

Utilidad del método de la nitrato reductasa para la detección de resistencia a drogas antituberculosas de segunda línea

Usefulness of the nitrate reductase method to detect resistance to second-line anti-tuberculosis drugs

Dr.C. Dihadenys Lemus Molina^I; MSc. Yaimara Álvarez Echaide^{II}; Tec. Miguel Echemendía Font^I; Dr.C. Patrick Van der Stuyft^{III}; Dr.C. Juan Carlos Palomino^{IV}; Dr.C. Anandi Martín^{IV}

^I Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

^{II} Hospital Pediátrico Docente del Cerro. La Habana, Cuba.

^{III} Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

^{IV} Faculty of Sciences. Ghent University, Gent, Belgium.

RESUMEN

Introducción: el creciente hallazgo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes extremadamente resistentes ratifica la importancia de ofrecer, de forma rápida, los resultados de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a drogas de primera y segunda línea como única alternativa para evitar la transmisión.

Objetivo: comparar el método de la nitrato reductasa y el de las proporciones para la detección de susceptibilidad a drogas antituberculosas de segunda línea en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, recuperados de pacientes cubanos con tuberculosis multidrogorresistente.

Métodos: se investigó, mediante el método de las proporciones en Löwenstein-Jensen y el de la nitrato reductasa, la susceptibilidad a la ofloxacina, la kanamicina y a la capreomicina en 34 aislamientos de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes.

Resultados: en tres aislamientos se evidenció un comportamiento extremadamente resistente por ambos métodos. Mediante el método de la nitrato reductasa los resultados estuvieron disponibles entre 7 y 14 días. La sensibilidad fue de 100 %, 90,0 % y 77,8 % para la ofloxacina, la kanamicina y la capreomicina, respectivamente, mientras que la especificidad fue superior al 95,0 % y el valor de kappa fue superior a 0,85 para las tres drogas.

Conclusión: de acuerdo con los resultados alcanzados, consideramos que el método de la nitrato reductasa constituye una valiosa alternativa para la detección oportuna de tuberculosis extremadamente resistente en países con limitados recursos económicos.

Palabras clave: tuberculosis; método nitrato reductasa; drogas antituberculosas de segunda línea.

ABSTRACT

Introduction: The increase of multidrug resistant and extensively drug resistant tuberculosis underlines the urgent need to obtain early results of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility both to first and second line antituberculosis drugs in order to avoid dissemination of resistant isolates.

Objective: The aim of this research was to compare the performance of the nitrate reductase assay and the proportion method for to detect the susceptibility to second line antituberculosis drugs in multidrug resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*.

Methods: The susceptibility to ofloxacin, kamamycin and capreomycin of 34 *M. tuberculosis* multidrug resistant isolates was investigated using the proportion method in Löwenstein-Jensen and the nitrate reductase assay.

Results: Three isolates were identified as extensively drug resistant by both methods. The results of the nitrate reductase assay were obtained between 7-14 days achieving 100 %, 90.0 % and 77.8 % of sensitivity for ofloxacin, kamamycin and capreomycin, respectively while specificity was higher than 95.0 % and kappa value was higher to 0,85 for all drugs.

Conclusion: The nitrate reductase assay represents a useful tool for the rapid identification of extensively drug resistant tuberculosis in low resources setting.

Key words: tuberculosis; nitrate reductase assay; second line antituberculosis drugs.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la resistencia a las drogas utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis (TB) constituye un obstáculo en el control de esta enfermedad a nivel mundial. En el año 2012 se estimó la circulación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes [MDR, resistentes al menos a isoniácida (INH) y rifampicina (RMP)] en aproximadamente el 3,6 % de los casos nuevos y el 20,0 % de los pacientes con antecedente de tratamiento con drogas antituberculosas.

De igual forma se reportó el hallazgo de al menos una cepa de *M. tuberculosis* extremadamente resistente (XDR, cepas MDR con resistencia a una fluoroquinolona y una de las drogas inyectables de segunda línea) en 92 países.¹ Este panorama ratifica la importancia de ofrecer de forma rápida los resultados de susceptibilidad de *M. tuberculosis* como única alternativa para evitar la transmisión de cepas resistentes.

La vigilancia de la resistencia a las drogas antituberculosas en Cuba, por más de 30 años, evidencia una baja prevalencia de TB MDR.^{2,3} Entre los años 2010 y 2011 se reportó MDR en el 1,03 % de los casos nuevos y el 10,38 % de los casos previamente tratados.³ Sin embargo, persiste la preocupación de ofrecer resultados oportunos al sistema nacional de salud sobre la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a las drogas de segunda línea utilizadas en el tratamiento de la TB MDR. Esta actividad es una de las principales misiones del Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRTL) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

Los métodos de detección de la susceptibilidad a las drogas antituberculosas usados de forma tradicional son laboriosos y demorados, debido al crecimiento lento de *M. tuberculosis*. Los avances tecnológicos recientes introducen métodos rápidos y seguros, entre los que se destacan las técnicas moleculares, pero estas no se utilizan de rutina en los laboratorios de países con escasos recursos económicos, debido a su elevado costo.⁴

Tomando en consideración las ventajas que ofrece el Método de la Nitrato Reductasa (MNR) para la detección de resistencia a INH y RMP así como la posibilidad de ser utilizado para investigar la susceptibilidad a drogas antituberculosas de segunda línea, se llevó a cabo la presente investigación, con el objetivo de evaluar la utilidad de este método para la detección oportuna de TB XDR.

MÉTODOS

Cepas: se investigaron 34 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* MDR que se encontraban conservados a -20°C, formando parte de la colección del LNRTL del IPK. Como controles se utilizaron cepas con patrones de susceptibilidad conocidos: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), sensible a todas las drogas de primera y segunda línea, *M. tuberculosis* 580-A-09 (resistente a ofloxacina (OFL) y *M. tuberculosis* 34-A-09 [(resistente a kanamicina (KAN) y capreomicina (CAP)]. Estas últimas se recibieron en el LNRTL en el 2009 como parte del estudio de proeficiencia de las pruebas de susceptibilidad, y procedían del Laboratorio Supranacional de Tuberculosis perteneciente al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos Malbrán", Buenos Aires, Argentina.

Drogas antituberculosas: se preparó una solución madre (1000 µg/mL) para cada una de las drogas. La CAP y la KAN se diluyeron en agua destilada estéril y para la OFL se empleó NaOH 0,1N. Todas las drogas pertenecían a la casa comercial *Sigma-Aldrich* (Steinhein, Alemania). Estas soluciones se incorporaron por separado al medio de cultivo Löwenstein-Jensen (LJ) para alcanzar las siguientes concentraciones críticas: 40 µg/mL, 30 µg/mL y 2 µg/mL para KAN, CAP y OFL, respectivamente.

Método de las Proporciones (MP): se empleó el medio LJ y se siguió la metodología descrita por *Canetti y cols.* en 1969.⁵ La lectura definitiva se realizó pasados los 42 días de incubación y la proporción crítica que se empleó para el análisis de los resultados fue del 1 %.

Método de la nitrato reductasa: para la realización del MNR, se empleó el medio LJ con nitrato de potasio a una concentración de 1000 µg/mL siguiendo la metodología descrita por *Ángeby y cols.* en el año 2002.⁶ La lectura se realizó a los 7, 10 y 14 días de incubación a través de la adición de una mezcla reveladora formada por 1 volumen de ácido clorhídrico al 50 % + 2 volúmenes de sulfanilamida al 0,2 % + 2 volúmenes de N-1-naftil etilendiamina dihidroclorhidrato al 0,1 %. Las cepas se consideraron sensibles cuando no se desarrolló color en el tubo con la droga o si este fue más débil que en el tubo control de crecimiento, de lo contrario se consideraron resistentes.

Análisis de los resultados: se empleó el programa EPIDAT versión 3.1. Se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad, concordancia mediante el índice de Kappa. Los resultados brindados por el MP se utilizaron como referencia.

RESULTADOS

En el presente estudio se investigó la susceptibilidad a la OFL, la KAN y la CAP mediante el MP y el MNR en 34 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* MDR.

El MP evidenció resistencia a la OFL en tres aislamientos, mientras que 10 aislamientos se mostraron resistentes a la KAN y 9, a la CAP. En tres cepas se detectó un comportamiento XDR ([tabla 1](#)).

Tabla 1. Patrones de susceptibilidad, de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes, a drogas de segunda línea obtenidos mediante el Método de las Proporciones (Cuba, 1998-2011)

No. aislamientos	Drogas antituberculosas		
	ofloxacina	kanamicina	capreomicina
24	Sensible	Sensible	Sensible
7	Sensible	Resistente	Resistente
2*	Resistente	Resistente	Resistente
1*	Resistente	Resistente	Sensible

* Aislamientos extremadamente resistentes

La aplicación del MNR permitió disponer del resultado de susceptibilidad a los siete días de incubación en cinco aislamientos (14,7 %). Para el 26,5 % y 58,8 % de los aislamientos la lectura definitiva se realizó a los 10 y 14 días, respectivamente.

En la [tabla 2](#) se muestran los resultados del MNR y su correlación con el MP. El MNR identificó correctamente 30 de las 31 cepas sensibles a la OFL, así como la totalidad de las cepas resistentes a esta droga. En relación a la KAN, el MNR identificó erróneamente una cepa como sensible y otra como resistente; mientras que para la CAP, identificó correctamente siete de los nueve aislamientos que el MP identificó como resistentes, así como la totalidad de los aislamientos sensibles.

Tabla 2. Distribución de los resultados de la susceptibilidad en aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes a la ofloxacina, la kanamicina y la capreomicina obtenidos mediante el método de la nitrato reductasa y su correlación con el método de las proporciones

MNR	Método de las Proporciones					
	ofloxacina		kanamicina		capreomicina	
	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible
Resistente	3	1	9	1	7	0
Sensible	0	30	1	23	2	25
Total	3	31	10	24	9	25

MNR: Método de la Nitrato Reductasa

El MNR mostró una sensibilidad de 100 %, 90,0 % y 77,8 % para la OFL, la KAN y la CAP, respectivamente, mientras que la especificidad resultó superior al 95,8 % en las tres drogas. La concordancia del MNR con el MP calculada mediante el estadígrafo Kappa fue de 0,90 para la OFL, 0,85 para la KAN y de 0,86 para la CAP.

DISCUSIÓN

Actualmente existe un arsenal de herramientas para investigar la susceptibilidad a las drogas antituberculosas; dentro de estas se destacan los métodos basados en el empleo de medio líquido y las técnicas moleculares que reducen considerablemente el tiempo de obtención de los resultados en comparación con los métodos basados en el cultivo en medio sólido. Sin embargo, el MP desarrollado en la década del 60, sigue siendo ampliamente utilizado, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Este método requiere entre 4 y 6 semanas para la obtención de los resultados debido al crecimiento lento de *M. tuberculosis*, hecho que constituye una limitante en la actualidad cuando la TB MDR y la TB XDR amenazan las acciones que se llevan cabo, a nivel mundial, para lograr el control de la TB.⁵

En Cuba, la vigilancia sostenida de la resistencia a las drogas antituberculosas indica una baja prevalencia de resistencia.³ Asimismo, el LNRTLML lleva a cabo líneas de investigación encaminadas al desarrollo y evaluación de métodos alternativos para la detección rápida de resistencia en *M. tuberculosis*,⁷⁻⁹ que de manera oportuna permitan indicar la terapéutica adecuada y evitar, así, la transmisión de la enfermedad. Dentro de estos se destaca el MNR, aprobado por la Organización Mundial de la Salud en 2011 para detectar resistencia a la INH y a la RMP.¹⁰

Tomando en consideración la experiencia del LNRTLML en el empleo del MNR^{7,9,11} y la necesidad de ofrecer a las autoridades de salud un resultado rápido de la resistencia a las drogas antituberculosas de segunda línea en los aislamientos de *M. tuberculosis* MDR, se llevó a cabo la presente investigación. La misma permitió identificar tres aislamientos con comportamiento XDR al aplicar tanto el MP como el MNR. Este hallazgo constituyó el primer reporte de cepas de *M. tuberculosis* XDR en Cuba y la base para la incorporación de Cuba a la lista de los 84 países que en el 2011 habían reportado la detección de al menos un caso de TB XDR.¹²

A pesar de las bondades que ofrece el MNR en la detección de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a las drogas de segunda línea, cabe señalar que existe un número limitado de publicaciones, entre las que se destacan los realizados por *Martin y cols.*,¹³ en 2005, que reportan un 100 % de concordancia entre el MNR y el tubo indicador de crecimiento de micobacterias para la OFL. En 2009, *Rosales y cols.*,¹⁴ describen una excelente especificidad para el MNR al compararlo con el MP en Löwenstein-Jensen, así como una sensibilidad de 86,0 % y 56,0 % al investigar la resistencia a la OFL y la KAN, respectivamente. La posibilidad de emplear el MNR en medio de cultivo líquido se exploró por *Devasia y cols.*,¹⁵ quienes reportaron el resultado de la mayoría de los aislamientos a los nueve días de incubación, una excelente sensibilidad y especificidad con el MP en agar, así como la presencia de resistencia cruzada entre OFL, ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.

En el presente estudio, al comparar los resultados alcanzados por el MNR con el MP, se encontró una elevada especificidad para las tres drogas. Con respecto a la sensibilidad, esta fue baja para la CAP (77,8 %); siendo sin dudas una limitante el pequeño número de cepas investigadas. En la literatura consultada no se reporta el empleo del MNR para detectar la susceptibilidad a esta droga.

La posibilidad de utilizar el MNR directamente en muestras de esputo con baciloscopia positiva para el diagnóstico simultáneo de TB MDR y TB XDR, constituye otra de las oportunidades que ofrece este método. De esta forma, *Imperiale y cols.*¹⁶ reportan un 100 % de concordancia al comparar los resultados de susceptibilidad a INH, RMP, OFL y KAN obtenidos mediante el MNR directo con los alcanzados por el sistema BACTEC MGIT 960, requiriendo un tiempo promedio de 16,9 día para la obtención de los resultados con el MNR. Al mismo tiempo en el 2014, *Martin y cols.*¹⁷ en un estudio multicéntrico, realizado en 6 laboratorios de países diferentes, alcanzan una concordancia con el método de referencia en un rango de 93,7 % - 100 % para la OFL y del 100 % para la KAN. Estos resultados ponen de manifiesto las potencialidades del MNR para la detección directa de resistencia en muestras de pacientes con sospecha de TB XDR.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo concluimos que el MNR constituye una herramienta potencialmente valiosa para el diagnóstico rápido de resistencia a las drogas antituberculosas de segunda línea. Este método constituye una alternativa para el diagnóstico oportuno de TB XDR en países con escasos recursos económicos, ya que solo requiere el equipamiento microbiológico mínimo para su ejecución.

Conflicto de intereses: No existen.

Agradecimientos: El presente estudio se realizó con el apoyo financiero del Proyecto de colaboración con el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica: FA3 DGDC-ITM 2008-2013. Institutional Collaboration "92050" "Strengthening Public Health Care Research in Cuba".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2013. Geneva: WHO; 2013.
2. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Díaz R, Mederos L, Martinez MR, *et al.* Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000-2009. Rev Panamericana Salud Pública 2011;30:615-8.
3. Lemus D, Echemendía M, Díaz R, Llop A, Llanes MJ. Vigilancia de la resistencia a los medicamentos antituberculosos en Cuba, 2010-2011. Biomédica 2014;34 (Suppl 1):108-13.
4. Palomino JC. Current developments and future perspectives for TB diagnostics. Future Microbiol 2012;7:59-71.
5. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ 1969;41:21-43.
6. Angeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol 2002;40:553-5.
7. Montoro E, Lemus D, Echemendía M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2005;55:500-5.
8. Martín A, Montoro E, Lemus D, Simboli N, Morcillo N, Velasco M, *et al.* Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods 2005;63:145-50.
9. Lemus D, Montoro E, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Nitrate Reductase Assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low resources laboratories. J Med Microbiol 2006;55:861-3.
10. World Health Organization. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2011.9. Geneva: WHO; 2011.
11. Mirabal N, Yzquierdo S, Lemus D, Madruga M, Milian Y, Echemendía M, *et al.* Evaluation of Colorimetric Methods Using Nicotinamide for Rapid Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2010;48:2729-33.
12. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2012. Geneva: WHO; 2012.

13. Martin A, Palomino JC, Portaels F. Rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Clin Microbiol* 2005;43:1612-6.
14. Rosales S, Pineda L, Andino N, Almendarez N, Membreño H, Hoffner SE. Evaluation of the nitrate reductase assay for rapid detection of extensively drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1542-9.
15. Devasia RA, Blackman A, May C, Eden S, Smith T, Hooper N, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: an assessment of MGIT 960, MODS and nitrate reductase assay and fluoroquinolone cross-resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1173-8.
16. Imperiale BR, Morcillo NS, Palomino JC, Vandamme P, Martin A. Predictive value of direct nitrate reductase assay and its clinical performance in the detection of multi and extensively drug resistant tuberculosis. *J Med Microbiol* 2014;63:522-7.
17. Martin A, Imperiale B, Ravolonandriana P, Coban AY, Akgunes A, Ikram A, et al. Prospective multicentre evaluation of the direct nitrate reductase assay for the rapid detection of extensively drug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:441-4.

Recibido: Febrero 23, 2014.

Aprobado: Julio 28, 2014.

Lic. Dihadenys Lemus. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba. Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½. PO Box 601, La Lisa, La Habana, Cuba. Teléfono: 53 7 2553527. Fax: 53 7 2046051. Correo electrónico: dlemus@ipk.sld.cu; dihadenys@infomed.sld.cu