin Microbiol	Hernandez-Neuta I	Argentina, Suecia, Latvia	MAS-PCR	RLBH	31	12	45		MPLJ MGIT 960 BACTEC 460	87,7	97,7
2009	J Clin Microbiol	Bravo L	Filipinas	PCR	Pirosecuenciación	33	15	54		BBL sensi-disk PM	63,8	100,0
2008	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	Marttila H	Finlandia, Rusia	PCR	Pirosecuenciación	79	53			M7H10 agar Disk	81,1	100,0
2005	Diagnostic Microbiol Inf Dis	Yang Z	Turquía	MAS-PCR	EGA	79	20	75		BACTEC 460	81,1	97,5
2005	Antimicrob Agents Chemother	Herrera-León L	España	MAS-PCR	EGA	50	297			MPLJ	68,7	100,0
2004	J Clin Microbiol	Nikolayevsky V	Rusia	MAS-PCR	Macroarreglos-RLBH	73	40	120		MPLJ	94,4	74,0
2002	J Clin Microbiol	Mokrousov I	Rusia	PCR-RFLP	EGA	15	0	65		MCA	100,0	100,0
2002	J Clin Microbiol	Mokrousov I	Rusia	MAS-PCR	EGA	15	0	65		MCA	100,0	100,0

N: número, S: sensible; R: resistente; INH: isoniácida; MDR: multidrogo-resistente; SE: sensibilidad, ES: especificidad; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; MAS-PCR: PCR múltiple alelo específica; RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción; EGA: electroforesis en gel de agarosa; RLBH: hibridación en línea reversa; MPLJ: método de las proporciones en Löwenstein-Jensen; M7H10: Middlebrook 7H10; MCA: método de concentración absoluta

Tabla II. Características de los estudios para el análisis de los métodos de detección de resistencia a Rifampicina

Año	Revista	Autor principal	Origen de los aislamientos	Método	Sistema de detección	N aislamientos clínicos				Método de Referencia	SE (%)	ES (%)
						S	R/F	R	MDR			
2012	J Clin Microbiol	Ao W	S/E	MAS-PCR	RLBH	11	25			S/E	96,0	100,0
2012	J Clin Microbiol	Engström A	Europa, Asia, África, Argentina	PCR	Pirosecuenciación	81	209			MGIT 960	94,7	100,0
2011	Int J Tuberc Lung Dis	Imperiale B	Argentina	MAS-PCR	EGA	47	11	69		MPLJ MGIT960	80,0	100,0
2010	J Clin Microbiol	Hernandez-Neuta I	Argentina, Suecia, Latvia	MAS-PCR	RLBH	31	12	45		MPLJ MGIT960	93,0	93,0
2009	J Clin Microbiol	Bravo L	Filipinas	PCR	Pirosecuenciación	43	5	54		BACTEC 460 BBL sensi-disk PM	96,7	95,6
2008	Clin Microbiol infect	Prammanan T	Tailandia	MAS-PCR	EGA	113	103			MPLJ	94,2	100,0
2008	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	Marttila H	Finlandia, Rusia	PCR	Pirosecuenciación	88	39			M7H10 agar Disk	97,4	100,0
2007	J Appl Microbiol	Sheng J	China	PCR-SSCP	EGP	7	3	46		M7H10 agar Disk	95,9	100,0
2006	J Clin Microbiol	Jureen P	S/E	PCR	Pirosecuenciación	26	3	24		BACTEC 460	100,0	96,2
2005	Diagn Microbiol Infect Dis	Yang Z	Turquía	MAS-PCR	EGA	88	11	75		BACTEC 460	93,0	98,9
2004	J Clin Microbiol	Nikolayevsky V	Rusia	MAS-PCR	Macroarreglos-RLBH	111	2	120		MPLJ	89,3	83,8
2002	Int J Tuberc Lung Dis	Morcillo N	Argentina Holanda	PCR	RLBH	158	2	95		MPLJ MGIT960	92,8	100,0

N: número, S: sensible; R: resistente; R/F: rifampicina; MDR: multidrogo-resistente; SE: especificidad; S/E: sin especificar; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; MAS-PCR: PCR múltiple alelo específica; SSCP: *single strand conformation polymorphism*; EGA: electroforesis en gel de agarosa; EGP: electroforesis en gel de poliacrilamida; RLBH: hibridación en línea reversa; MPLJ: método de las proporciones en Löwenstein-Jensen; M7H10: Middlebrook 7H10.

Un revisor inspeccionó el cumplimiento de los criterios de inclusión de los estudios seleccionados y comprobó la exactitud en los datos extraídos.

Para comenzar la realización del análisis global de los estudios incluidos en la revisión debe ser cuantificado el grado de heterogeneidad entre los resultados obtenidos con cada método utilizado en cada uno de los estudios que están siendo analizados. La variabilidad entre los resultados de los estudios puede ser debida a las diferencias reales de planteamiento y ejecución entre los estudios incluidos, o a otras causas. La heterogeneidad estadística trata de cuantificar la variabilidad del resultado medido en los diferentes estudios con respecto al resultado global promedio, y determinar si dicha variabilidad es superior a la que sería esperable por puro azar (41). Para evaluar el grado de variabilidad entre los resultados de los diferentes estudios se realizó un análisis estadístico de los datos mediante el *software* Meta-DiSc (versión 1.1.1, en español) y se estimó el grado de exactitud diagnóstica de los métodos utilizados en los distintos estudios (42). Para el análisis de los resultados se recolectaron datos de sensibilidad y especificidad de cada uno de los estudios. La sensibilidad, definida como “verdaderos positivos” (VP) fue calculada como la proporción de aislamientos determinados como resistentes a INH y/o RIF por el método de referencia fenotípico que fue correctamente identificada como resistente a INH y/o RIF mediante el método de detección de DR basado en PCR. La especificidad, o “falsos positivos” (FP) fue definida como la proporción de aislamientos calificados como sensibles por el método fenotípico de referencia, correctamente identificados por el MMNC-PCR (42)(43).

El grado de variabilidad entre los estudios considerados se evaluó mediante la realización de gráficos de tipo “forest plot”. Estos gráficos son utilizados para representar los resultados del meta-análisis, los cuales muestran el efecto estimado de cada estudio con el valor obtenido combinando los resultados de todas las investigaciones, acompañados por sus respectivos intervalos de confianza (41)(43). En este meta-análisis los gráficos *forest plot* fueron utilizados para la representación de la sensibilidad y la especificidad para la determinación de DR obtenida en cada uno de los estudios. Además, este tipo de gráfico permitió también obtener un valor de especificidad y sensibilidad global para todos los métodos moleculares incluidos en la revisión.

La exactitud y *performance* general de los MMNC-PCR fue evaluada mediante el método de la curva SROC (*summary receiver operating characteristic*). El método de SROC grafica sensibilidad *versus* 1-especificidad, indicando la relación entre los valores de sensibilidad y especificidad de cada uno de los estudios incluidos y mostrando el punto en que ambos valores son los mayores para cada estudio. El área bajo la curva representa un resumen general de la exactitud diagnóstica de los MMNC-PCR (42).

Resultados

SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS

Como consecuencia de la búsqueda bibliográfica realizada, fueron seleccionados 15 estudios relevantes que utilizaron un sistema basado en PCR para la detección rápida de DR. Diez de los artículos utilizaron métodos para detectar INH-R (uno de ellos utilizó dos métodos distintos) mientras que hubo 12 que detectaron resistencia a RIF en *M. tuberculosis*.

DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS SELECCIONADOS

Todos los estudios incluidos en el meta-análisis probaron un método molecular, no comercial, de detección de resistencia a INH y/o RIF basado en PCR y a partir de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. En las Tablas I y II se muestran las características de cada uno de los estudios. Los métodos de referencia utilizados para la determinación de resistencia a drogas fueron muy variados, siendo el más utilizado el de proporciones en Löwenstein-Jensen (MPLJ), pero los métodos BACTEC 460, MGIT 960 SIRE, método de concentración absoluta, y discos de agar fueron también utilizados. Todos estos métodos se encuentran aprobados y son recomendados por la OMS como pruebas fenotípicas de sensibilidad a drogas anti-TB de primera línea (39)(40)(44).

Los métodos moleculares analizados en este artículo fueron todos basados en PCR, tal como lo indican los criterios de inclusión. Algunos realizaron una PCR simple, de un único fragmente a la vez, y otros realizaron PCR múltiples alelo específicas (MAS-PCR) en las cuales se realizó la amplificación de varios fragmentos de genes simultáneamente y en las mismas condiciones de reacción (15)(16)(22)(28)(45). Luego de la PCR se utilizaron distintos sistemas de detección según el estudio, dentro de los cuales se pueden nombrar la electroforesis en gel de agarosa/poliacrilamida, hibridación en línea reversa, macro-arreglos, pirosecuenciación (15)(18)(28)(34-36)(46).

El objetivo de los estudios seleccionados para la revisión fue coincidente en todos y consistió en describir, desarrollar y evaluar un MMNC-PCR para el diagnóstico rápido de TB DR y/o MDR.

El número total de aislamientos de *M. tuberculosis* estudiados fue de 3.917, siendo 1311 INH-R y 953 RIF-R, mientras que 596 aislamientos sensibles a la INH y 1057 aislamientos sensibles a RIF fueron también analizados.

Los estudios seleccionados incluyeron aislamientos provenientes de varios países representando América, Asia, África y Europa. Entre los países representados se encontraron Argentina, Vietnam, Suecia, Latvia, Filipinas, Finlandia, Rusia, Turquía, España, Tailandia, China y Holanda.

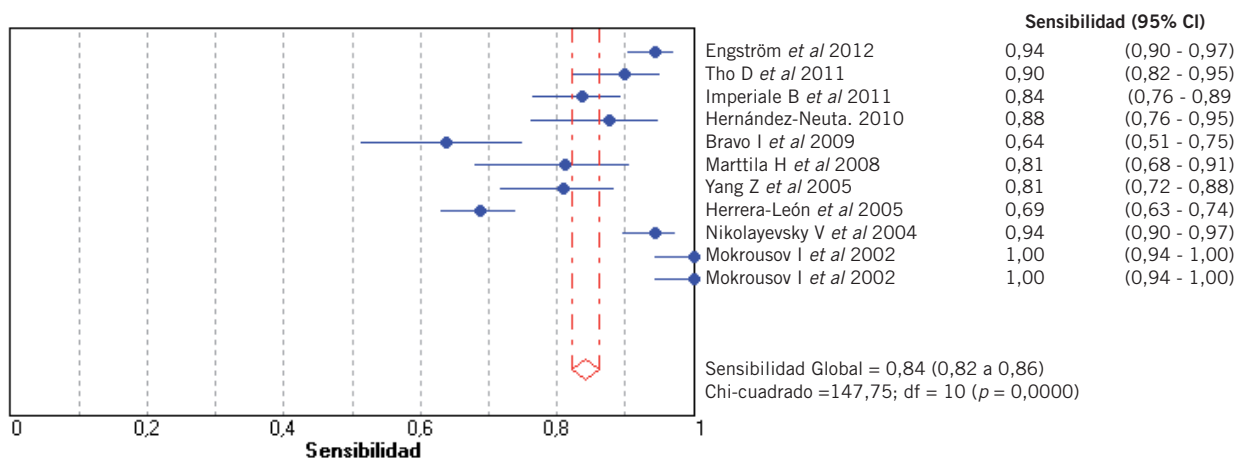
El tiempo de obtención de los resultados, o TAT por su sigla en inglés (*turn around time*), fluctuó entre 1 a 2 días (promedio: 1,3 días) según el estudio en cuestión.

ANÁLISIS SISTEMÁTICO O META-ANÁLISIS

Mediante el *software* Meta-DiSc (versión 1.1.1) se obtuvieron los gráficos “*forest plot*” (Figura 1.a y 1.b y 2.a y 2.b) para evaluar estadísticamente el grado de variabilidad existente entre cada uno de los estudios con respecto a la sensibilidad y especificidad de cada método empleado para la rápida detección de INH-R y de RIF-R. En este análisis, la sensibilidad fue definida como la proporción de aislamientos de *M. tuberculosis* clasificados como resistentes a INH o RIF según el método molecular empleado en comparación con el método fenotípico de referencia. La especificidad se

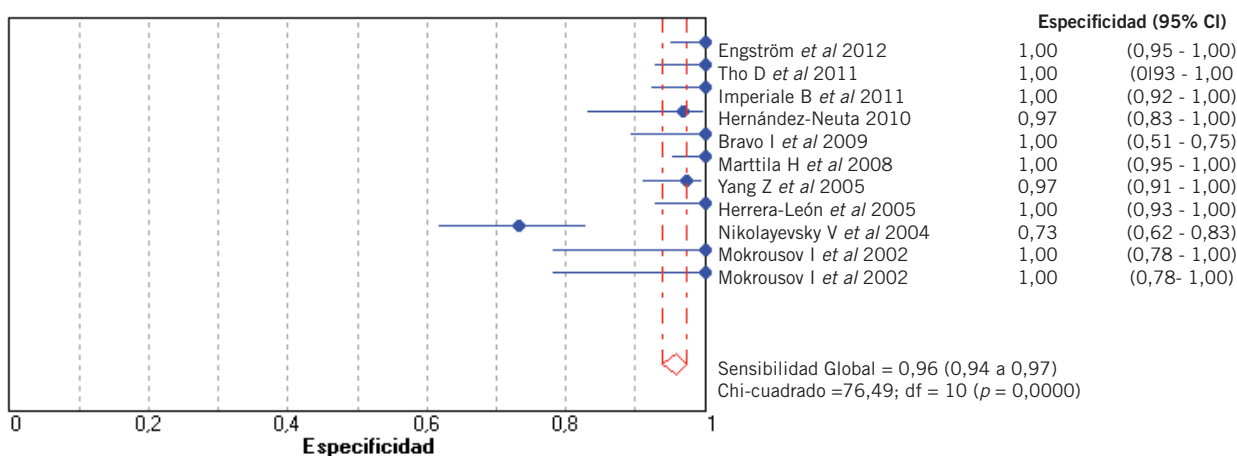
refirió a la proporción de aislamientos determinados como sensibles por el método de estudio en comparación con el método fenotípico de referencia. Para los métodos de detección de resistencia a INH se puede ver que la sensibilidad varió entre 100,0%-63,8%, con una sensibilidad global del 84,0% y la especificidad entre 100,0%-74,0% entre todos los estudios incluidos, con una especificidad global del 96,0%; mientras que para los métodos de detección de resistencia a RIF la sensibilidad estuvo entre 100,0-80,0% con una sensibilidad global del 92,0% y la especificidad entre 100,0%-83,8% con una especificidad global del 97,0%.

La Figura 1.a y 1.b muestra el valor de sensibilidad y especificidad globales obtenidas entre todos los estudios que incluyen métodos de detección de INH-R, mientras que la figura 2.a y 2.b muestra estos valores para los estudios que detectan RIF-R.



a. Sensibilidad

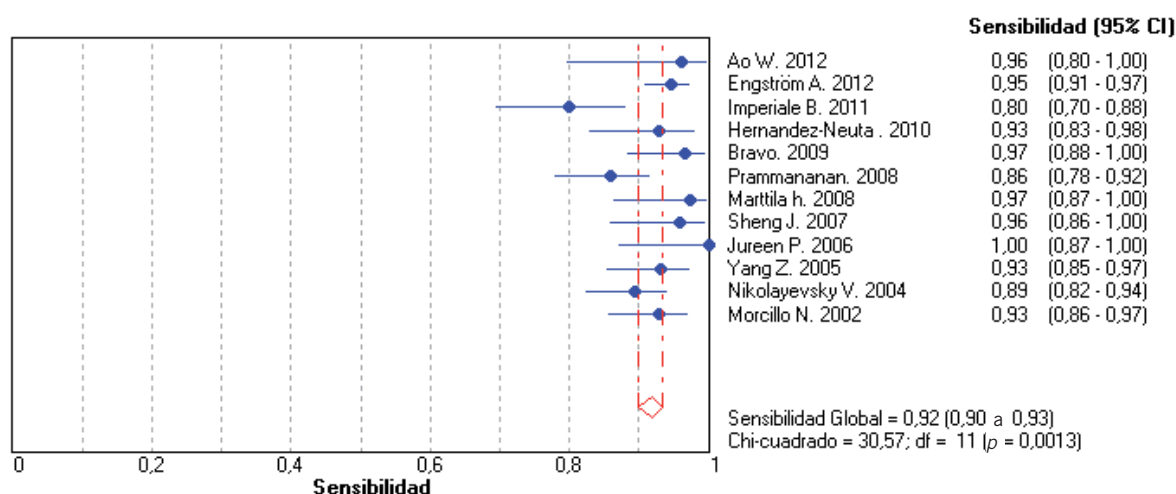
CI 95%: intervalo de confianza del 95%. Los puntos representan cada uno de los estudios incluidos en el análisis.



b. Especificidad

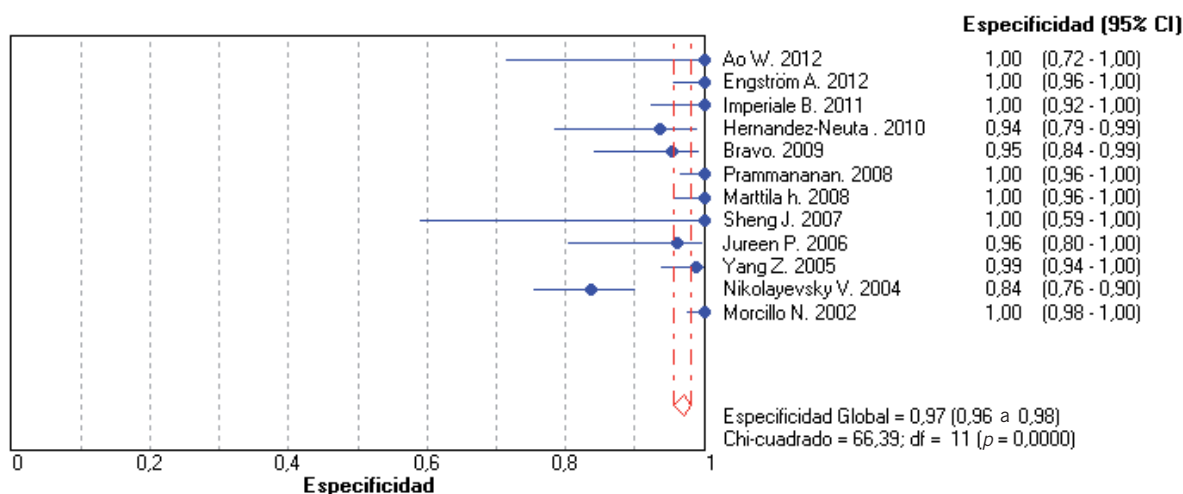
CI 95%: intervalo de confianza del 95%. Los puntos representan cada uno de los estudios incluidos en el análisis.

Figura 1. Forest plot de sensibilidad y especificidad para los métodos de detección de resistencia a isoniacida



a. Sensibilidad

CI 95%: intervalo de confianza del 95%. Los puntos representan cada uno de los estudios incluidos en el análisis



b. Especificidad

CI 95%: intervalo de confianza del 95%. Los puntos representan cada uno de los estudios incluidos en el análisis.

Figura 2. Forest plot de sensibilidad y especificidad para los métodos de detección de resistencia a Rifampicina

Observando ambas Figuras se puede ver claramente que todos los estudios muestran resultados homogéneos para sensibilidad y especificidad, excepto el de Nikolayevsky *et al* que muestra valores de especificidad para la detección de ambas drogas bastante más bajos en comparación con el resto de los estudios.

Por otra parte, la agrupación de los estudios analizados permitió establecer el rendimiento diagnóstico representado en un único número dado por el área bajo la curva SROC (*Summary receiver operating characteristic*) la cual resume los resultados de todos los estudios analizados. Las Figuras 3 y 4 muestran las curvas SROC para los métodos de detección de INH-R y RIF-R respectivamente. Como puede verse en dichas figuras, el

área bajo la curva (AUC) resultó ser de 0,9915 y 0,9874 para las pruebas diagnósticas de resistencia a INH y RIF respectivamente, estos valores cercanos al 1 ($>0,90$) indican una alta exactitud diagnóstica de los MMNC-PCR, con respecto a los métodos fenotípicos de referencia, a excepción del estudio de Nikolayevsky *et al* que fue excluido automáticamente del cálculo por el método de la SROC. Los métodos de detección analizados mostraron un alto rendimiento diagnóstico; ya que las pruebas perfectas tendrían un valor de AUC cercano a 1. El valor dado por el índice Q^* resume la *performance* de los métodos donde la sensibilidad y especificidad son iguales y también resultaron ser cercanos al 1 (0,9624 para INH y 0,9524 para RIF) (42).

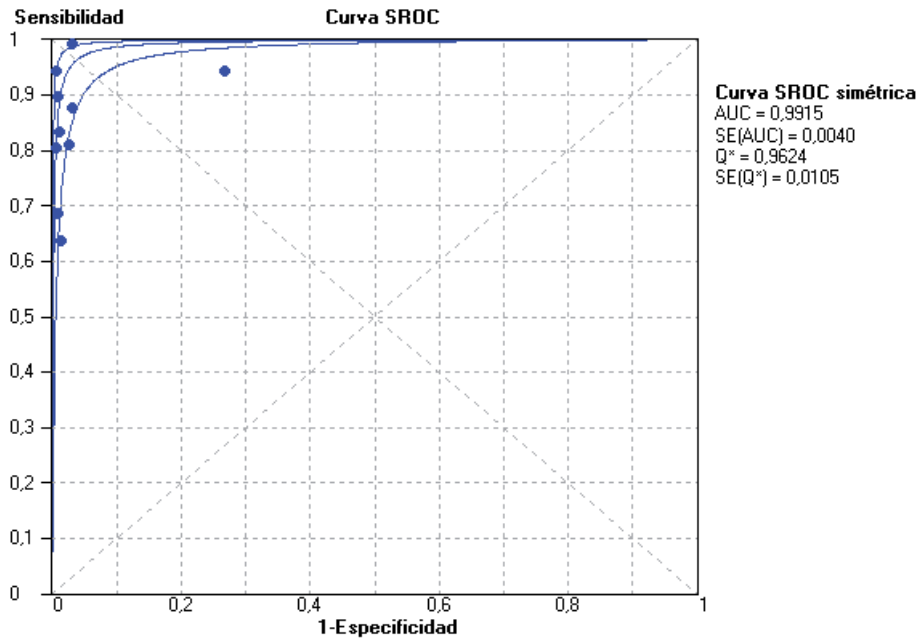


Figura 3. Curva SROC para los métodos de detección de resistencia a Isoniacida

SROC: *Summary receiver operator curve* para los métodos basados en PCR para la detección de reasistencia a isoniacida. Los puntos representan los distintos estudios analizados. AUC: área bajo la curva; SE(AUC): error estándar del AUC; Q*: punto en que la sensibilidad y especificidad son iguales, y es el punto de la curva más cercano al ideal extremo superior del plano ROC; SE(Q*): error estándar de Q*.

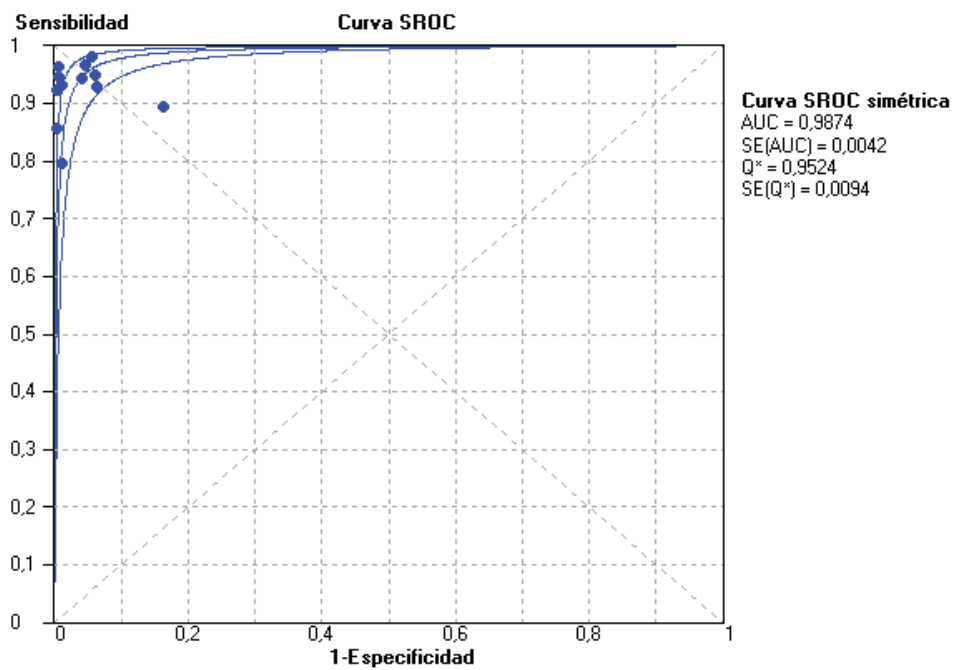


Figura 4. Curva SROC para los métodos de detección de resistencia a Rifampicina

SROC: *Summary receiver operator curve* para los métodos basados en PCR para la detección de resistencia a rifampicina. Los puntos representan los distintos estudios analizados. AUC: área bajo la curva; SE (AUC): error estándar del AUC; Q*: punto en que la sensibilidad y especificidad son iguales, y es el punto de la curva más cercano al ideal extremo superior del plano ROC; SE(Q*): error estándar de Q*.

Discusión y Conclusiones

Debido al incremento de los casos de TB MDR y XDR es que surge la necesidad del desarrollo de herramientas que permitan el diagnóstico rápido y eficiente de TB DR en aquellos países donde el acceso a *kits* comerciales es muy dificultoso (47). Además, el diagnóstico temprano de la TB como también de la TB MDR es un paso crítico en el manejo y control de la enfermedad. Los métodos moleculares basados en PCR aceleran el diagnóstico así como también la detección de la resistencia micobacteriana.

Esta revisión realizada sobre los métodos de diagnóstico de resistencia a INH y RIF basados en la amplificación de ADN mediante PCR demostró que éstos son, en general, altamente sensibles y específicos para la detección rápida (entre 1-2 días), a partir del aislamiento clínico, de la resistencia a las dos drogas de primera línea, INH y RIF, más importantes de los esquemas terapéuticos convencionales.

Efectuando comparaciones de resultados obtenidos con los MMNC-PCR entre ambas drogas, se puede ver que la sensibilidad global obtenida para INH con los MMNC-PCR, fue menor que la obtenida con los métodos que detectan resistencia a RIF. Estos resultados fueron esperables ya que como ha sido previamente mencionado en la introducción, la mayoría de las mutaciones causantes de resistencia a RIF ocurren en una región muy acotada del gen *rpoB* (17-19) (48). Mientras que en el caso de la INH, se considera que hay mecanismos de resistencia que todavía no han sido dilucidados. Dependiendo del área geográfica, alrededor de un 80-50% de los aislamientos clínicos INH-R presentan mutación en el codón 315 del gen *katG* (13)(14) (49), entre un 8%-30% de los aislamientos presentan mutaciones en la región -15 (C>T) del promotor del gen *inhA* (12) (49) (50), hasta 5% de los aislamientos INH-R tienen mutación en el marco abierto de lectura del gen *inhA* (49) (51), y en aproximadamente un 20-30% de aislamientos clínicos INH-R no es posible hallar la mutación causante de la resistencia mediante el estudio de estos dos genes (*inhA* y *katG*) (15) (49), que son los que contemplan los métodos caseros y comerciales moleculares de detección de INH-R como el GenoType MTBDR*plus* (15) (28) (35) (52). Por este motivo es esperable obtener una sensibilidad global de alrededor del 80,0% para la detección de INH-R y que ésta a su vez sea menor que la obtenida para la detección de RIF-R.

Algunos estudios mostraron valores de sensibilidad sustancialmente menores a los de la sensibilidad global. En el caso en que la droga analizada fuera la INH, esto podría deberse a que en algunos de dichos estudios no hubiera sido incluido el promotor del gen *inhA* para que las mutaciones ocurridas en el mismo pudieran ser detectadas. Otra explicación posible sería la relacionada con el área geográfica y la frecuencia de aparición de

mutaciones en otros genes no considerados por el sistema estudiado y que pudieran ser las responsables de causar la resistencia en esa área en particular. Esto es debido a que se postula que existirían otros mecanismos de resistencia a RIF y principalmente a INH que todavía no han sido dilucidados en su totalidad (51) (53-57).

Particularmente, los resultados publicados por Nikolayevsky *et al* mostraron llamativamente valores comparativamente más bajos de especificidad para INH (74,0%) y RIF (83,8%) que los valores medios obtenidos para todos los estudios, sin ser tampoco incluidos en los intervalos de confianza del 95% respectivamente (ver *forest-plots*). Las causas de valores de especificidad, sustancialmente menores que las medias correspondientes, son poco claras. Deberían revisarse los procedimientos técnicos en forma individual y comparativa para evaluar correctamente esos resultados. Cabe mencionar que, en todos los casos analizados estadísticamente, las diferencias entre sensibilidad o especificidad media, para INH y RIF, y los valores puntuales de especificidad obtenidos en el estudio de Nikolayevsky *et al*, arrojaron valores significativos ($p < 0,0001$). Además, el desvío estándar para los valores de especificidad para RIF-R y para INH-R arrojó un valor de 4,85 y de 7,5 respectivamente. Estos valores descendieron a 2,2 y 1,0 al excluir el estudio con valores más bajos.

Teniendo en cuenta los blancos de detección de los métodos moleculares evaluados, se puede concluir que una ventaja de estos métodos es que además de la detección de la DR permitieron identificar al mismo tiempo al aislamiento como perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, ya que en todos los casos, los fragmentos de genes amplificados son específicos de dicha especie micobacteriana.

Todos los estudios analizados concluyeron que los métodos utilizados pueden ser aplicados para el diagnóstico rápido de resistencia a INH y/o RIF a partir del aislamiento del *M. tuberculosis*. No todos los estudios analizados hicieron referencia a los costos estimados de los métodos utilizados para el diagnóstico de MDR, pero sí es claro que resultan mucho más accesibles que cualquier método comercial. Por otra parte, el ahorro del tiempo en el diagnóstico de la DR por parte de los métodos moleculares con respecto a los métodos fenotípicos hace que la relación costo beneficio también sea favorable para los nuevos métodos (40).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nora Morcillo por la revisión del manuscrito. BI es Becaria Postdoctoral del CONICET.

CORRESPONDENCIA

DRA. BELÉN IMPERIALE

Italia 1750

CP 1602 - FLORIDA, Vicente López, Argentina.

E-mail: belen.imperiale@conicet.gov.ar

belen_imperiale@yahoo.com.ar

Referencias bibliográficas

- Mattelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girardi E, Raviglione M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5: 857-71.
- Migliori GB, Loddenkemper R, Blasi F, Raviglione MC. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is 'science' enough to tackle the epidemic? *Eur Respir J* 2007; 29: 423-27.
- WHO/IUATLD. Report 3, Geneva: WHO, 2004, p 146-47.
- WHO. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Fourth Global Report. 2008. WHO/HTM/TB/2008.394.
- WHO. Multidrug and extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response. 2010. WHO/HTM/TB/2010.3. may 2011.
- WHO. Molecular line probes assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistance tuberculosis, Policy statement, June 2008.
- Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Tratamiento de la Tuberculosis, en Normas Técnicas. 2008; cap 4: p. 27-48.
- Traore H, Fissette K, Bastian I, Devleeschouwer M, Portaels F. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug-resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 481-4.
- Hoek KG, Gey Van Pittius NC, Moolman-Smook H, Carelse-Tofa K, Jordaan A, van der Spuy GD, *et al.* Fluorometric assay for testing rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1369-73.
- LoBue PA, Moser KS. Use of isoniazid for latent tuberculosis infection in a public health clinic. *Am J Resp Crit Care Med* 2003; 168: 443-7.
- Bravo LT, Tuohy MJ, Ang C, Destura RV, Mendoza M, Procop GW, *et al.* Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampin, isoniazid and fluoroquinolones. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3985-90.
- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, *et al.* Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3373-81.
- Heym B, Saint-Joanis B, Cole ST. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung Dis* 1999; 74: 267-71.
- Saint-Joanis B, Schouton H, Wilming M, Johnsson K, Alzari PM, Cole ST. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 1999; 338: 753-60.
- Imperiale BR, Cataldi AA, Morcillo NS. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 496-501.
- Tho DQ, Lan NT, Chau NV, Farrar J, Caws M. Multiplex allele-specific polymerase chain reaction for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 799-803.
- Caws M, Duy PM, Tho DQ, Ngoc Lan NT, Hoa DV, Farrar J. Mutations prevalent among rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2333-7.
- Mokrousov I, Bhanu NV, Suffys PN, Kadival GV, Yap SF, Cho SN, *et al.* Multicenter evaluation of reverse line blot assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Microbiol Methods* 2004; 57: 323-35.
- Morcillo N, Zumárraga M, Alito, Dolmann A, Schouls L, Cataldi A, *et al.* A low cost, home-made, reverse-line blot hybridization assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 959-65.
- Engström A, Morcillo N, Imperiale B, Hoffner S, Juréen P. Detection of first and second line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2026-33.
- Prammananan T, Cheunoy W, Taechamahapun D, Yorsang-sukkamol J, Phunpruch S, Phdarat P, *et al.* Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of rapid method for mutation detection. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 446-53.
- Yang Z, Durmaz R, Yang D, Gunal S, Zhang L, Foxman B, *et al.* Simultaneous detection of isoniazid, rifampin and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 201-8.
- Ao W, Aldous S, Woodruff E, Hicke B, Rea L, Kreiswirth B, *et al.* Rapid detection of *rpoB* gene mutations conferring rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2433-40.
- Flores L, Pai M, Colford J, Riley L. In-house nucleic acid amplification test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol* 2005; 5:55 doi: 10.1186/1471-2180-5-55.
- Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J* 2005; 26: 1-12.
- Laraque F, Griggs A, Slopen M, Munsiff S. Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in large urban setting. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 46-54.
- Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 174-82.
- Mokrousov I, Otten T, Filipenko M, Vyazovaya A, Chrapov E, Limeschenko E, *et al.* Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by a Multiplex-allele specific PCR assay targeting *katG* codon 315 variation. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2509-12.
- Bicmen C, Gunduz AT, Coskun M, Senol G, Ozkutuk N, Cirak AK, *et al.* Molecular identification and characterization of Rifampicin-resistance *Mycobacterium tuberculosis*

- isolates by line probe assay: an approach for rapid diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47: 214-20.
30. De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machte-linckx L, Rossau R, *et al.* Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tubercu-losis patients by PCR and line probe assay. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76: 425-30.
 31. Imperiale B, Zumárraga M, Weltman G, Zudiker R, Cataldi A, Morcillo N. First evaluation in Argentina of the Geno-Type MTBDR*plus* assay for multidrug-resistant *Mycobac-terium tuberculosis* detection from clinical isolates and specimens. *Rev Argent Microbiol*. En prensa 2012.
 32. Huang WL, Chen HY, Kuo YM, Jou R. Performance as-sessment of the GenoType MTBDR*plus* test and DNA se-quencing in detection of multidrug-resistant *Mycobacte-rium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2520-4.
 33. Miotto P, Piana F, Cirillo DM, Migliori GB. Genotype MTB-DR*plus*: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 393-4.
 34. Nikolayevsky V, Brown T, Balabanova Y, Ruddy M, Fedorin I, Drobniowski F. Detection of mutations associated with isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuber-culosis* isolates from Samara Region, Russian Federation. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4498-502.
 35. Hernández-Neuta I, varela A, Martin A, von Groll A, Jureen P, López B, *et al.* Rifampin-isoniazid oligonucleotide typ-ing: an alternative format for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4386-91.
 36. Marttila HJ, Mäkinen J, Marjamäki M, Soini H. Prospec-tive evaluation of pyrosequencing for the rapid detection of isoniazid and rifampin resistance in clinical *Mycobacte-rium tuberculosis* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:33-8.
 37. Rigouts L, Hoza AS, De Rijk P, Torrea G, Chonde TM, Bas-ra Z, *et al.* Evaluation of the GenoType® MTBDR*plus* assay as a tool for drug resistance surveys. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 959-65.
 38. Coronel J, Roper M, Mitchell S, Castillo E, Gamarra N, Drob-niewski F, *et al.* MODS accreditation process for regional reference laboratories in Peru: validation by GenoType® MTBDR*plus*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 1475-80.
 39. Heifets LB. Conventional methods for antimicrobial sus-ceptibility testing of *M. tuberculosis*. En: Bastian I, Por-taels F, editores. *Multidrug-resistant tuberculosis*. London, UK: Kluwer Academic Publishers; 2001. p. 135-6.
 40. Morcillo N, Imperiale B, Di Giulio B. Evaluation of MGIT 960™ and the colorimetric based method for tuberculosis drug susceptibility testing. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 1169-75.
 41. Molinero L. Mata-análisis: Disponible en: <http://www.seh-lelha.org/metaheterog.htm>. (Fecha de acceso 3 de julio de 2012).
 42. Zamora J, Abaira V, Muriel A, Khan KS, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for Meta-analysis of test accuracy data. *BMC Medical Research Methodology* 2006, 6:31.
 43. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 175-83.
 44. Sheng J, Li J, Sheng G, Yu H, Huang H, Cao H, *et al.* Char-acterization of *rpoB* mutations associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from eastern China. *J Appl Microbiol* 2007; 105: 904-11.
 45. Herrera-León L, Molina T, Saíz P, Sáez-Nieto JA, Jiménez MS. New Multiplex PCR for Rapid Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 144-7.
 46. Jureen P, Engstrand L, Eriksson S, Alderborn A, Krabbe M, Hoffner S. Rapid Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Pyrosequencing Technol-ogy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1925-9.
 47. WHO. Strategic and technical advisory group for tuber-culosis (STAG-TB). Report of the ninth meeting. Geneva, Switzerland: WHO, 2009.
 48. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, *et al.* Detection of rifampicin-resistant mutations in *My-cobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341:647-50.
 49. Imperiale BR. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fár-macos anti-tuberculosos (Tesis de Doctorado). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Facultad de Farmacia y Bio-química, Universidad de Buenos Aires; 2012: p.68-77.
 50. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Aueustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, *et al.* Detection of mul-tidrug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 179-92.
 51. Hazbón M, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cava-tore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, *et al.* Population ge-netics study of isoniazid resistance mutations and evolu-tion of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2640-9.
 52. Hain Lifescience GmbH. GenoType®MTBDR*plus* (in-serito).
 53. Louw GE, Warren R, van Helden PD, Victor TC. Rv2629 191 A/C nucleotide change is not associated with rifam-picin resistance in *M. tuberculosis*. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 500-1.
 54. Almeida da Silva P, Von Groll A, Martin A. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuber-culosis*. *Immunol Med Microbiol* 2011; 1-9.
 55. Dhandayuthapani S, Mudd M, Deretic V. Interactions of *OxyR* with the promoter region of the *oxyR* and *ahpC* genes from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tubercu-losis*. *J Bacteriol* 1997; 179: 2401-9.
 56. Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* 2011; doi: 10.1016/j.meegid.2011.08.009
 57. Imperiale BR. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fár-macos anti-tuberculosos (Tesis de Doctorado). Ciu-dad Autónoma de Buenos Aires: Facultad de Farma-cia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; 2012: p.16-24.

Aceptado para su publicación el 17 de diciembre de 2012