

Validación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa En Tiempo Real (qPCR) acoplada a curvas melting como herramienta alternativa para el diagnóstico de Tuberculosis Multidrogorresistente

Validation of the Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) coupled to melting curves as an alternative tool for the diagnosis of Multi-Drug Resistant Tuberculosis

¹Brayan Mercado Michel, ²Aneth Vasquez Michel

¹Tesista de la carrera de Bioquímica, instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6450-0475>

²Docente Investigador Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Bolivia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3743-262X>

*Autor para correspondencia: MSc. Aneth Vasquez Michel, Docente Investigador Instituto SELADIS, Jefe del Laboratorio de Microbiología Molecular
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3743-262X>, amvasquez@umsa.bo

FECHA DE RECEPCIÓN: 30 ABRIL 2021

FECHA DE ACEPTACIÓN: 26 JUNIO DE 2021

RESUMEN

Introducción. La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, causada por diversas especies del *Complejo Mycobacterium tuberculosis*, actualmente se estima que un tercio de la población mundial se encuentra afectada por lo que representa una amenaza para la salud pública, principalmente por el surgimiento de cepas Multidrogorresistentes (TB-MDR). En Bolivia se reportaron 7.538 personas enfermas con Tuberculosis, los últimos datos sobre TB-MDR indican un aumento de 0,2% por año, en 2019 se registró un 3,1% de TB-MDR. Actualmente en nuestro país se emplean métodos moleculares para la identificación de este agente infeccioso; no obstante, existen muy pocos o ningún trabajo acerca de la aplicación de métodos moleculares para la detección precisa y efectiva de cepas TB-MDR que otorguen validez a los resultados emitidos. Este trabajo resuelve el cuestionamiento de, si la PCR en tiempo real (RT-qPCR) acoplada a curvas melting es una herramienta de diagnóstico alternativo aplicable, para la identificación de Tuberculosis Multidrogorresistente.

Materiales y Métodos. Se trabajó con 74 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* fenotípicamente identificadas por cultivo (método de las proporciones, Canetti Rist) como gold standar. El material genético para las pruebas moleculares se obtuvo por el método de columnas, se utilizaron dos controles primarios para la determinación de resistencia a los fármacos Isoniacida y Rifampicina,

tanto los controles como las muestras se procesaron por RT-qPCR acoplada a curvas melting, mediante cambios de temperatura de disociación.

Resultados. Los parámetros de test diagnóstico de la prueba demostraron sensibilidad: 67.4%, especificidad: 83.3%, Exactitud: 73.97%, VPP: 85.3%, VPN: 64.1% para Isoniacida. Mientras que para Rifampicina: Sensibilidad: 97%, especificidad: 20%, exactitud: 58.9%, VPP: 55.4% y VPN: 87.5%.

Conclusión. El método evaluado para la determinación de resistencia a Isoniacida presenta un equilibrio entre sensibilidad y especificidad, por lo que representa una alternativa diagnóstica confiable, mientras que para resistencia a Rifampicina presenta una alta sensibilidad que es muy útil para países endémicos como el nuestro.

Palabras clave: Tuberculosis Multidrogorresistente, PCR en tiempo real acoplada a curvas melting, Validación.

ABSTRACT

Introduction. Tuberculosis is an infectious-contagious disease, caused by various species of the *Mycobacterium tuberculosis Complex*, it is estimated that one third of the world population is affected by what represents a threat to public health, mainly by the emergence of multidrug-resistant strains (MDR-TB). In Bolivia, 7,538 people are reported sick with Tuberculosis, the latest data on MDR-TB indicate an increase of 0.2% per year, in 2018 there was 3.1% of MDR-TB. Currently in our country molecular methods are used to identify this infectious agent; however, there is very little or no work on the application of molecular methods for the precise and effective detection of MDR-TB strains that give validity to the results issued. This work resolves the question of whether real-time PCR (RT-qPCR) coupled to melting curves is an applicable alternative diagnostic tool for the identification of multidrug-resistant tuberculosis.

Materials and methods. We worked with 74 strains of *Mycobacterium tuberculosis* phenotypically identified by culture (method of proportions, Canetti Rist) as a gold standar. The genetic material for molecular methods was obtained by the column assay, two primary controls were used for the determination of resistance to the drugs Isoniazid and Rifampicin, both the controls and the samples were processed by RT-qPCR coupled to melting curves, by means of temperature changes of dissociation.

Results. The diagnostic test parameters of the test demonstrated sensitivity: 67.4%, specificity: 83.3%, Accuracy: 73.97%, PPV: 85.3%, NPV: 64.1% for Isoniazid. While for Rifampicin: Sensitivity: 97%, Specificity: 20%, Accuracy: 58.9%, PPV: 55.4% and NPV: 87.5%

Conclusion. The method evaluated for the determination of resistance to Isoniazid presents a balance between sensitivity and specificity, therefore it represents a reliable diagnostic alternative, while for resistance to Rifampicin it presents a high sensitivity that is very useful for endemic countries such as ours.

Keywords: Multidrug-resistant tuberculosis, Real-time PCR coupled to melting curves, Validation.

INTRODUCCIÓN

Si bien en la actualidad la incidencia en Bolivia de la TB-TSF (tuberculosis en todas sus formas) está disminuyendo en aproximadamente un 1.5% al año según lo informado por las autoridades competentes del tema, se ubica entre los 3 países Latinoamericanos con los índices más altos de TB y TB- MDR, sólo después de Haití y Perú, por lo cual, la lucha contra la resistencia a los fármacos antituberculosos es un nuevo desafío a nivel mundial y en particular en nuestro país donde los últimos datos sobre TB-MDR indican que esta tiene un aumento de 0,2% por año, desde el año 2004 que se encontró 1,5% de MDR, el año 2005 1,7%, el año 2012 3,1% (Molina, J. 2011) datos que representan una amenaza a los objetivos planteados para el año 2020 en plan mundial denominado “Alto a la Tuberculosis”

Los métodos de diagnóstico microbiológico para tuberculosis comprenden a la baciloscopia y aislamiento del microorganismo en cultivo; este último es el método “gold standard”; sin embargo, la desventaja es el tiempo de obtención de resultados de 60 días o más. Frente a esta situación, los métodos de amplificación de ácidos nucleicos concretamente en este estudio la RT-qPCR, constituye una alternativa diagnóstica, que permite obtener resultados en tiempos relativamente cortos, inferiores a las 48 horas. (Calderón, R. et. al. 2005)

En nuestro país, no se toman en cuenta a los métodos moleculares como diagnóstico de rutina de tuberculosis multidrogorresistente y para poder implementar una alternativa diagnóstica es necesario comprobar y documentar la validez del método que se desea implementar para su aplicación, lo cual constituye un paso fundamental para asegurar que los resultados que aporta un método son confiables.

Existen varios métodos variantes de la PCR convencional; las más común para diagnóstico de *M. tuberculosis* es la PCR anidada que utiliza dos pares de cebadores, en un primer paso se amplifica las secuencias del genoma de *M. tuberculosis* como IS6110 para después concretar la región blanco mediante una segunda amplificación más específica, lo cual aumenta la sensibilidad del ensayo y la PCR en tiempo real que se emplea hoy en día en nuestro país, específicamente Xpert MTB/RIF que es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos totalmente automatizada que purifica, concentra e identifica las secuencias de *M. tuberculosis* mediante una reacción en cadena de la polimerasas en tiempo real y simultáneamente determina la sensibilidad a Rifampicina cuyo fundamento es la amplificación de dos genes en tiempo real utilizando cartuchos para diagnosticar la tuberculosis y la resistencia a Rifampicina; sin embargo, no se tiene evidencia publicada en nuestro país sobre sus características y rendimiento como prueba diagnóstica. (Moreno, eA. Hidalgo, C. 2015. p. 115)

Por esta razón este trabajo pretende resolver el cuestionamiento de si la PCR en tiempo real acoplada a curvas melting es una herramienta de diagnóstico alternativo válida, aplicable y confiable, para la identificación de tuberculosis multidrogorresistente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo, población y Tamaño de muestra:

El cálculo de tamaño de muestra para este estudio se realizó en el programa EPI-INFO 7.2.0.1 en un cálculo de estudio del tipo de pruebas diagnósticas, con un nivel de confianza de 95%, tomando como dato para resistencia al tratamiento antituberculoso de 880 sujetos al año, con una sensibilidad propuesta del 95% y una especificidad del 80%, con un nivel de confianza del 85% y un error aceptable del 5%, se obtiene una muestra total de 70 muestras.

Se trabajó con 74 muestras de cepas aisladas de pacientes entre el año 2012 y 2013 que fueron identificadas y confirmadas como *M. tuberculosis* en cultivo Lowensten Jensen, además del perfil de susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida correspondiente determinado por el método de las proporciones (Canetti Rist), pruebas que fueron realizadas en el Laboratorio de Referencia Nacional de Control de la Tuberculosis en

INLASA. El muestreo fue realizado tomando en cuenta la disponibilidad de la base de datos del perfil de susceptibilidad a fármacos, de las cepas proporcionadas por INLASA.

Protocolo de extracción de ADN "Columna" Kit de Invitrogen

Lisis y extracción de ADN.-

Dispensar 50 µL de aislado bacteriano en tubo eppendorf de 1.5 mL marcado, Añadir 180 µL de tampón de digestión, 20 µL de Proteinasa K. Incubar a 56°C por 40 minutos, dispensar 20 µL de RNAsa A, al lisado, mezclar e Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Añadir 200 µL del Buffer del tampón de lisis, homogenizar, incubar a 56°C por 30 min, adicionar 200 µL de Etanol absoluto y mezclar

Purificación de ADN genómico por columna. -

Transferir todo el volumen obtenido en el protocolo de extracción (aproximadamente 500 ul) a una columna marcada con su tubo colector, centrifugar la columna a 10,000 g por 1 Min., descartar el eluído y trasferir la columna a un nuevo tubo colector, adicionar 450 µL de tampón de lavado 1, a la columna, centrifugar a 10,000g por 1 Min., desechar la elución y colocar la columna en un nuevo tubo colector, añadir 450 µL de tampón de lavado 2 a la columna centrifugar a 10,000g por 3 Min., desechar el tubo colector y colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5mL nuevo, adicionar 50 µL de tampón de elución de ADN a la columna, incubar a temperatura ambiente por 1 min, centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 min.

Cuantificación de ADN.-

En un tubo eppendorf dispensar la muestra de 5uL ADN extraído y 95uL de agua libre de DNA asas, homogenizar en vortex, y centrifugar brevemente, se procedió a la lectura de concentración de las muestras con el equipo Biophotometer plus eppendorf.

Preparación y Montaje de la PCR en tiempo real.-

Se emplearon los kits comerciales de "QuanDx- Molecular Diagnostic Inovator", que permite la detección de *Mycobacterium tuberculosis* además de identificar los perfiles de susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida, empleando la PCR en tiempo real. El procedimiento general que se utilizó tanto en primera instancia, donde se optimizó la PCR, como también para el procesamiento de muestras se describe a continuación:

Primera etapa: En una campana de flujo laminar de Tipo II marca ESCO se descongeló el kit a temperatura ambiente. Se prepararon en dos tubos separados de 0.2 mL MEZCLA A y en otro tubo MEZCLA B de Isoniacida (Específicamente para cada corrida de 11 muestras 245uL de MEZCLA y 5uL de Enzima), Repetimos el mismo procedimiento para Rifampicina, Luego dispensamos 10uL del preparado final a cada uno de los 96 tubos de la placa.

Segunda etapa: Se utilizaron ocho tubos de PCR por muestra, cuatro para Isoniacida y cuatro para Rifampicina. Dos tubos para MEZCLA A y dos tubos para MEZCLA B ya que se utilizaron en cada mezcla para dos diferentes marcadores de fluorescencia o fluoróforos (FAM y JOE). Se homogenizaron las muestras de ADN previamente extraídas en vortex y centrifugaron por poco tiempo antes de mezclar con el mix preparado anteriormente. Se dispensaron 2,5uL del ADN al tubo que corresponda.

Cada montaje de PCR se trabajó con 11 muestras simultáneamente más 1 control positivo. El volumen final de reacción fue optimizado a la mitad del volumen sugerido por el kit comercial, el volumen final con el que se trabajó fue de 10µL de “Master Mix” y 2,5µL de ADN.

Tercera etapa: Se programó el software del equipo según indicaciones de los fabricantes del kit comercial; sin embargo, en el “programa 4” se realizó una pequeña modificación, concretamente en la etapa de alineación de los primers, el tiempo utilizado fue de 30 segundos en vez de los 15 sugeridos por el kit comercial.

El análisis de la amplificación y las curvas melting fueron proporcionados automáticamente por el equipo. Las curvas de los controles positivos internos, que representan el comportamiento característico de la curva melting, para una cepa sensible o “wild type” obtenida simultáneamente con los dos fluoróforos utilizados

Se realizó la primera corrida de PCR con los controles internos del kit. (control positivo y control negativo) estos cumplieron con los parámetros señalados por la bibliografía, cuyos valores de las temperaturas melting (T_m) obtenidas en el experimento en comparación con el valor de las temperaturas estándar establecidas por el kit comercial,

Posteriormente se realizó el experimento con el ADN obtenido de 11 muestras, procesadas con las condiciones ya establecidas con los controles (cepas wild type). Los valores de las temperaturas melting de una cepa Wild type, y las temperaturas melting obtenidas de las muestras, como también la interpretación del perfil de susceptibilidad de estas cepas

obtenido por este método, en base al criterio de considerar una cepa como resistente, sí, en uno de los canales utilizados (FAM o JOE) de cualquiera de las mezclas (A o B) presenta una Tm mayor o igual en 2°C en comparación con el valor de la Tm que corresponde del control positivo.

Análisis Estadístico

El cálculo de la sensibilidad, especificidad, exactitud y valores predictivos se realizó a partir de la elaboración de tablas de contingencia de doble entrada.

Aspectos Bioéticos

Los aspectos bioéticos no aplican a este tipo de investigación ya que se trabajó con cepas aisladas, sin tener mayor importancia el nombre, género, ni antecedentes clínicos de las personas o pacientes.

RESULTADOS

Estimación de las características de test diagnóstico de la PCR en tiempo real acoplada a curvas melting.

Para evaluar la validez del método en estudio, se estimó el desempeño del mismo calculando la sensibilidad, especificidad y valores, comparándolo con el método gold estándar (G.S) que es el método de las proporciones, al realizar esta operación se obtuvieron cuatro combinaciones diferentes al tener resultados que se expresan de forma binaria (resistente o sensible). El resumen de estos resultados se expresa en las tablas de contingencia de 2x2 Tablas 1-2 para Isoniacida y Rifampicina respectivamente.

Tabla 1. Cuadro de contingencia de resultados para susceptibilidad a Isoniacida de M. tuberculosis entre el método gold standard versus PCR En Tiempo Real Acoplada a Curvas melting

| MÉTODO DE LAS PROPORCIONES (GOLD ESTÁNDAR) | |
|--|--|
| | |

| | | RESISTENTE | SENSIBLE |
|--|----------|--|------------|
| | | PCR EN TIEMPO REAL ACOPLADA A CURVAS MELTING | RESISTENTE |
| | | a | b |
| | | c | d |
| PCR EN TIEMPO REAL ACOPLADA A CURVAS MELTING | SENSIBLE | 14 | 25 |

a=verdaderos positivos **b**=falsos positivos **c**= falsos negativos **d**=verdaderos negativos

Tabla 2. Cuadro de contingencia de resultados para susceptibilidad a Rifampicina de *M. tuberculosis* entre el método gold stantandar versus PCR En Tiempo Real Acoplada a Curvas melting

| MÉTODO DE LAS PROPORCIONES (GOLD ESTÁNDAR) | | | | |
|--|--|------------|----------|----|
| | | RESISTENTE | SENSIBLE | |
| | | RESISTENTE | 36 | 29 |

| | | | |
|--|----------|---|---|
| PCR EN TIEMPO REAL ACOPLADA A CURVAS MELTING | | a | b |
| | SENSIBLE | 1 | 7 |
| | | c | d |

a=verdaderos positivos b=falsos positivos c=falsos negativos d=verdaderos negativos

A partir del análisis de las tablas de contingencia se calcularon las distintas características del poder discriminatorio de la RT-qPCR acoplada a curvas melting para la detección de tuberculosis multidrogorresistente. Los parámetros evaluados fueron: Sensibilidad, Especificidad, Exactitud, Valores Predictivos y Likelihood Ratio positivo y negativo. El cálculo y valores de las características de test diagnóstico, expresados en porcentajes, de la RT-qPCR acoplada a curvas melting, para la detección de tuberculosis resistente a Isoniacida y Rifampicina se expresan en las tablas 3-4 respectivamente .

Tabla 3. Cálculo y valores hallados de las características como test diagnóstico de la RT-qPCR acoplada a curvas melting para la determinación de M. tuberculosis Resistente a Isoniacida.

| MEDIDAS DE VALIDACIÓN | CÁLCULO | RESULTADO |
|-----------------------|-------------|-----------|
| SENSIBILIDAD | $a / a + c$ | 67,4% |

| | | |
|----------------------|----------------------------------|--------|
| ESPECIFICIDAD | $d / b + d$ | 83,3% |
| EXACTITUD | $a+d / a+b+c+d$ | 73,97% |
| VPP | $a / a+b$ | 85,3% |
| VPN | $d / c+d$ | 64,1% |
| LR (+) | Sensibilidad / 1- Especificidad | 4.18 |
| LR (-) | 1 – Sensibilidad / Especificidad | 0.38 |

Donde: **a**=Verdaderos positivos; **b**=Falsos positivos; **c**=Falsos negativos; **d**=Verdaderos negativos

Tabla 4. Cálculo y valores hallados de las características como test diagnóstico de la RT-qPCR acoplada a curvas melting para la determinación de M. tuberculosis Resistente a Rifampicina.

| MEDIDAS DE VALIDACIÓN | CÁLCULO | RESULTADO |
|-----------------------|----------------------------------|-----------|
| SENSIBILIDAD | $a / a+c$ | 97,3% |
| ESPECIFICIDAD | $d / b+d$ | 19,4% |
| EXACTITUD | $a+d / a+b+c+d$ | 58,9% |
| VPP | $a / a+b$ | 55,4% |
| VPN | $d / c+d$ | 87,5% |
| LR (+) | Sensibilidad / 1- Especificidad | 1.21 |
| LR (-) | 1 – Sensibilidad / Especificidad | 0.10 |

Donde: **a**=verdaderos positivos **b**=falsos positivos **c**= falsos negativos **d**=verdaderos negativos

Para representar los likelihood ratios se utiliza el nomograma de Fagan, este permite traducir el LR de un test, en un cambio objetivo de la probabilidad pre test a post test; en

otras palabras, nos permite observar el aumento de la probabilidad de tener un resultado positivo y la disminución de la probabilidad de tener un resultado que no sea verdaderamente negativo. En las *figura 1* y *2* se observa los resultados del cálculo del nomograma de Fagan para el diagnóstico de resistencia a Isoniacida y Rifampicina respectivamente. En la columna izquierda se observa la probabilidad pre test, en la columna central se observa el valor del LR y en la columna derecha se observa la probabilidad post test.

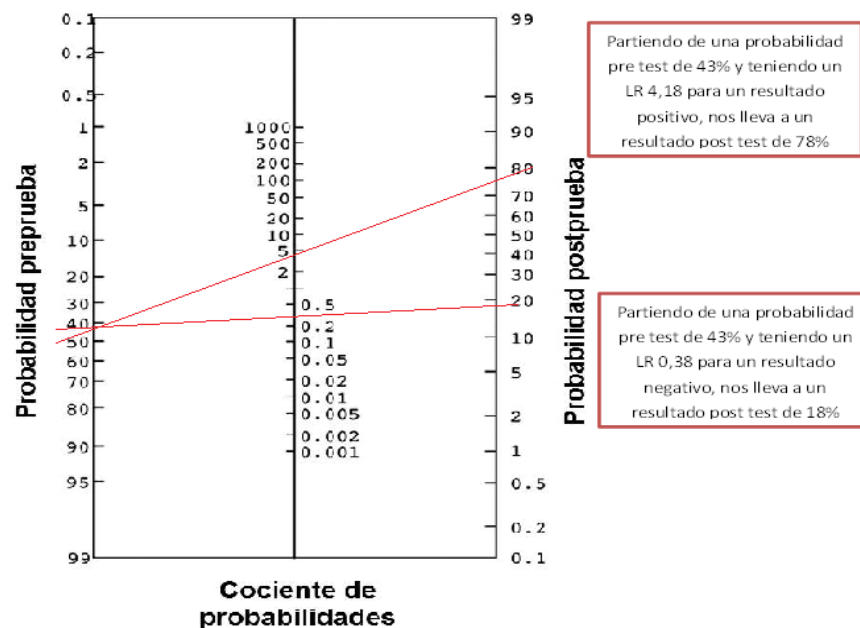


Figura 1. Nomograma Fagan para interpretación de Likelihood Ratios del método de detección RT-qPCR acoplado a curva melting para susceptibilidad a Isoniacida

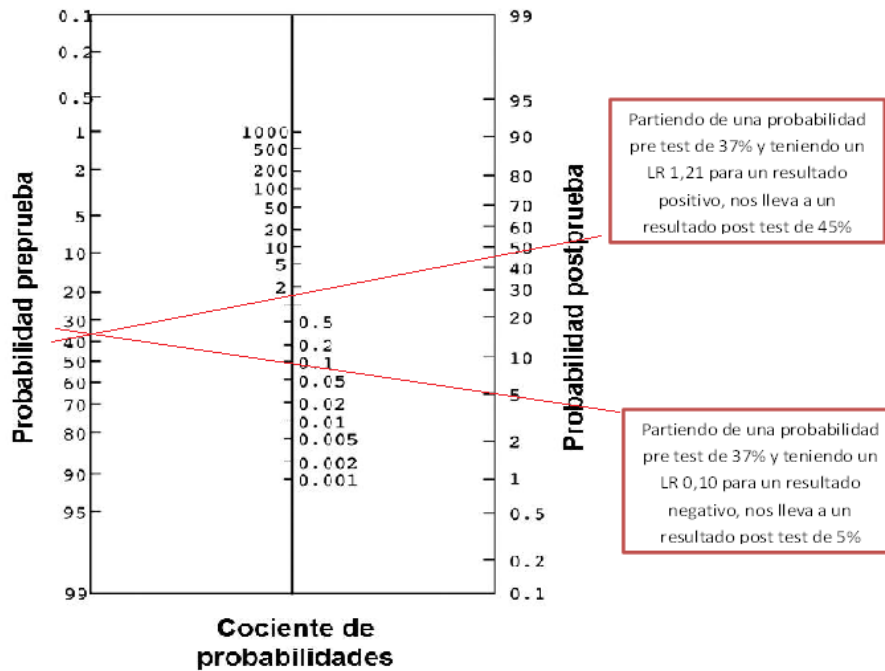


Figura 2. Nomograma Fagan para interpretación de Likelihood Ratios del método de detección RT-qPCR acoplado a curva melting para susceptibilidad a Isoniacida.

Los resultados de Likelihood Ratios para Isoniacida arrojan el resultado de que partiendo de una probabilidad pre test del 43% de la presencia de resistencia a este fármaco en una cepa de *M. tuberculosis*, con un LR de 4,18 la probabilidad post test es del 73% de esta misma condición. Mientras que partiendo de una probabilidad pre test de 43% de la presencia de resistencia a este fármaco, con un resultado negativo en RT-qPCR la probabilidad baja a 18% de que verdaderamente exista la resistencia.

Los resultados de Likelihood Ratios para Rifampicina arrojan el resultado de que partiendo de una probabilidad pre test del 37% de la presencia de resistencia a este fármaco en una cepa de *M. tuberculosis*, con un LR de 1,21 la probabilidad post test es del 45% de esta misma condición. Mientras que partiendo de una probabilidad pre test de 37% de la presencia de resistencia a este fármaco, con un resultado negativo en RT-qPCR la probabilidad baja a 5% de que realmente exista la resistencia.

Comparación de los resultados de perfiles de susceptibilidad obtenidos por el método de las proporciones y *RT-qPCR*

Resultados del método de las proporciones

De las 74 cepas proporcionadas por INLASA los resultados fenotípicos reflejaron un total de 37 cepas MDRs, 7 cepas monorresistentes a Isoniacida, ninguna cepa monorresistente a Rifampicina y 30 cepas sensibles a ambos fármacos. Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de cepas de *M. tuberculosis* según perfil de susceptibilidad a fármacos antituberculosos de primera línea obtenido por método de las proporciones (Canetti Rist)

| TIPO DE RESISTENCIA | FÁRMACO | Nº DE CEPAS Y PORCENTAJE |
|-------------------------------|----------|--------------------------|
| <i>Cepas MDRs</i> | INH, RIF | 37 (50%) |
| <i>Cepas Monorresistentes</i> | INH | 7 (9.5%) |
| | RIF | 0 (0%) |
| <i>Cepas Sensibles</i> | INH, RIF | 30 (40,5%) |
| TOTAL CEPAS | | 74 |

Resultados de la PCR en tiempo real acoplada a curvas melting

El análisis molecular de los perfiles de susceptibilidad a los antituberculosos de primera línea realizado por *RT-qPCR* acoplada a curvas melting para las 74 cepas, reflejaron 33 cepas MDRs, 1 cepa monorresistente a Isoniacida, 32 cepas monorresistentes a Rifampicina, 7 cepas sensibles a ambos fármacos y una cepa que no pudo determinarse su perfil de susceptibilidad ya que durante el experimento no se obtuvo amplificación del material genético. Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de cepas de *M. tuberculosis* según perfil de susceptibilidad a fármacos antituberculosos de primera línea obtenido por RT-qPCR acoplada a curvas melting

| TIPO DE RESISTENCIA | FÁRMACO | Nº DE CEPAS Y PORCENTAJE |
|-------------------------------|----------|--------------------------|
| Cepas MDRs | INH, RIF | 33 (44,6%) |
| Cepas Monorresistentes | INH | 1 (1,35%) |
| | RIF | 32 (43,2%) |
| Cepas Sensibles | INH, RIF | 7 (9,5%) |
| Perfil indeterminado | INH, RIF | 1 (1,35%) |
| TOTAL CEPAS | | 74 |

El cálculo de concordancia entre el resultado de un método y otro se realizó por separado para Isoniacida y para Rifampicina cepas sensibles, cepas monorresistentes y cepas MDRs. Los resultados que se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Concordancia del Perfil de Susceptibilidad de *M. tuberculosis* a fármacos de primera línea, obtenido entre el método Gold Estándar (Canetti Rist) y la RT-qPCR acoplado a curvas melting.

| TIPO DE RESISTENCIA | GOLD STANDAR | RT-qPCR ACOPLADO A CURVAS MELTING | PORCENTAJE DE CONCORDANCIA |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Cepas Sensibles INH | 30 | 38 | 78.9% |
| Cepas Sensibles a RIF | 37 | 8 | 21,6% |
| Cepas Monorresistentes a INH | 30 | 1 | 2,7% |
| Cepas Monorresistentes a RIF | 7 | 32 | 21.8% |

DISCUSIONES

Desde hace muchos años se viene proponiendo la necesidad de incluir la aplicación de Tecnología Molecular al diagnóstico de rutina para la detección de TB y TB-MDR en nuestro país, anteriormente se realizaron estudios donde se evaluaron métodos moleculares de alta tendencia en la época, como es el caso del el kit *Genotype MDBRTplus* (Molina, J. 2018); sin embargo, en la actualidad la mayor tendencia en Latinoamérica y en menor porcentaje a nivel mundial, es la implementación de métodos basados en el método de PCR en tiempo real, el ejemplo más renombrado en este último tiempo es el equipo “*GeneXpert Dx System*” o “Xpert® MTB/RIF. (Lawn, S. 2011)

La validación de un método de ensayo implica en la práctica llegar a conocer los atributos que ofrece dicho método, eso quiere decir, que se debe evaluar sus parámetros de calidad diagnóstica mediante cálculos estadísticos como los realizados en este estudio, específicamente, comparando los resultados obtenidos por el método evaluado, con las características del “Gold Estándar” o método de referencia. Moreno, A. (2015)

Nuñez, M. (2008) afirma que el problema de la aplicación de cualquier técnica diagnóstica nueva o alternativa, es acertar con adecuado compromiso entre la detección de una enfermedad entre las personas que realmente la padecen y evitar asignar esa patología a personas que no la tienen; en tal sentido, un modo fácil e importante de validar el desempeño de un test diagnósticos es mediante el análisis de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y exactitud por lo que cada uno de estos representa.

El análisis de los resultados para la validación de la RT-qPCR acoplada a curvas melting para determinación de susceptibilidad para cada antituberculoso se realizó por separado, debido a las características que reflejaron cada uno de los métodos. Los resultados para la determinación de susceptibilidad a Isoniacida por RT-qPCR reflejan un equilibrio entre sensibilidad y especificidad, el valor de la sensibilidad da un indicio que este método puede abarcar la mayor cantidad de cepas que verdaderamente presentan resistencia a este fármaco, pero al mismo tiempo permite afirmar que es un método altamente específico para

Mycobacterium tuberculosis resistente a Isoniacida. Relacionando estas dos características del método pudimos estimar que la exactitud, es decir la proporción de test con resultado correcto, es aceptable, pero no es el realmente esperado. Al ser un método altamente específico principalmente podemos afirmar que un resultado positivo confirma la resistencia a Isoniacida, pero si el resultado saldría negativo no habría que descartar la posibilidad que si exista la resistencia al fármaco. (Salech, F. et. al. 2008)

Los resultados de la evaluación de susceptibilidad a Rifampicina por RT-qPCR señalan que el método a ser validado es altamente sensible; es decir, que tiene la capacidad de detectar ampliamente todos los pacientes que presenten la enfermedad; lo cual indica que un resultado negativo del test descarta la resistencia a Rifampicina; sin embargo; presenta el problema de ser poco específica, este fenómeno es frecuente ya que la sensibilidad y la especificidad son inversamente proporcionales, es decir que cuanto más eleva una más baja la otra, y viceversa, por eso es muy complicado hallar métodos que encuentren un perfecto equilibrio entre ambos. (Nuñez, M. 2008). Se puede evidenciar claramente que la concordancia para el perfil de susceptibilidad a Isoniacida es mucho mayor que la de Rifampicina, este resultado puede deberse a muchos factores que se complementan con los datos obtenidos en las características de test diagnóstico que fueron calculados para este método en función del gold estándar.

Los “*likelihood ratios*” (LR) positivo y negativo, también llamados razones de verosimilitud o cociente de probabilidad, son los datos más relevantes e importantes, sin quitar significancia a las otras características diagnósticas discutidas, su importancia se debe a que estos permiten resumir y complementar en un solo valor dos propiedades de los test diagnósticos; sensibilidad y especificidad, de manera independiente a la prevalencia, esto en sentido de que se expresa como una “razón de probabilidad”, de cuantas veces más probable es que realmente la condición que está en estudio (resistencia en una cepa de *M. tuberculosis*), esté presente o no, según la presencia o ausencia de la condición.

Por esta característica, los LR permiten orientar la magnitud del cambio en caso de presentar un resultado positivo o un resultado negativo, para poder interpretar de una forma más practica este resultado se utiliza el Nomograma de Fagan (*figura 1 y 2*) el cual nos permitió observar que el cambio de sentido de la prueba, de una probabilidad pre test para Isoniacida de 43% a una probabilidad post test de 78%, de que si exista resistencia en la cepa de *M. tuberculosis* si el resultado es positivo en la RT-qPCR, mientras que si se

obtiene un resultado negativo la probabilidad de que si este presente la resistencia disminuyó de un 43% a un 12% .

Esto confirma que si se obtiene un resultado positivo para resistencia a Isoniacida mediante RT-qPCR en el 78% de los caso este resultado será acertado lo cual es un porcentaje elevado y puede permitir al médico tratante de la enfermedad cambiar el esquema terapéutico de forma temprana, la ventaja de este método es que también si se obtiene un resultado negativo para resistencia a Isoniacida, existe solo un 12% de probabilidad de que este resultado sea un falso negativo, es decir que con este valor, también se podría descartar que exista resistencia a Isoniacida y el médico podrá seguir empleando este fármaco para tratar al paciente.

En el caso de Rifampicina, si se obtiene un resultado positivo para resistencia mediante la RT-qPCR, entonces tendremos un cambio de probabilidad de que sea verdaderamente resistente, de un 37% a 45% mientras que si se tiene un resultado negativo para resistencia el cambio de probabilidad de que sea verdaderamente resistente (un falso negativo), bajará de 37% a 5%. Con esto se rectifica que la utilidad de la RT-qPCR acoplada a curvas melting es; que, si se presenta un resultado negativo de resistencia a Rifampicina, se descarta la resistencia a Rifampicina en un 95% de los casos, con este porcentaje el médico tratante podrá descartar la resistencia con una alta certeza y continuar con el esquema terapéutico que incluye a este fármaco. Por el contrario, también se rectifica que, si el resultado sale positivo para resistencia, debido a la alta sensibilidad del mismo, no se descarta que se trate de un falso positivo y podría orientar a que se cambie el tratamiento por una posible resistencia, por lo menos hasta confirmarla mediante otro método.

Existe una probabilidad de que las cepas que presentaron resistencia a Isoniacida y Rifampicina por el método de RT-qPCR acoplado a curvas melting, pero que no expresan fenotípicamente el mismo resultado, o viceversa, sean poblaciones heterogéneas de cepas de *M. tuberculosis*. Es decir que pueden existir cepas heterogéneas con perfil de susceptibilidad diferente a los fármacos de primera línea, que se hayan evaluado por un método u otro como si fuesen una sola, dando un resultado diferente entre el método de las proporciones y el evaluado en este estudio, esto sin duda baja el porcentaje de concordancia entre los métodos. Sin embargo, no se detectó curvas melting características de este tipo de poblaciones en el análisis de los resultados de este método, pero cabe recalcar que son solo curvas basadas en las instrucciones del kit comercial, por lo que no

se puede descartar la posibilidad que existan otro tipo de curvas no señaladas en el kit comercial que indiquen la presencia de estas poblaciones heterocigotas.

Trabajos como el de Torrez, M. (2010). En el que se utilizó el sistema Xpert MTB/RIF para detección de resistencia a Rifampicina por RT-qPCR en muestras extrapulmonares obtuvieron una sensibilidad de 93.5%, especificidad de 97%, VPP de 73.3% y VPN de 94.4%. Este fue realizado en Colombia, país considerado de prevalencia intermedia lo cual puede que influya mucho en el trabajo, debido a que en otro estudio, también realizado en muestras extrapulmonares, pero en países de alta prevalencia de la enfermedad, empleando el mismo sistema, se reportó una sensibilidad menor (59%) y especificidad de 92%.

CONCLUSION

La PCR en tiempo real acoplada a curvas melting si representa una herramienta de diagnóstico alternativo válida para la identificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistente. Esto se afirma debido a los valores obtenidos de sensibilidad de detección de resistencia a los fármacos de interés, para tratamiento de tuberculosis (fármacos de primera línea) cómo son la Isoniacida y la Rifampicina. Con una especificidad alta en el caso de Isoniacida, pero variable en Rifampicina. Podemos concluir que esto se debe a que para determinar que existe la presencia de resistencia a Isoniacida, el kit comercial utilizado, se basa en la detección de tres genes mutados asociados con la resistencia a este fármaco. Lo cual tiene un impacto positivo en la especificidad, aunque disminuye levemente su sensibilidad. Mientras que, para la detección de resistencia a Rifampicina, sólo emplea un gen como criterio de discriminación entre sensibilidad y resistencia, lo cual aumenta la sensibilidad, pero tiende a tener un impacto negativo en la especificidad.

Sin embargo y precisamente para amortiguar la influencia de la prevalencia en los resultados de la utilidad de esta herramienta diagnóstica, se emplearon los valores de likelihood ratio. Los cuales por tener un resultado de likelihood ratio (+) por encima de 1 (4,18) y un likelihood ratio (-) no incluye el 1, está por debajo de 0,38; además de un porcentaje de concordancia aceptable entre ambos métodos para el diagnóstico de cepas con la condición específica de ser MDR del 89,2%, más no de la misma forma para las

cepas monorresistentes donde los resultados demuestran una baja concordancia entre ambos métodos, sin que esto deje de tener una utilidad clínica significativa para orientar el tratamiento de un paciente con diagnóstico de tuberculosis.

REFERENCIAS

Calderón, R. (2005) *Validación de la reacción en cadena de la polimerasa basada en generador universal de heterodúplex para la identificación de Mycobacterium tuberculosis resistente a rifampicina y multirresistente en Lima, Perú*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Volumen 24(8) pp. 495-499 recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X0673840X>

Molina, J. (2018) *Validación de la Genotipificación como prueba para el diagnóstico y determinación de resistencia a rifampicina e isoniazida en cepas de Mycobacterium tuberculosis circulantes en Bolivia*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas – Universidad Mayor de San Andrés, La Paz Bolivia.

Lawn, S. (2011) *Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance*. Future of Medicine. Volumen 6 (9) pp. 1067–1082 recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21958145>

Moreno, A. e Hidalgo, C. (2015). *Calidad y seguridad en el laboratorio*. Madrid. España. Editorial SINTESIS.

Nuñez, M. (2008) *Evaluación de las técnicas diagnósticas: Análisis estadístico*. Uruguay. Recuperado de: https://www.alasbimn.net/comites/tecnologos/material/Eval_tec_diag.pdf

Salech, F. (2008) *Estudios que evalúan un test diagnóstico: interpretando sus resultados*. Revista médica de Chile. Volumen 136 (9) pp. 1203-1208. Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872008000900018

Torres, M. (2000) *Use of Real-Time PCR and Fluorimetry for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance-Associated Mutations in Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. Volumen 38 (9) pp. 3194–3199. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970356>

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal del Laboratorio de Referencia Nacional de Diagnóstico de Tuberculosis del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud INLASA, quienes proporcionaron las cepas de *M. tuberculosis* y toda la información de interés.

A la Dra. María Esther Chuquimia Choque por su asesoramiento en la optimización y desarrollo de las técnicas moleculares qPCR y curvas melting

Al Dr. Omar Rocabado, Laboratorio LABOGEN por el apoyo con equipamiento.