

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE EN MUESTRAS DE ESPUTO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CURVAS DE *MELTING*

Marco Galarza^{1,a}, Heinner Guio^{1,c,d}, Jenny Reques^{2,b}, Omar Piscocoya^{2,b}, Mitzi Rodríguez^{2,c}

RESUMEN

Objetivos. Analizar curvas de *melting* para el diagnóstico de tuberculosis multidrogorresistente a partir de muestras de esputo. **Materiales y métodos.** Se colectaron muestras de esputo (n = 250) de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar según resultado de baciloscopia y cultivados en medio sólido Lowenstein Jensen. Según el método de referencia se trabajó con 124 muestras sensibles a rifampicina e isoniacida, 24 resistentes a rifampicina, 33 resistentes a isoniacida y 69 multidrogorresistentes. Se evaluó por PCR en tiempo real y luego por las curvas de *melting*, se utilizó el gen *rpoB* como biomarcador de resistencia a rifampicina, y el gen *katG* y región promotora *inhA* como biomarcadores de resistencia a isoniacida. La cepa H37Rv fue considerada como control sensible a drogas. Se compararon los resultados del método de referencia y los resultados del análisis de curvas de *melting* para evaluar los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. **Resultados.** La resistencia a rifampicina mostró una sensibilidad de 90,3 %, especificidad de 90,4 %, valor predictivo positivo de 84,8 % y valor predictivo negativo de 94,0 %. La resistencia a isoniacida mostró una sensibilidad de 90,2 %, especificidad de 93,9 %, valor predictivo positivo de 91,1 % y valor predictivo negativo de 93,3 %. La detección de tuberculosis multidrogorresistente mostró valores de 89,9 %, 90,6 %, 78,5 % y 95,9 % para sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, respectivamente. **Conclusiones.** El análisis de curvas de *melting* mostró ser seguro y confiable para ser utilizado en el diagnóstico rápido de tuberculosis multidrogorresistente en muestras de esputo.

Palabras clave: Tuberculosis multidrogorresistente; Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa; Análisis mutacional de ADN; *Mycobacterium*; Polimorfismo de un solo nucleótido (fuente: DeCS BIREME)

MOLECULAR DIAGNOSIS OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS IN SPUTUM SAMPLES BY MELTING CURVE ANALYSIS

ABSTRACT

Objectives. To analyze melting curves for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis from sputum samples. **Materials and Methods.** Sputum samples (n = 250) were collected from patients with clinical suspicion of pulmonary tuberculosis as a result of bacilloscopy and cultured in solid medium Lowenstein Jensen. According to the reference method, 124 samples sensitive to rifampicin and isoniazid, 24 resistant to rifampicin, 33 resistant to isoniazid, and 69 multidrug-resistant were used. It was evaluated by real-time PCR and then by melting curves, the *rpoB* gene was used as a biomarker of rifampicin resistance, and the *katG* gene and *inhA* promoter region were used as biomarkers of isoniazid resistance. The H37Rv strain was considered a drug-sensitive control. The results of the reference method and the results of the melting curve analysis were compared to evaluate the parameters of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value. **Results.** Rifampicin resistance showed a sensitivity of 90.3%, specificity of 90.4%, positive predictive value of 84.8% and negative predictive value of 94.0%. Isoniazid resistance showed a sensitivity of 90.2%, specificity of 93.9%, positive predictive value of 91.1% and negative predictive value of 93.3%. The detection of multidrug-resistant tuberculosis showed values of 89.9%, 90.6%, 78.5% and 95.9% for sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value, respectively. **Conclusions.** The melting curve analysis showed to be safe and reliable to be used in the rapid diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis in sputum samples.

Keywords: Multidrug-resistant tuberculosis; Real-time polymerase chain reaction; Mutational DNA analysis; *Mycobacterium*; Single nucleotide polymorphism (source: DeCS BIREME)

¹ Laboratorio de Referencia Nacional de Biología Molecular y Biotecnología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Laboratorio de Referencia de Tuberculosis y Microbiología, Dirección Regional de Salud Callao. Lima, Perú.

^a Biólogo molecular; ^b microbiólogo; ^c médico; ^d PhD

Recibido: 22/01/2018 Aprobado: 18/07/2018 En línea: 21/09/2018

Citar como: Galarza M, Guio H, Reques J, Omar Piscocoya O, Rodríguez M. Diagnóstico molecular de tuberculosis multidrogorresistente en muestras de esputo mediante el análisis de curvas de *melting*. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2018;35(3):433-40. doi:10.17843/rpmesp.2018.353.3402.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2015 se han reportado 10,4 millones de casos nuevos de tuberculosis (TB) en todo el mundo. De estos, 480 000 fueron casos nuevos de tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) y adicionalmente 100 000 casos fueron resistentes solamente a rifampicina (RIF) ⁽¹⁾. En Perú, la alta incidencia de TB y el incremento de cepas de TB-MDR es uno de los mayores problemas en salud pública. La incidencia acumulada de TB fue de 119 casos por 100 000 habitantes, de los cuales 2000 fueron casos nuevos de TB-MDR y TB resistente a RIF ⁽²⁾. Lima concentra el 80 % de casos de TB-MDR y el 90 % de casos de tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR); esto debido a la superpoblación de los distritos y al hacinamiento de los centros penitenciarios ⁽³⁾.

La región Callao es uno de los lugares con mayor carga de TB, en el 2015 su incidencia acumulada fue de 218 casos por 100 000 habitantes; diagnosticándose 2204 nuevos casos de TB ^(3,4). Por otro lado, el transporte público también contribuye, como factor de riesgo, a la diseminación de la TB debido a la cantidad excesiva de usuarios que utilizan este tipo de transporte ⁽⁵⁾.

Existen dos factores principales por los cuales una micobacteria adquiere resistencia a drogas: 1) debido a la adquisición de mutaciones y 2) la activación de bombas de eflujo, característica propia de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), a diferencia de otras bacterias que adquieren resistencia a través de plásmidos o transposones ⁽⁶⁾. La TB-MDR se define como la resistencia a las dos drogas principales usadas en el tratamiento de la enfermedad: RIF e isoniácida (INH); mientras que la TB-XDR está definida como la resistencia a RIF, INH, a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres antituberculosos inyectables de segunda línea. Es necesaria la detección temprana de la enfermedad para disminuir el contagio hacia otras personas. Asimismo, la quimioprofilaxis con INH disminuye el riesgo de desarrollo de la enfermedad en los contactos intradomiciliarios ⁽⁷⁾.

En la actualidad, la baciloscopia de esputo es la manera más rápida y menos costosa para detectar al MTB. El método se emplea para diagnosticar TB en individuos con presunta enfermedad pulmonar que acuden a los centros de salud con cuadros de tos por más de 15 días. También se utiliza para monitorear el progreso de los pacientes contagiosos durante la quimioterapia, incluida la confirmación de la curación ⁽⁸⁾.

La RIF es un antibiótico que inhibe la enzima ARN polimerasa de la micobacteria. La resistencia a esta droga está localizada en una región de 81 pares de bases (pb) del gen *rpoB*. Los codones más frecuentes en esta región corresponden a las posiciones 516, 526 y 531. Cualquier cambio que origine una mutación en estas posiciones está relacionado con resistencia a la droga ⁽⁹⁾.

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio. Los métodos convencionales para aislamiento y susceptibilidad a drogas demandan un tiempo considerable, es por ello que se planteó el análisis de curvas de *melting* para la detección de tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) a partir de muestras de esputo.

Principales hallazgos. El análisis de curvas de *melting* mostró valores de sensibilidad y especificidad por encima del 90 % para diagnóstico de TB-MDR.

Implicancias. Estos resultados muestran que el análisis de curvas de *melting* podría ser utilizado como una prueba adicional de tamizaje para el diagnóstico de la tuberculosis; además por ser de bajo costo, fácil interpretación, y requerir menos tiempo para el diagnóstico.

La INH es una prodroga que es activada por la enzima *katG* (catalasa-peroxidasa) y actúa inhibiendo la síntesis de ácido micólico. La resistencia a INH está asociada a un cambio puntual de nucleótido en el codón 315 del gen *katG*. En la región promotora *inhA*, los cambios en las posiciones -8, -15 y -24 están relacionados a resistencia. Otros genes menos frecuentes tales como: *ahpC*, *kasA* y *ndh* pueden presentar regiones de mutación relacionadas a INH. Tanto el gen *katG* como la región promotora *inhA* son las más usadas en el diagnóstico de TB-MDR ⁽¹⁰⁾.

El conocimiento a nivel molecular de las regiones de resistencia ha facilitado la introducción de métodos rápidos para el diagnóstico de TB-MDR. Actualmente, se puede determinar, en horas, si un paciente presenta TB sensible o resistente gracias a las bondades que brindan algunos kits comerciales tales como INNOLiPA Rif TB, GenXpert y Genotype MTBDR_{plus} ⁽¹¹⁻¹³⁾. Asimismo, metodologías basadas en sondas Fret, *molecular beacons* y sondas TaqMan son de gran ayuda en el diagnóstico de TB pulmonar y extrapulmonar ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Además, estas metodologías son menos costosas que el agar proporciones en placa (APP), el cual es el método de referencia. La desventaja del APP es que demora, en promedio, 28 días para aislar la micobacteria y dos meses más para conocer la susceptibilidad a drogas ⁽¹⁷⁾.

El análisis de curvas de *melting* (*High Resolution Melting*) (HRM) es un procedimiento posterior al PCR en tiempo real; donde, con ayuda de un fluoróforo y un rango de temperatura, se pueden discriminar curvas *wild type* de curvas de mutación relacionadas con la resistencia a una droga específica ^(18,19). Los primeros trabajos con análisis de curvas de *melting* se realizaron en la identificación de mutaciones en *K-ras* para detección de cáncer colorrectal ⁽²⁰⁾.

La ventaja de utilizar el análisis de curvas de *melting* en la detección y genotipificación de patógenos frente a métodos convencionales de aislamiento y susceptibilidad a drogas que demandan un tiempo considerable justifica la

realización del presente estudio. Por tal razón, el objetivo fue analizar las curvas de *melting* para la detección de TB-MDR a partir de muestras de esputo.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional descriptivo a partir de muestras de esputo proporcionados por el Biobanco del Laboratorio de Micobacterias de la Dirección Regional de Salud (DIRESA) de la región Callao en Perú.

MUESTRAS CLÍNICAS Y EXTRACCIÓN DE ADN

Un total de 250 muestras de esputo previamente descontaminados fueron seleccionados para el estudio. El criterio de selección fue en base al frotis positivo con diagnóstico de baciloscopia (BK): paucibacilar, 1+, 2+ y 3+. Se consideró frotis paucibacilar cuando las micobacterias estuvieron presentes en número de 1-9 por campo en 100 campos observados. Para BK 1+ se consideró micobacterias presentes en número de 10-99 por campo en 100 campos observados. Para BK 2+ se consideró micobacterias presentes en número de 1-10 por campo en 50 campos observados. En el caso de BK 3+ se consideró micobacterias presentes en número >10 por campo en 20 campos observados. El número de muestras de esputo según BK fueron: 21, 72, 76 y 81 respectivamente. El diagnóstico de monoresistencia o multidrogorresistencia mediante el método de referencia se detalla en la Tabla 1. Previo a la extracción de ADN, se realizó un tratamiento con lisozima a las muestras de esputo por dos horas a 56 °C. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen) basado en columnas de sílice. La cuantificación se realizó en el equipo Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Las concentraciones de ADN obtenidas

Tabla 1. Características fenotípicas en 250 muestras de esputo de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar

Baciloscopia	Susceptibilidad a drogas antituberculosas					%
	Sensible*	Resistente a RIF	Resistente a INH	MDR	Total	
Paucibacilar	8	3	4	6	21	8,4
1+	35	10	9	18	72	28,8
2+	38	7	9	22	76	30,4
3+	43	4	11	23	81	32,4
Total	124	24	33	69	250	100,0

* sensible a RIF e INH

RIF: rifampicina, INH: isoniacida, MDR: multidrogorresistencia (resistente a RIF e INH)

Paubacilar: 1-9 micobacterias por campo en 100 campos observados

1+: 10-99 micobacterias por campo en 100 campos observados

2+: 1-10 micobacterias por campo en 50 campos observados

3+: >10 micobacterias por campo en 20 campos observados

estuvieron entre los rangos de 1-10 ng/μl. Posteriormente, el ADN genómico se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso. Los procedimientos de extracción y cuantificación de ADN se realizaron en los ambientes del Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud de Perú.

SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSAS

A partir de aislamientos de las micobacterias en medio sólido Lowenstein Jensen, se realizó la siembra en caldo Middlebrook 7H9 y se incubaron a 37 °C por siete días. Luego del crecimiento bacteriano, se prepararon diluciones (10⁻¹ a 10⁻⁴) en solución salina-Tween 80 y se sembraron en placas con medio Middlebrook 7H10, incubándose a 37 °C por 21 días. Se usaron las concentraciones de 0,2 μg/mL y 1,0 μg/mL para INH y 1,0 μg/mL para RIF. Las lecturas de las placas se realizaron con el conteo de colonias en la placa control (H37Rv) frente a las placas conteniendo las drogas. Para la interpretación del resultado se consideraron las proporciones críticas, si la proporción crítica fue mayor a 1 %, se informó como resistente; y si fue menor al 1 %, se informó como sensible a una droga específica.

DISEÑO DE PRIMERS Y ANÁLISIS HRM PARA DETECCIÓN DE TB-MDR EN MUESTRAS DE ESPUTO

En la Tabla 2, se indican los *primers* empleados para la identificación de mutaciones en RIF e INH. Estos *primers* fueron sintetizados por el proveedor Life Technologies (Brasil) a una concentración de 200 nM. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Cada reacción de PCR incluyó el kit comercial: Master Mix 1X HRM (enzima Hot Star Taq Plus DNA polimerasa, HRM PCR buffer con dye Eva Green, solución Q y dNTPs) de la marca Qiagen, 0,7 uM de cada *primer*, 2 ul (1 ng/ul) de ADN de MTB y agua libre de RNasa. El PCR en tiempo real se realizó en el equipo Rotogene Q (Qiagen) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 7 minutos. El análisis

Tabla 2. Secuencias de *primers* usados en el análisis de curvas de *melting*

Primer	Gen*	Secuencia	Producto en pares de bases
rpoB-F	<i>rpoB</i>	CGCGATCAAGGAGTTCTTC	118
rpoB-R	<i>rpoB</i>	TGACAGACCGCCGGGCC	118
katG-F	<i>katG</i>	GCTGAGCCAATTCATGGACC	235
katG-R	<i>katG</i>	TGACAGACCGCCGGGCC	235
inhA-F	promotor <i>inhA</i>	GCGGTACACATTTTCGGTAA	190
inhA-R	promotor <i>inhA</i>	GGTGTTCGTCATACGACCT	190

El rango de temperatura fue de 80 a 95 °C

* genes relacionados con resistencia a rifampicina e isoniacida

F: *primer* sentido, R: *primer* antisentido.

de HRM se realizó entre los intervalos de temperatura de 55 °C a 85 °C con incrementos de 0,02 °C. Se usó el ADN de la cepa H37Rv como referencia y se analizó las curvas de *melting*, posterior al PCR en tiempo real, para identificar las regiones de mutación relacionadas a la resistencia a RIF e INH en los genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*, respectivamente. Las muestras de esputo con un perfil de curva de diferenciación similar a H37Rv fueron considerados sensible a la droga específica. Por el contrario, las muestras de esputo con perfil de curva de diferenciación distinto a H37Rv fueron considerados resistentes a la droga específica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados con el programa SPSS versión 21.0. Se evaluaron los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del análisis de curvas de *melting* en comparación con el APP, considerado el método de referencia. Se elaboró una tabla tetracórica con los resultados y se calcularon los parámetros antes mencionados considerando los resultados de baciloscopia y la capacidad para detección de TB-MDR.

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud de Perú.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE CURVAS DE MELTING PARA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA EN MUESTRAS DE ESPUTO

De las 250 muestras de esputo y con perfil fenotípico conocido, el análisis de curvas de *melting* identificó 151 curvas de diferenciación que coincidieron con perfil sensible de la cepa ATCC H37Rv y 99 curvas de diferenciación que fueron claramente diferentes del patrón sensible H37Rv y fueron clasificados como resistentes a RIF. En comparación con el método de referencia, el análisis de curvas de *melting* identificó seis perfiles más como resistentes a RIF. Las

curvas de diferenciación, según resultados de baciloscopia, con los perfiles sensible (círculos negros) y resistente (círculos rojos) se observan en la Figura 1. Considerando al gen *rpoB* como marcador de resistencia a RIF, se encontró que la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron de 90,3 %, 90,4 %, 84,8 % y 94,0 %, respectivamente (Tabla 4).

ANÁLISIS DE CURVAS DE MELTING PARA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ISONIACIDA EN MUESTRAS DE ESPUTO

De las 250 muestras de esputo y con perfil fenotípico conocido, el análisis de curvas de *melting* identificó 149 curvas de diferenciación que coincidieron con perfil sensible de la cepa ATCC H37Rv y 101 curvas de diferenciación que fueron claramente diferentes del patrón sensible H37Rv y fueron clasificados como resistentes a INH. En comparación con el método de referencia, el análisis de curvas de *melting* identificó un perfil menos como resistentes a INH. Las curvas de diferenciación, según resultados de baciloscopia, con los perfiles sensible (círculos negros) y resistente (círculos rojos) se observan en la Figura 1. Considerando al gen *katG* y la región promotora *inhA*, se encontró que la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron 90,2 %, 93,9 %, 91,1 % y 93,3 %, respectivamente (Tabla 4).

ANÁLISIS DE CURVAS DE MELTING PARA DETECCIÓN DE TB-MDR EN MUESTRAS DE ESPUTO

De las 250 muestras de esputo y con perfil fenotípico conocido, el análisis de curvas de *melting* identificó 171 curvas de diferenciación que coincidieron con perfil sensible a RIF e INH y 79 curvas de diferenciación que fueron claramente diferentes del patrón sensible H37Rv y fueron clasificados como resistentes a RIF e INH. En comparación con el método de referencia, el análisis de curvas de *melting* identificó un perfil menos como resistentes a ambas drogas (Tabla 3). Considerando a los genes *rpoB*, *katG* y la región promotora *inhA*, se encontró que la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron 89,9 %, 90,6 %, 78,5 % y 95,9 % respectivamente (Tabla 4). Estos parámetros estadísticos se incrementan cuando se toma en cuenta el puntaje de BK. Los valores más bajos se observan en BK paucibacilares y más altos en BK 3+ (Tabla 5).

Tabla 3. Comparación de resultados del análisis de curvas de *melting* versus agar proporciones en placa en 250 muestras de esputo de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar

Método de análisis	Perfil	Agar proporciones en placa					
		RIF		INH		TB-MDR	
		Resistente*	Sensible	Resistente [†]	Sensible	Resistente	Sensible
Curvas de <i>melting</i>	Resistente [‡] §	84	15	92	9	62	17
	Sensible	9	142	10	139	7	164
Total	250	93	157	102	148	69	181

* micobacterias que crecen en medio sólido a una concentración de 1,0 µg/mL de RIF

† micobacterias que crecen en medio sólido a concentraciones de 0,5 µg/mL y 1,0 µg/mL de INH

‡ micobacterias que presentan mutación en el gen *rpoB* relacionado con resistencia a RIF

§ micobacterias que presentan mutaciones en los genes *katG* e *inhA* relacionados con resistencia a INH

RIF: Rifampicina, INH: Isoniacida, TB-MDR: tuberculosis multidrogoresistente, con resistencia a RIF e INH

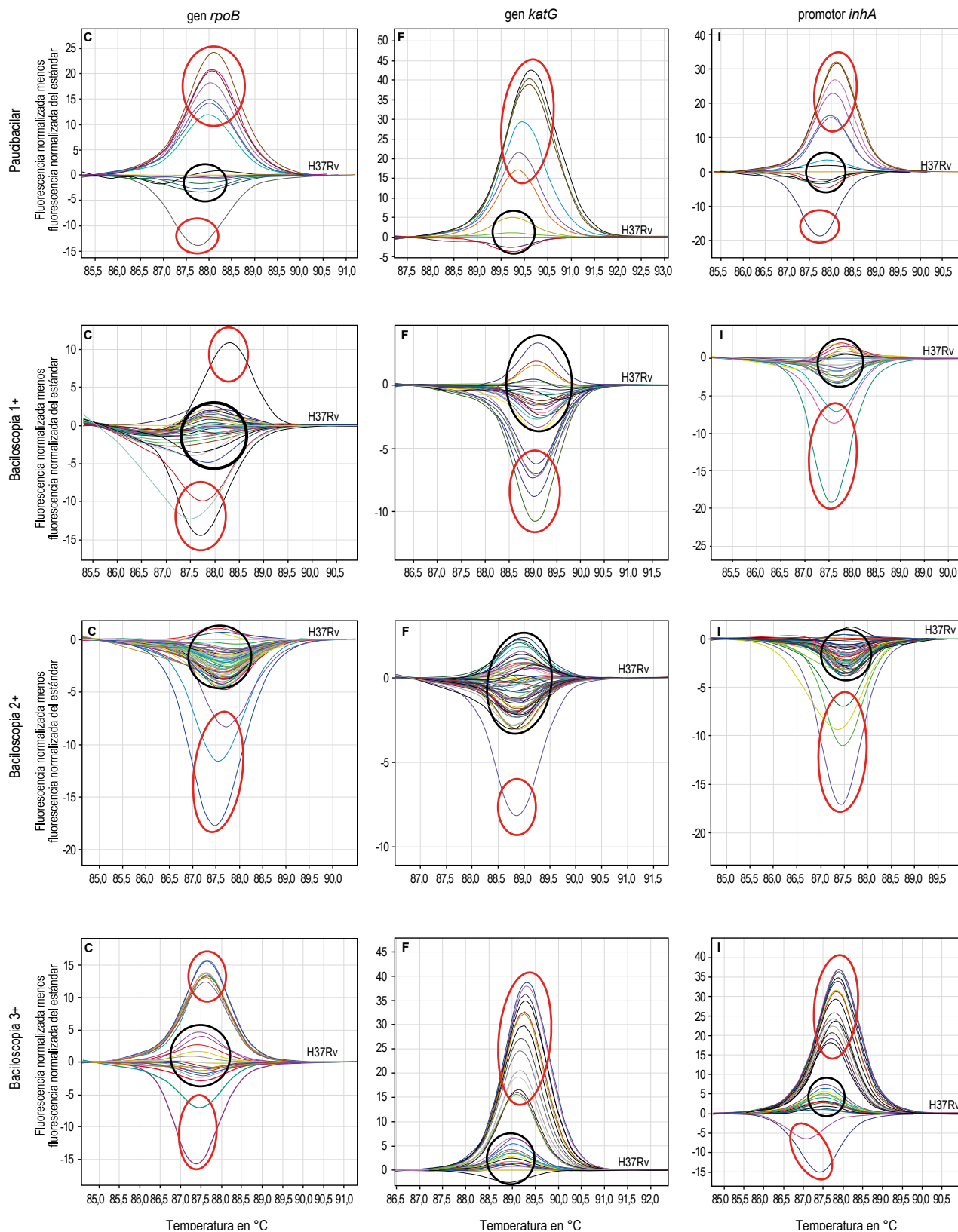


Figura 1. Análisis de curvas de *melting* para detección de tuberculosis multidrogorresistente en genes *rpoB* (rifampicina), *katG* y promotor *inhA* (isoniacida), según resultado de baciloscopia en muestras de esputo

Tabla 4. Parámetros de rendimiento diagnóstico en el análisis de curvas de *melting* para cada gen y condición de resistencia

Condición de resistencia	Gen*/ región	Parámetros evaluados	Valor final (%)	IC95 %
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Sensibilidad	90,3	82,0 - 95,2
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Especificidad	90,4	84,5 - 94,4
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Valor predictivo positivo	84,8	75,9 - 91,0
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Valor predictivo negativo	94,0	88,6 - 97,1
Isoniacida	<i>katG/ promotor inhA</i>	Sensibilidad	90,2	82,3 - 94,9
Isoniacida	<i>katG/ promotor inhA</i>	Especificidad	93,9	88,4 - 97,0
Isoniacida	<i>katG/ promotor inhA</i>	Valor predictivo positivo	91,1	83,3 - 95,6
Isoniacida	<i>katG/ promotor inhA</i>	Valor predictivo negativo	93,3	87,7 - 96,6
MDR	<i>rpoB, katG/ promotor inhA</i>	Sensibilidad	89,9	79,6 - 95,5
MDR	<i>rpoB, katG/ promotor inhA</i>	Especificidad	90,6	85,2 - 94,3
MDR	<i>rpoB, katG/ promotor inhA</i>	Valor predictivo positivo	78,5	67,5 - 86,6
MDR	<i>rpoB, katG/ promotor inhA</i>	Valor predictivo negativo	95,9	91,4 - 98,2

* Genes relacionados con resistencia a rifampicina e isoniacida
 MDR: condición multidrogoresistente
 IC95 %: intervalo de confianza al 95 %

Las curvas de amplificación y curvas normalizadas se detallan en los anexos.

DISCUSIÓN

El presente estudio permitió identificar TB-MDR basado en el análisis de curvas de *melting* que discrimina aislamientos de MTB sensibles y resistentes a drogas. Los resultados de los parámetros analizados fueron variables según el gen relacionado a la resistencia de una droga específica. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron mayores al 90 % cuando se analiza como gen independiente. Asimismo, se observó que los resultados de BK tienen una relación directa con los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN. Los valores de sensibilidad y especificidad son mayores en muestras con BK 3+ en comparación a las muestras paucibacilares, BK 1+ y BK 2+. La detección de TB-MDR se realizó en base en los genes *rpoB*, *katG* y la región promotora *inhA*. Los valores obtenidos en el

análisis curvas de *melting* fueron adecuados y podrían ser considerados como prueba de tamizaje en el diagnóstico de TB-MDR.

En Perú, desde el 2010 se viene usando métodos moleculares basados en el uso del kit comercial Genotype MTBDR*plus* que combina un PCR convencional multiplex y una posterior hibridación reversa en tira de nitrocelulosa que hacen que la metodología sea compleja y aplicable a muestras de esputo con baciloscopia mínima (1+) según recomendaciones del fabricante. Es necesario mencionar que el método molecular tiene un costo aproximado de 176 PER (53,65 USD), considerado alto, en comparación con otros métodos (17). Ante este precedente, el análisis de curvas de *melting* resulta ser una alternativa ideal para el diagnóstico de TB-MDR en muestras de esputo mediante un PCR en tiempo real, debido a que se puede realizar en menos de 24 horas (si se trabaja un grupo reducido de muestras); además de ser de bajo costo y de fácil interpretación.

Tabla 5. Parámetros diagnósticos en el análisis de curvas de *melting* y agar proporciones en placa para detección TB-MDR según resultado de baciloscopia

Resultado de baciloscopia	HRM		% variante	APP		% resistente	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)
	+	-		+	-					
Paucibacilar	10	11	47,6	6	15	28,6	66,7 (24,1-94,0)	60,0 (32,9-82,5)	40,0 (13,7-72,6)	81,8 (47,8-96,8)
1 +	16	56	22,2	18	54	25,0	83,3 (57,7-95,6)	88,9 (76,7-95,4)	71,4 (47,7-87,8)	94,1 (82,8-98,5)
2 +	20	56	26,3	22	54	28,9	81,8 (59,0-94,0)	90,7 (78,9-96,5)	78,3 (55,8-91,7)	92,5 (80,9-97,6)
3 +	24	57	29,6	23	58	28,4	87,0 (65,3-96,6)	91,4 (80,3-96,8)	80,0 (58,7-92,4)	94,6 (84,2-98,6)

HRM: análisis de curvas de *melting*, APP: agar proporciones en placa, IC95%: intervalo de confianza al 95 %, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo
 Paucibacilar: 1-9 micobacterias por campo en 100 campos observados
 1+: 10-99 micobacterias por campo en 100 campos observados
 2+: 1-10 micobacterias por campo en 50 campos observados
 3+: >10 micobacterias por campo en 20 campos observados

Se han reportado diversos estudios relacionados al diagnóstico de TB-MDR mediante análisis de curvas de *melting* en aislamientos de MTB en comparación con el método de referencia. Galarza *et al.* reportaron valores de sensibilidad y especificidad mayores al 90 % para la detección de TB-MDR; además identificaron que las mutaciones más frecuentes en relación a los genes *rpoB*, *katG* y región *inhA* fueron S531L, S315T1 y C-15T⁽²¹⁾.

Sin embargo, los estudios realizados en muestras de esputo son escasos. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a lo reportado por Tavakkoliamol *et al.* quienes analizaron 2000 muestras de esputos positivos a través de curvas de *melting* encontrando una sensibilidad de 98,6 % y una especificidad de 100,0 % en la detección de mutaciones puntuales⁽²²⁾; y a lo reportado por Anthwal *et al.* quienes analizaron 124 muestras de esputo obteniendo valores de 89,0 %, 85,0 % y 100,0 % de sensibilidad en los genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*, respectivamente, y una especificidad de 100,0 % en todos los genes⁽²³⁾.

La calidad del ADN influye en la obtención de una adecuada discriminación entre curvas de diferenciación sensible y resistente a una droga específica. La purificación del ADN con kit comercial discrimina adecuadamente las curvas de *melting* en comparación con métodos caseros como *boiling* (hervido) de las muestras o purificación basado en resinas tales como chelex (datos no incluidos).

Asimismo, a partir de muestras de esputo, los métodos convencionales como los kits comerciales extraen todo el ADN presente en las muestras, es decir, extraen tanto el ADN de la micobacteria como el humano⁽²⁴⁻²⁷⁾. Es necesario optimizar el aislamiento de ADN bacteriano en muestras que también contengan ADN humano. Al respecto, kits

comerciales de enriquecimiento (basados en la identificación de grupos metilo), como LOOXSTER® Enrichment podrían ser usados sólo para aislar ADN bacteriano o fúngico y no ADN humano⁽²⁸⁾.

Una de las limitaciones del estudio fue la utilización de muestras de esputos paucibacilares con baja carga bacteriana y que en los análisis finales de diagnóstico de TB-MDR influyeron en la disminución de la sensibilidad y especificidad. A pesar de esto, los resultados de los parámetros analizados son relevantes y concordante con la literatura revisada.

En conclusión, el análisis de curvas de *melting* mostró valores adecuados de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico rápido de TB-MDR a partir de muestras de esputo, siendo capaz de identificar mutaciones de resistencia a drogas basado en genes específicos. Estos resultados avalan la utilización de este método como una prueba adicional de tamizaje para el diagnóstico de la tuberculosis, además de ser de bajo costo, fácil interpretación, y requerir menos tiempo para el diagnóstico.

Agradecimientos: Al Dr. Cesar Cabezas, jefe del Instituto Nacional de Salud, quien durante su gestión apoyó las investigaciones relacionadas a la tuberculosis. A la Lic. Vilma Yarleque por su apoyo en la compra de reactivos necesarios para la investigación. A Harrison Montejo por su apoyo en la logística de los insumos.

Contribuciones de autoría: MG y HG han participado en la concepción y diseño del artículo. Los procedimientos y resultados fueron realizados por JR, OP, MR y MG. Los análisis y discusiones fueron realizados por MG y OP. La redacción del artículo estuvo a cargo de MG y JR. La revisión crítica la realizó MG, HG y OP. La versión final estuvo a cargo de MG.

Fuentes de financiamiento: Financiado por fondos de investigación del Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

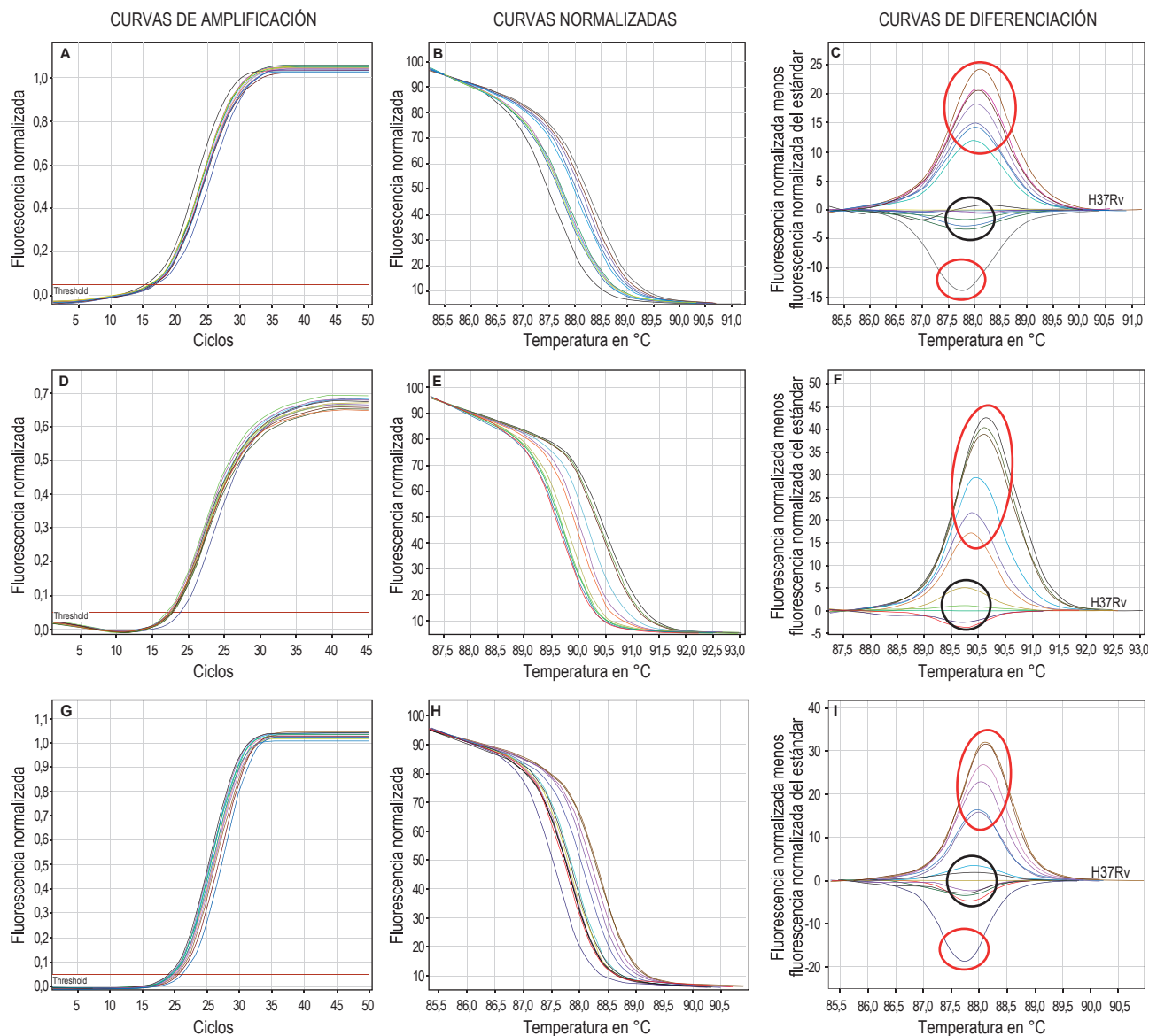
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Zumla A, George A, Sharma V, Herbert RHN, Baroness Masham of Ilton, Oxley A, Oliver M. The WHO 2014 global tuberculosis report-further to go. *Lancet Glob Health.* 2015;3(1):e10-2. doi: 10.1016/S2214-109X(14)70361-4.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014 [Internet]. Geneva: WHO; 2014. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21634en/s21634en.pdf>
- Zarate E, Lobón I, Saavedra C, Castañeda M. Tuberculosis en nuevos escenarios: establecimientos penitenciarios. *An Fac Med.* 2005;66(2):148-58.
- Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2017;34(2):299-310. doi: 10.17843/rpmesp.2017.342.2384.
- Horna-Campos O, Bedoya-Lama A, Romero-Sandoval N, Martín-Mateo M. Risk of tuberculosis in public transport sector workers, Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14(6):714-9.
- Vilchère C, Jacobs WR. Resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: genes, mutations, and causalities. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4):MGM2-0014-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013.
- Caminero Luna JA. ¿Es la quimioprofilaxis una buena estrategia para el control de la tuberculosis? *Med Clin (Barc)* 2001;116:223-9. doi: 10.1016/S0025-7753(01)71777-0.
- Frieden T. Tuberculosis: detección de casos, tratamiento y vigilancia: preguntas y respuestas [Internet]. Kurt Toman. 2ed. Washington, D.C.: OPS; 2006. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/742/9275316171.pdf?sequence=1>
- Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, *et al.* Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet.* 2011;44(1):106-10. doi: 10.1038/ng.1038.

10. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res.* 2001;2(3):164-8.
11. Škendere G, Holtz T, Riekstina V, Leimane V. Implementation of the INNO-LiPA Rif. TB* line-probe assay in rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(11):1546-52. doi: 10.5588/ijtld.11.0067.
12. Atehortúa Muñoz SL, Rendón Muñoz J, Cárdenas Moreno SV, Arango Ferreira C, Cornejo Ochoa JW. Xpert MTB/RIF* como herramienta diagnóstica en una cohorte de niños menores de 15 años con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar en un hospital de alta complejidad de Medellín. *Infectio.* 2016;21(1):25-31.
13. Ascencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, et al. Prueba molecular Genotype* MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2012;29(1):92-98.
14. Mansour A, Tammam S, Althani A, Azzazy HM. A single tube system for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA using gold nanoparticles based FRET assay. *J Microbiol Methods.* 2017;139:165-167. doi: 10.1016/j.mimet.2017.06.001.
15. Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, Telenti A, Miller LP, Kramer FR, et al. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol.* 1998;16(4):359-63.
16. Savelkoul PH, Catsburg A, Mulder S, Oostendorp L, Schirm J, Wilke H, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with real time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *J Microbiol Methods.* 2006;66(1):177-80.
17. Solari L, Gutiérrez A, Suárez C, Jave O, Castillo E, Yale G, et al. Análisis de costos de los métodos rápidos para diagnóstico de tuberculosis multidrogorresistente en diferentes grupos epidemiológicos del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011;28(3):426-31.
18. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem.* 2003;49(3):396-406.
19. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 2003;49(6 Pt 1):853-60.
20. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2006;6(1):295.
21. Galarza M, Fasabi M, Levano KS, Castillo E, Barreda N, Rodríguez M, et al. High-resolution melting analysis for molecular detection of multidrug resistance tuberculosis in Peruvian isolates. *BMC Infect Dis.* 2016;16:260. doi: 10.1186/s12879-016-1615-y.
22. Tavakkoliamol Z, Nazemi A, Khatamnejad MR. Study of Mutations in katG and inhA Genes by High Resolution Method in Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Infect Epidemiol Med.* 2016;2(1): 4-7.
23. Anthwal D, Gupta RK, Bhalla M, Bhatnagar S, Tyagi JS, Haldar S. Direct Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Sputum Samples from Tuberculosis Patients by High-Resolution Melt Curve Analysis. *J Clin Microbiol.* 2017;55(6):1755-66. doi: 10.1128/JCM.02104.16.
24. Meaza A, Kebede A, Yaregal Z, Dagne Z, Moga S, Yenew B, et al. Evaluation of genotype MTBDR plus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):280. doi: 10.1186/s12879-017-2389-6.
25. Dorman SE, Chihota VN, Lewis JJ, van der Meulen M, Mathema B, Beylis N, et al. Genotype MTBDRplus for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance in strains from gold miners in South Africa. *J J Clin Microbiol.* 2012 Apr;50(4):1189-94. doi: 10.1128/JCM.05723-11.
26. Meyer AJ, Atuheire C, Worodria W, Kizito S, Katamba A, Sanyu I, et al. Sputum quality and diagnostic performance of GeneXpert MTB/RIF among smear-negative adults with presumed tuberculosis in Uganda. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180572. doi: 10.1371/journal.pone.0180572.
27. Walusimbi S, Bwanga F, De Costa A, Haile M, Joloba M, Hoffner S. Meta-analysis to compare the accuracy of GeneXpert, MODS and the WHO 2007 algorithm for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2013;13:507. doi: 10.1186/1471-2334-13-507.
28. Bruns T, Sachse S, Straube E, Assefa S, Herrmann A, Hagel S, et al. Identification of bacterial DNA in neutrocytic and non-neutrocytic cirrhotic ascites by means of a multiplex polymerase chain reaction. *Liver Int.* 2009;29(8):1206-14. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02073.x.

Correspondencia: Marco Galarza Pérez
 Dirección: Av. Defensores del Morro 2268 - Chorrillos
 Teléfono: 01 7481111 anexo 1424
 Correo: marcogalarzaperez@gmail.com

ANEXOS



Anexo 1. Perfil del análisis de curvas de melting para detección de tuberculosis multidrogorresistente en esputos paucibacilares en genes *rpoB* (rifampicina), *katG* y promotor *inhA* (isoniacida)

Las muestras con perfil de resistencia se agrupan en círculo rojo mientras que los perfiles sensibles se agrupan en círculo negro

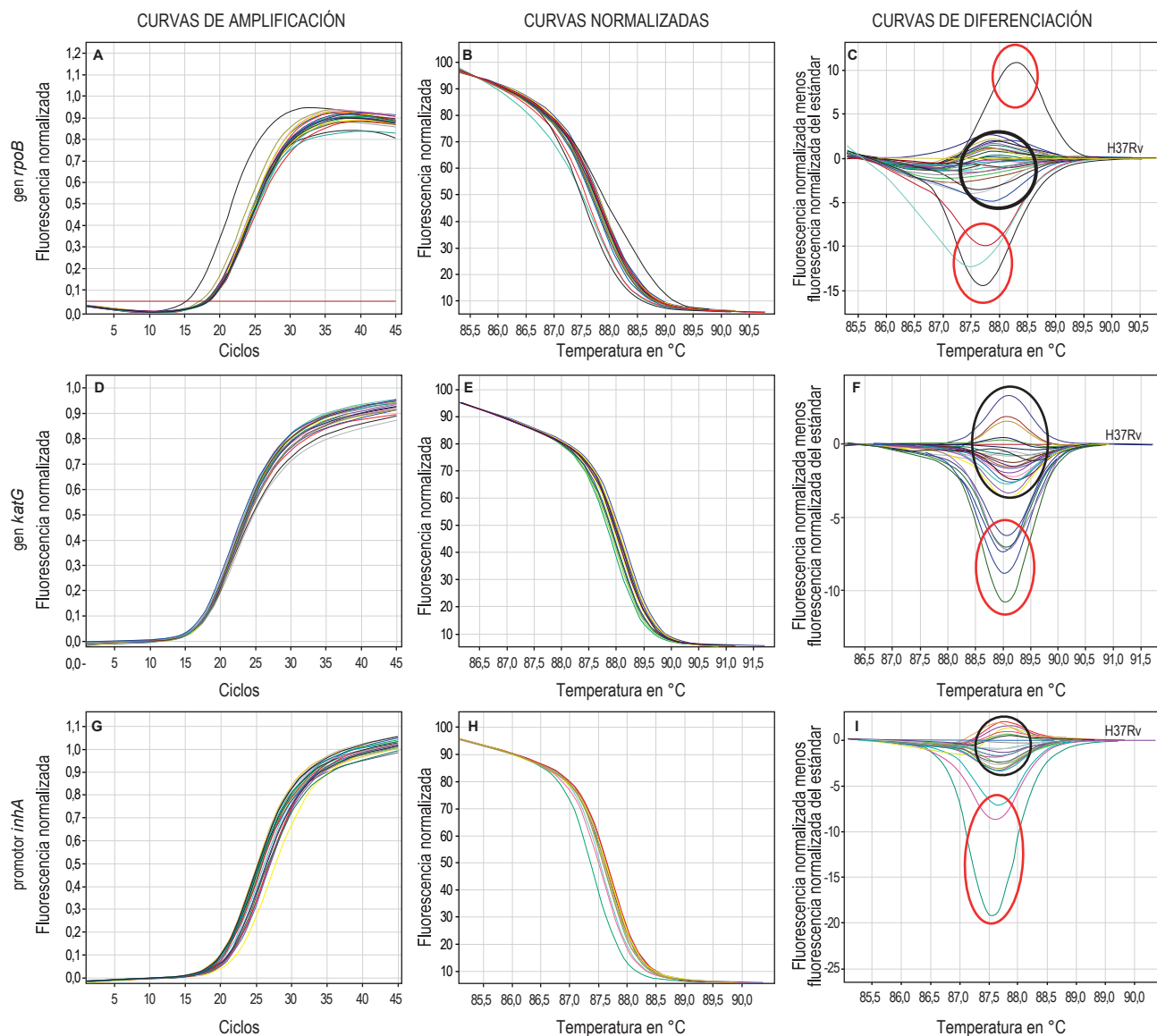
La cepa H37Rv sirvió como muestra de referencia sensible a las drogas rifampicina e isoniazida

Paucibacilar: micobacterias presentes en número de 1-9 por campo en 100 campos observados

A, D y G: curvas de amplificación en esputos paucibacilares en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

B, E y H: curvas normalizadas en esputos paucibacilares en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

C, F e I: curvas de diferenciación en esputos paucibacilares en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*



Anexo 2. Perfil del análisis de curvas de melting para detección de tuberculosis multidrogorresistente en esputos BK 1+ en genes *rpoB* (rifampicina), *katG* y promotor *inhA* (isoniacida)

Las muestras con perfil de resistencia se agrupan en círculo rojo mientras que los perfiles sensibles se agrupan en círculo negro

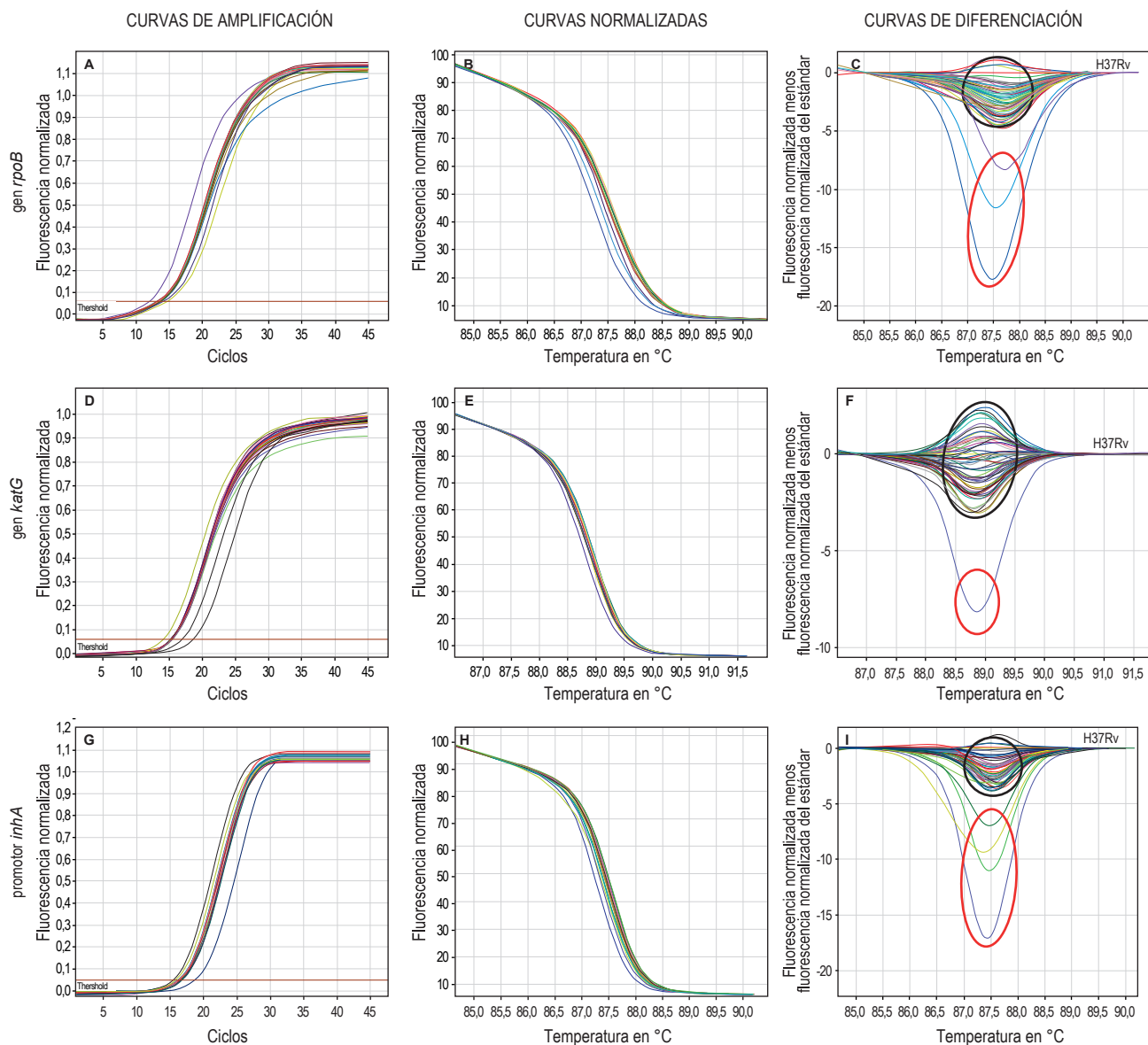
La cepa H37Rv sirvió como muestra de referencia sensible a las drogas rifampicina e isoniacida

BK 1+: micobacterias presentes en número de 10-99 por campo en 100 campos observados

A, D y G: curvas de amplificación en esputos BK 1+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

B, E y H: curvas normalizadas en esputos BK 1+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

C, F e I: curvas de diferenciación en esputos BK 1+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*



Anexo 3. Perfil del análisis de curvas de melting para detección de tuberculosis multidrogorresistente en esputos BK 2+ en genes *rpoB* (rifampicina), *katG* y promotor *inhA* (isoniacida)

Las muestras con perfil de resistencia se agrupan en círculo rojo mientras que los perfiles sensibles se agrupan en círculo negro

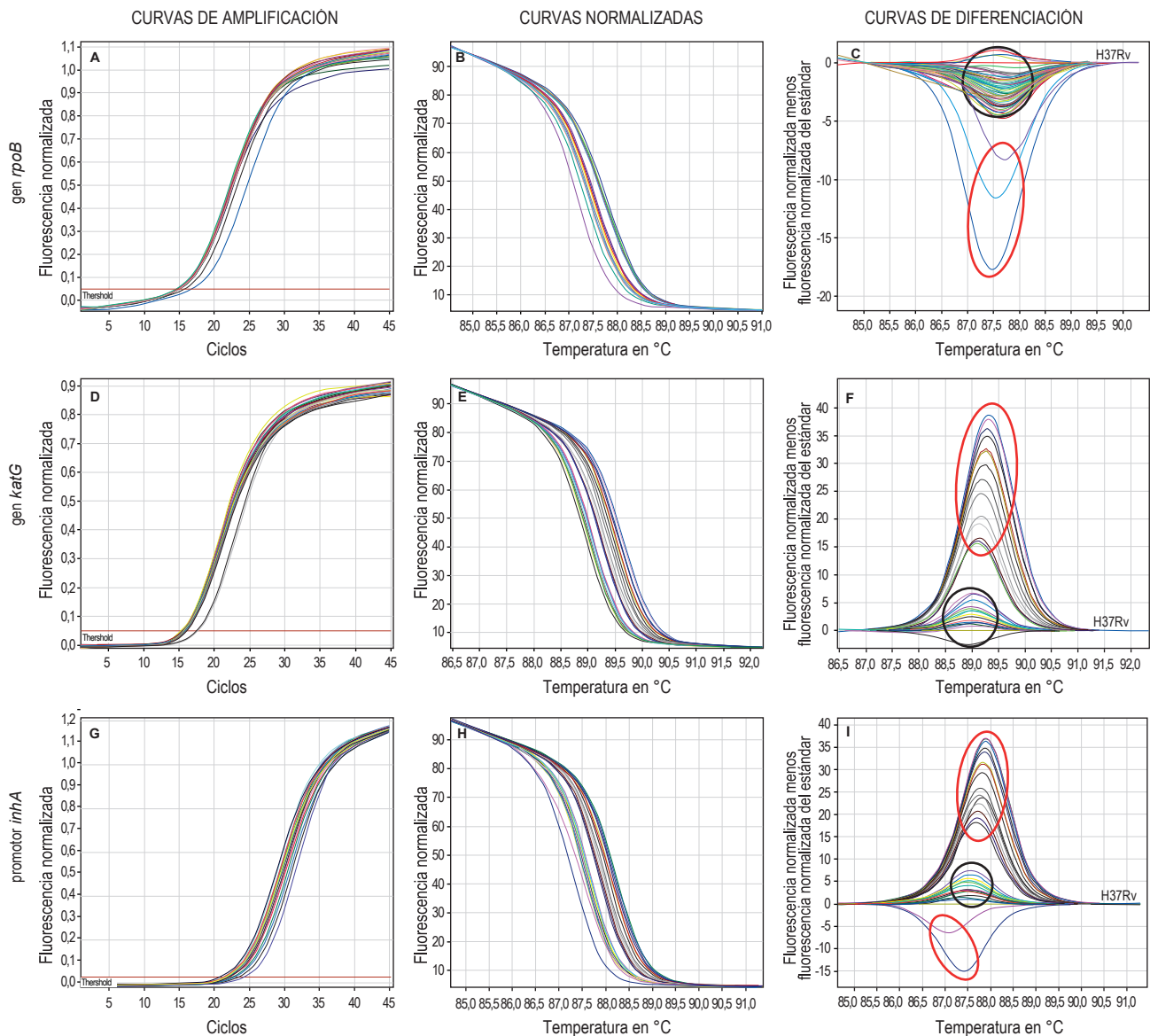
La cepa H37Rv sirvió como muestra de referencia sensible a las drogas rifampicina e isoniacida

Bk 2+: micobacterias presentes en número de 1-10 por campo en 50 campos observados

A, D y G: curvas de amplificación en esputos Bk 2+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

B, E y H: curvas normalizadas en esputos Bk 2+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

C, F e I: curvas de diferenciación en esputos Bk 2+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*



Anexo 4. Perfil del análisis de curvas de melting para detección de tuberculosis multidrogorresistente en esputos BK 3+ en genes *rpoB* (rifampicina), *katG* y promotor *inhA* (isoniacida)

Las muestras con perfil de resistencia se agrupan en círculo rojo mientras que los perfiles sensibles se agrupan en círculo negro

La cepa H37Rv sirvió como muestra de referencia sensible a las drogas rifampicina e isoniacida

Bk 3+: micobacterias presentes en número > 10 por campo en 20 campos observados

A, D y G: curvas de amplificación en esputos Bk 3+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

B, E y H: curvas normalizadas en esputos Bk 3+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*

C, F e I: curvas de diferenciación en esputos Bk 3+ en relación a genes *rpoB*, *katG* y región promotora *inhA*