

Comparación de métodos moleculares útiles en la detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* Multirresistente (MTB-MRD)

Martha Inírida Guerrero Bact. MSc.*
Philip Noel Suffys PhD.**
Bart Vanderborcht MSc.**
Martha María De Oliveira MSc.**
Ingrid Beatriz Cohen Bact.*
Clara Inés León MSc.*

Resumen

Objetivo: evaluar y comparar dos métodos moleculares rápidos utilizables en la detección de pacientes con MTB-MRD. **Material y Métodos:** realizamos un estudio experimental para comparar la eficiencia de los métodos: "rifoligotyping" e Inno-LIPA, utilizando como "gold standard" el método de las proporciones múltiples. La población de estudio fueron 41 aislamientos de pacientes con tuberculosis MRD y 43 de pacientes con tuberculosis farmacosensible. Se amplificó por PCR un fragmento del gen *rpoB* utilizando un par de iniciadores diferentes para cada método y posteriormente se detectó mediante hibridación reversa en membranas y tiras, la presencia de mutaciones que confieren resistencia a rifampicina. Se calculó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo de MRD (VPMRD) y el valor predictivo de fármaco sensibilidad (VPFS) para cada una de las pruebas y se compararon en términos de eficiencia. **Resultados:** las dos metodologías fueron igualmente eficientes. Los

VPMRD fueron del 100% y los VPFS fueron 81.1% y 84.3%. La sensibilidad fue de 75.6% y 80.5% respectivamente, y la especificidad fue de 100% para ambos métodos. **Conclusiones:** se pueden considerar los dos como posibles métodos de elección para determinar rápidamente la presencia de tuberculosis MRD en poblaciones de riesgo, facilitando la prevención de la diseminación de estas cepas y agilizando la prescripción de esquemas de quimioterapias apropiados. La distribución de las mutaciones demostró que se hace necesario diseñar otras membranas o tiras que contengan las mutaciones más comunes, específicamente en las cepas colombianas, porque cerca de 1/3 de los aislamientos colombianos estudiados presentaron mutaciones que no fueron identificadas por ninguno de los dos métodos. **Palabras clave:** tuberculosis, multirresistencia, susceptibilidad, *rpoB*, rifampicina. *Infectio* 2001; 5(4): 203-212

* Laboratorio de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

Correspondencia: Marta Inírida Guerrero, Instituto Nacional de Salud Laboratorio de Micobacterias. Avenida el Dorado Carrera 50. Bogotá, Colombia.
e-mail: mguerrerog@hemagogus.ins.gov.co

Introducción

En la última década se ha observado, tanto en Colombia como en el resto del mundo, que el número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* farmacorresistentes ha incrementado (1,2). Es así como en Colombia tenemos datos de farmacorresistencia primaria tendientes al aumento: 11.4% en 1987, 14.1% en 1992 y 15.6% en 1999 (3). Igualmente la multirresistencia inicial entre los portadores del VIH es mucho más alta que entre los VIH negativos (9,8% Vs 5.0%) de Bogotá (3).

Los pacientes infectados con dichas cepas son difíciles de curar y representan un sobre costo económico y social para la comunidad y los programas de control (4), por lo tanto, desde el punto de vista de salud pública, se hace necesario detectarlos en estado temprano antes de que diseminen estas cepas.

La detección de la tuberculosis multirresistente (TB-MRD) por métodos tradicionales toma alrededor de 12 semanas, lo cual determina que se hayan tratado de introducir metodologías moleculares rápidas y precisas que sean aplicables a grupos de alto riesgo de infectarse con estas cepas (5).

Existe una idea generalizada en el mundo desarrollado, respecto a que las pruebas de susceptibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos podrían no ser necesarias en países como Colombia, donde el diagnóstico de la tuberculosis se basa en el examen microscópico de las muestras de esputo sin aislamiento del bacilo por cultivo, y de que aunque fuesen funcionalmente importantes, resultan muy costosas para ser practicables (4). Sin embargo, en nuestro criterio, la rápida expansión de la farmacorresistencia es una voz de alerta que nos llama a una acción inmediata para prevenir la real amenaza de una epidemia de tuberculosis polirresistente incurable. Un paso en tal dirección, entre muchos de los que se hacen necesarios, es la implementación de métodos para la rápida detección de farmacorresistencia en los nuevos casos de tuberculosis.

La rifampicina (RMP) es el bactericida más importante en los esquemas antituberculosos, frente a la cual se presentan tasas de mutación espontánea muy bajas (6). Se ha demostrado que la resistencia a RMP rara vez se encuentra sin asociarse con resistencia a otros fármacos, especialmente a la isoniazida, y está actualmente documentada su asociación causal con la pobre eficacia de la quimioterapia (7), por lo cual hoy se acepta que la resistencia a este fármaco puede predecir tanto TB-MRD como fracaso del tratamiento (8).

La resistencia a RMP es causada principalmente por mutaciones en un solo gen y por lo tanto fácil de detectar. Casi en su totalidad (87-97%), las cepas resistentes a RMP tienen mutaciones en una pequeña región del gen *rpoB*, el cual codifica para la RNA polimerasa. La mayoría de estas mutaciones se encuentran concentradas en una región de 27 codones o sea 81 pares de bases, causando mutaciones puntuales de sustitución de un solo aminoácido (8,9).

Las mutaciones causantes de la farmacorresistencia pueden ser detectadas, directa o indirectamente, por diferentes técnicas moleculares tales como: secuenciación, polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), heterodúplex-PCR, y por las técnicas probadas en este estudio: *Line Probe Assay* (*Inno-LIPA*) y "*rifoligotyping*" (PLH) (10).

Los dos métodos utilizados en este estudio se basan en la hibridización reversa del producto de amplificación biotinilado, a partir de la región determinante de resistencia a RMP (RDRR) del gen *rpoB*, a una serie de oligonucleótidos con secuencias tanto silvestres como mutantes, fijados sobre una membrana o tira. Si la cepa es silvestre dicho producto solo hibridizará con los oligonucleótidos silvestres, mientras que si contiene mutaciones dejará de hibridizar con algún oligo silvestre y lo hará con su complementario en el respectivo oligo mutante (9). En *Inno-LIPA*, se utilizan tiras de nitrocelulosa que contienen cinco oligonucleótidos complementarios a cadenas silvestres y cuatro complementarios a

regiones con mutación puntual; los híbridos son detectados colorimétricamente (11). El método "*rifoligotyping*" emplea una membrana con seis oligonucleótidos silvestres y seis complementarios a diferentes mutaciones puntuales, siendo la detección llevada a cabo por quimioluminiscencia (10).

Nuestro estudio se realizó con el objetivo de evaluar y comparar dos métodos moleculares rápidos para la detección de *M. tuberculosis* multirresistente y determinar su posible utilidad en nuestro medio.

Materiales y Métodos

Cepas

La población de estudio consistió en 41 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes colombianos con TB-MRD y 43 de pacientes con tuberculosis farmacosensible (RMP, isoniazida, estreptomycin, etambutol y tioacetazona); para un total de 84 cepas colombianas.

Pruebas de susceptibilidad

Las cepas fueron cultivadas en medio de Lowenstein- Jensen y se les determinó la susceptibilidad a RMP y demás fármacos por el método de las proporciones múltiples de Canetti y col (12) en el Laboratorio de Micobacterias-Investigación, del Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia.

Extracción del DNA

Se realizó utilizando el método estándar descrito por el grupo de J. van Embden (10), usando lizozyma, CTAB, extracción con cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con isopropanol. El DNA así obtenido fue dividido en alícuotas y conservado a -20°C hasta la ejecución de las dos técnicas moleculares estudiadas.

Inno-LIPA

Es una metodología que permite la detección de resistencia a RMP y la comprobación de la identidad como *Mycobacterium tuberculosis*, gracias a la presencia de una sonda específica para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, la cual inicia 82 pb río arriba de la región determinante de resistencia a RMP (RDRR) y además las sondas de tipo silvestre (S1 al S5), cubren la región relevante del gen (figura 1). Cuando una mutación está presente será revelada por la falta de hibridización con una o más de tales sondas, bajo las condiciones aplicadas. Dicha mutación particular puede ser evidenciada por la señal de hibridización con alguna de las cuatro sondas que tienen un cambio puntual en la secuencia: sondas R1 al R4 (figura 1), detectando amplicones que presenten: 516 A→V; 526 H→T; 526 H→A; 531 S→L (13). Inicialmente se realizó una amplificación PCR anidada con los iniciadores externos **OP1** (5'-GAGAATTCGGTCGGCGAGCTGATCC-3') y **OP2** (5'-GCAAGCTTGACCCGCGCGTACACC-3'), mediante los cuales se obtiene un fragmento de 395 pb, además se usaron los iniciadores internos **IP1** (5'-GGTCGGCATGTTCGGGATGG-3') e **IP2** (5'-GCACGTCGC GGACCTCCAGC-3') los cuales estaban biotinilados en 5', con los que se obtiene un fragmento de 256 pb biotinilado también en 5' (11). Posteriormente, una alícuota del material amplificado (5-10 ml) fue desnaturalizada e incubada con una tira *Inno-LIPA* y la mezcla de hibridización. Los híbridos formados fueron revelados por un procedimiento inmunoenzimático, que involucró el uso del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (11).

"rifoligotyping" (10)

Se utilizó una membrana (Biodyne-C) que contiene los 12 oligonucleótidos que han sido unidos covalentemente mediante el sistema "miniblotter", los cuales se sintetizaron complementarios a la secuencia nucleotídica. Los 6 oligonucleótidos silvestres se sobrelapan ligeramente, cubriendo la región RDRR y los seis

restantes contienen, cada uno, un oligonucleótido complementario a una secuencia con la respectiva mutación (10) (figura 1). La RDRR del gen *rhoB*, entre los nucleótidos 1497 a 1653 (157pb) es amplificada con un par de iniciadores **TR10A** (5'-CGCCGCGATCAAGGAGT-3') y **TR11A** (5'-ACGTCGCGGACCTCCA-3'), éste último marcado con biotina en 5'. Posteriormente se realizó hibridización de 10 ml del producto de PCR diluidos en 150ml del buffer SSPE 2X/0.1%SDS. La membrana, con los oligonucleótidos adheridos se hibridizó con el producto de PCR diluido. La detección de señales de hibridización se realizó con el conjugado estreptavidina-peroxidasa. Finalmente la membrana se incubó con reactivo de detección ECL-Amersham (peróxido de hidrógeno y luminol) y la señal quimioluminiscente fue detectada en una película de rayos X (Hyperfilm Amersham) (10).(figura 2).

Se calculó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo de MRD (VPMRD) y el valor predictivo de farmacosenibilidad (VPFS), para cada una de las metodologías evaluadas y se compararon en términos de eficiencia, tomando como método de referencia la técnica de las proporciones múltiples y usando para el análisis tablas de contingencia.

La eficiencia se determinó como:

Resultados correctos / # total de resultados x 100 (14)

Resultados

El presente estudio es una evaluación de dos métodos moleculares en el que se utilizó como prueba de oro o "gold standard" la técnica fenotípica clásica de las proporciones múltiples de Canetti y col (11) la cual, además de proporcionar el resultado de sensibilidad o resistencia, da un resultado en porcentaje de resistencia a RMP que permite la comparación con los demás datos arrojados por los dos métodos evaluados. Por lo tanto, la presente evaluación se pudo realizar discriminadamente para las diferentes clases de cepas: farmacosenibles, mono y multirresistentes. (Tabla 1).

Todas las cepas amplificadas produjeron resultados interpretables, tanto por *Inno-LIPA*, como por "*rifoligotyping*", y en ambas metodologías, las cepas silvestres produjeron señal de hibridización exclusivamente frente a los oligonucleótidos silvestres. (Tabla 1).

En *Inno-LIPA*, todas las cepas hibridizaron con la sonda específica del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, confirmando así la identificación de especie realizada.

La técnica *Inno-LIPA* clasificó como MRD a 33 de las 41 cepas MRD probadas, detectando la mutación específica que dicha cepa tenía, en 21 de las mismas. (Tabla 2 y Tabla 3)

La metodología "*rifoligotyping*" determinó resistencia para 31 de las 41 cepas MRD probadas, siendo capaz de especificar la mutación en 23 de ellas. (Tabla 2 y Tabla 3). En las dos metodologías se encontraron casos que pudieron clasificarse como resistentes puesto que no hibridizaron con alguno de los oligonucleótidos silvestres y tampoco lo hicieron con ninguno de los oligonucleótidos mutantes.(Tabla 1 y Tabla 3)

La metodología "*rifoligotyping*" fue capaz de detectar 16.2% de cepas con presencia de más de una mutación. (Tabla 3)

No se obtuvo amplificación en 10 de las muestras, cuando se llevó a cabo la PCR para "*rifoligotyping*"; lo cual ocurrió también en dos de las muestras, en el caso del método *Inno-LIPA*.

Los valores de sensibilidad, especificidad, VPMRD, VPFS y eficiencia de las pruebas se determinaron para cada una de las metodologías evaluadas, así como sus intervalos de confianza del 95%, y aparecen en la Tabla 2 separadamente.

Discusión

La resistencia a RMP en *Mycobacterium tuberculosis* está a menudo asociada con resistencia a isoniazida y a otros fármacos antituberculosos (6) (Tabla 1), lo cual ha sugerido que

FIGURA 1

Esquemas de los oligonucleótidos empleados en los dos métodos.
Verde=oligo silvestre,
Rosado=oligo mutante

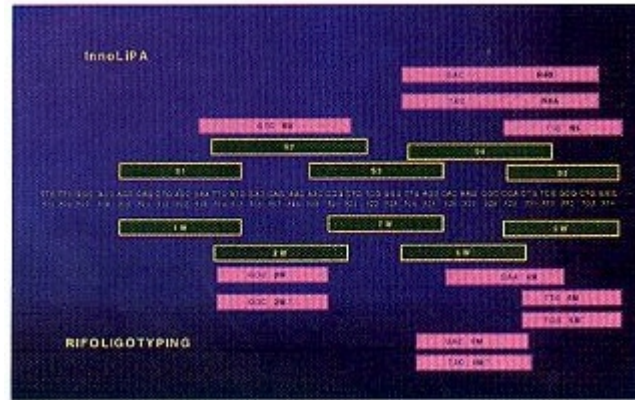


FIGURA 2

Resultados de Autorradiografía del "rifoligotyping".
Señal blanca = hibridación con oligo silvestre o mutante.

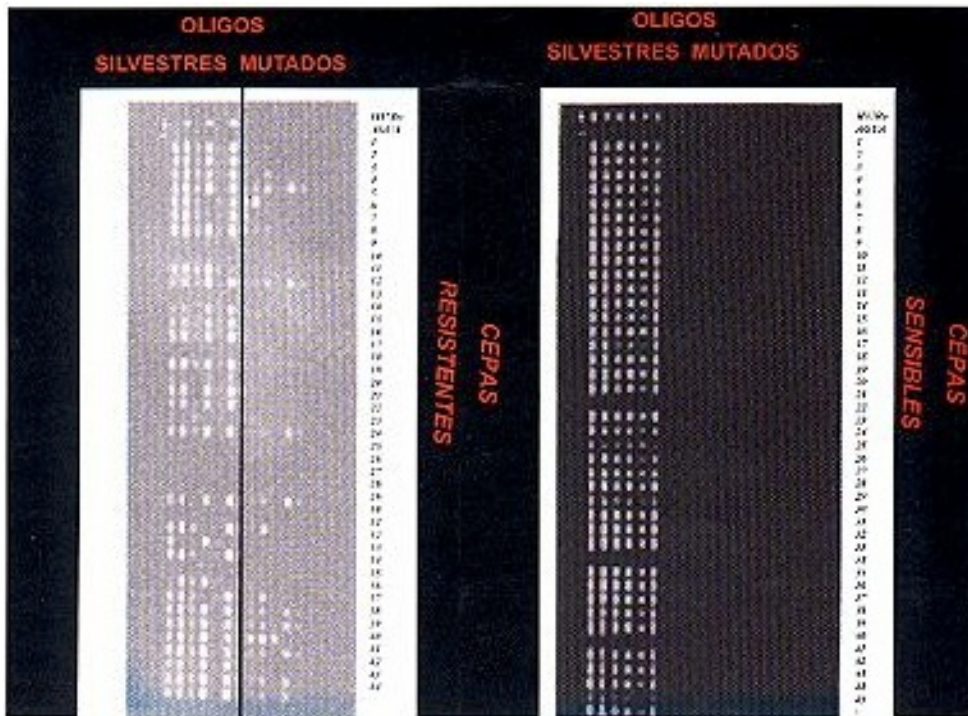


TABLA 1

Fenotipo de las cepas colombianas evaluadas por métodos moleculares

N°	Cepa	Tipo	Fenotipo					Rifol	LiP A
			%R	S	H	Tb	E		
1	H37Rv							S	S
2	AGUA							0	0
3	203 RFLP	MDR	50,0	R	R	R	R	R	R
4	206 RFLP	MDR	2,50	S	S	S	S	R	R
5	89 VIH	MDR	52,6	R	R	R	R	R	R
6	204 RFLP	MDR	100,0	R	R	S	R	R	R
7	208 RFLP	MDR	100,0	S	R	R	R	R	R
8	207 RFLP	MDR	100,0	R	R	R	R	R	R
9	116 RFLP	MDR	100,0	R	R	R	S	R	R
10	198 RFLP	MDR	48,0	S	R	R	R	0	R
11	110 RFLP	MDR	20,0	S	R	S	R	0	S
12	111 RFLP	MDR	2,40	R	R	S	S	R	R
13	211 RFLP	MDR	40,0	S	R	S	S	R	R
14	202 RFLP	MDR	100,0	R	R	S	S	0	R
15	84 RFLP	MDR	100,0	S	R	S	R	R	S
16	209 RFLP	MDR	100,0	R	R	S	S	R	0
17	129 RFLP	MDR	85,0	R	R	S	S	R	S
18	103 RFLP	MDR	100,0	R	R	R	R	0	R
19	199 RFLP	MDR	40,0	R	R	S	S	R	R
20	201 RFLP	MDR	24,0	R	R	S	R	R	R
21	74 RFLP	MDR	91,7	R	R	S	R	R	R
22	67 VIH	MDR	67,0	S	R	S	R	R	R
23	86 RFLP	MDR	100,0	R	R	S	S	R	R
24	65 VIH	MDR	100,0	R	R	S	S	R	R
25	3 DEL 98	S	0,0	S	S	S	S	0	0
26	127 RFLP	MDR	81,5	R	R	S	R	0	R
27	78 VIH	MONOR	71,0	S	S	S	S	0	R
28	65 RFLP	MDR	92,0	R	R	R	S	0	R
29	10 VIH	MDR	100,0	S	R	R	R	R	S
30	20 VIH	MDR	45,0	R	R	R	S	0	S
31	106 RFLP	MDR	76,2	R	R	R	R	R	R
32	85 VIH	MONOR	100,0	S	S	S	S	R	S
33	205 RFLP	MDR	20,0	R	R	S	S	R	R
34	210 RFLP	MDR	74,0	R	R	R	S	0	R
35	64 RFLP	MDR	2,3	R	R	S	S	R	R
36	88 RFLP	MDR	54,0	R	R	S	S	R	R
37	214 RFLP	MDR	10,0	S	R	R	S	R	R
38	217 RFLP	MDR	80,0	S	R	S	S	R	R
39	79 RFLP	MDR	100,0	R	R	S	S	R	R
40	121 RFLP	MDR	38,5	S	R	S	R	R	R
41	59 VIH	MONOR	100,0	S	S	S	S	R	R
42	3 RFLP	MDR	14,0	R	R	S	R	R	S
43	213 RFLP	MDR	60,0	R	R	R	S	R	R

S = Estreptomicina

S = sensible

MONOR = mono resistente

H = Isoniazida

R = resistente

Rifol = rifoligotyping

Tb = Tioacetazon

0 = sin dato

LIPA = InnoLIPA

E = Etambutol

MDR = multirresistente

la determinación de la resistencia a RMP juega un papel clave en la vigilancia de la TB-MRD; a pesar de lo cual hasta la fecha, en muchos países, los laboratorios solamente han desempeñado papeles marginales en el programa de control. Para el futuro y a raíz del incremento de la TB-MRD en el mundo, se hace necesario mantener redes de laboratorios eficientes capaces de detectar precózmemente la farmacorresistencia (3,4).

En países donde la salud pública es una prioridad se han tenido en cuenta desarrollos como los que mostramos en este estudio (4), habiendo podido identificar precózmemente los casos de TB-MRD, lo cual les significó ahorro en términos económicos tan significativos como el que con los recursos invertidos en examinar a los 20000 casos nuevos anuales, captando cerca de 200 MRD, se hubiesen podido manejar en la forma empírica, clásica de rutina, tan solo a 10 casos MRD, impidiendo además que durante varios años continuaran esparciendo bacilos multirresistentes en la comunidad (4).

Se ha reportado un elevado porcentaje de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a RMP (90-96%) que explican su resistencia por mutaciones puntuales, pero también por inserciones o deleciones dentro de la región determinante de resistencia a RMP (RDRR) ubicada entre los codones 511 a 533 del gen *rpoB*, el cual codifica para la RNA polimerasa, molécula blanco de dicho fármaco (8,15). Figura 1.

Las dos técnicas evaluadas en el presente estudio han sido diseñadas para detectar las mutaciones puntuales frecuentemente reportadas en la literatura: *Inno-LIPA*, a través de sus cuatro sondas R, puede detectar cambios nucleotídicos en las posiciones 516, 526 y 531 de la RDRR, mientras que "*rifoligotyping*" puede adicionalmente hacerlo en las posiciones 514 y 529.

Tanto *Inno-LIPA* como "*rifoligotyping*" presentaron una especificidad del 100% que junto con un elevado VPMRD y una buena eficiencia, las

TABLA 2

A		PROPORCIONES MÚLTIPLES		
		MDR SI	MDR NO	TOTAL
Rifoligotyping	+	31	0	31
	-	10	43	53
	TOTAL	41	43	84

SENSIBILIDAD = 75.6% (IC95% 59.4-87.1)
ESPECIFICIDAD= 100% (IC95% 89.8-100.0)
VPMDR= 100% (IC95% 86.3-100.0)
VPS= 81.1% (IC95% 67.6-90.1)
EFICIENCIA = 88% (IC95% 79.2-94.1)

B		PROPORCIONES MÚLTIPLES		
		MDR SI	MDR NO	TOTAL
Inno-LIPA	+	33	0	33
	-	8	43	51
	TOTAL	41	43	84

SENSIBILIDAD = 80.5% (IC95% 64.6-90.6)
ESPECIFICIDAD= 100% (IC95% 89.8-100.0)
VPMDR= 100% (IC95% 87.0-100.0)
VPS= 84.3% (IC95% 70.9-92.5)
EFICIENCIA = 91% (IC95% 82.1-95.8)

Tablas de contingencia con los resultados de la evaluación de las cepas multirresistentes y sensibles por cada uno de los métodos moleculares: A=»rifoligotyping». B= InnoLIPA.

TABLA 3

Distribución de las mutaciones

	Rifoligotyping	InnoLiPA
Mutación no determinada	25.9%	36.4%
Mutación en codon 531	35.4%	42.4%
Mutación en codon 526	9.7%	18.2%
Mutación en codon 516	16.2%	3.0%
Mezcla de mutaciones	12.9%	—
CEPAS PCR NEGATIVA	10	2

convierte en metodologías capaces de detectar precozmente los pacientes con cepas MRD y por tanto ser pruebas confirmatorias de TB-MRD

La sensibilidad de las pruebas fue de 76% para "rifoligotyping" y de 80% para *Inno-LIPA*, con VPFS superiores al 80% para ambas técnicas. Lo anterior sumado a la baja prevalencia de la TB-MRD en la población general colombiana (1,5%) (1,2), no las hace útiles como pruebas de tamizaje en el estudio de MTB-MRD a fármacos, sino como se dijo anteriormente, confirmatorias para grupos de alto riesgo, previamente seleccionados.

Comparado con las proporciones múltiples, y en general con los métodos fenotípicos de detección de multiresistencia, los cuales requieren algo más de 12 semanas para arrojar un resultado, la rapidez en la detección de MRD es la principal ventaja de los dos métodos moleculares evaluados.

Un diagnóstico rápido de la presencia de una cepa MRD es importante, ya que las tasas de morbimortalidad son muy altas, sobre todo en pacientes seropositivos para VIH, lo cual hace necesario instaurar un esquema de quimioterapia temprano y agresivo, especialmente en ellos (16).

Según nuestros hallazgos y por todas las razones anteriormente anotadas, tanto *Inno-LIPA*, como "rifoligotyping" se constituirían en pruebas de elección para ser aplicadas a una población especial conformada por:

- a) Pacientes tuberculosos que al tercer mes de quimioterapia continúan con baciloscopia positiva. (no existen estadísticas en Colombia)
- b) Pacientes tuberculosos con VIH positivo, población que podría estar entre 1200 y 2400 personas/año (16).
- c) Pacientes tuberculosos, que sean contactos de pacientes con TB-MRD, que podrían

ser aproximadamente 200 a 800 personas/año (17).

Por lo tanto si en Colombia estudiáramos unos 2000 pacientes/año de esta población seleccionada con alto riesgo de ser MRD, se podría ahorrar el 90% de los recursos que se invierten en el manejo de los pacientes con TB-MRD, cuando se tratan empíricamente.

Por otra parte, un hallazgo llamativo fue el haber encontrado que cerca de 1/3 de los aislamientos colombianos estudiados presentaron mutaciones que no pudieron ser identificadas por ninguno de los dos métodos; 25.9% con "rifoligotyping" y 36.4% con *Inno-LIPA* (Tabla 3), entre los cuales el 16.2% de las cepas coincidieron en los dos métodos, esto sugiere la presencia en el país de una alta proporción de cepas que presentan mutaciones diferentes a las comúnmente reportadas en la literatura. Lo anterior refuerza la hipótesis de que ciertos alelos mutantes en *rpoB* están fuertemente influenciados por la localización geográfica donde el estudio se lleve a cabo (18,19) y justifica la necesidad de detectar e identificar en forma precisa las mutaciones presentes en las cepas circulantes de nuestro país. Por lo tanto, la perspectiva a corto plazo de este trabajo es la identificación de las mutaciones más frecuentes entre las cepas colombianas, para la fabricación de una membrana o tira reactiva que nos permita usarla en la rutina para detectar estas cepas con un grado mayor de eficiencia.

La principal limitación del estudio fue la falla en la amplificación que ocurrió en varias cepas, habiéndose descartado la presencia de inhibidores de Taq en las muestras, se requiere investigar la causa de tal falla.

Las pruebas de susceptibilidad fenotípica, basadas en cultivos *in vitro* siguen siendo la principal herramienta en la detección de farmacoresistencia, sin embargo, técnicas como las evaluadas en este estudio, abren nuevas posibilidades en el diagnóstico rápido, y por tanto, en la pronta instauración de la quimioterapia adecuada de control frente a la diseminación

de tales cepas, lo cual en términos de costo-beneficio representa una gran ventaja. Si tenemos en cuenta que tanto "rifoligotyping" como *Inno-LIPA* son técnicas que se inician con una amplificación por PCR, podremos comprender que ambas pueden por su alta sensibilidad, ser aplicadas directamente a muestras clínicas sin necesidad de esperar hasta que se logre realizar el aislamiento del agente etiológico, lo cual representa por lo menos 8 semanas menos en la emisión del resultado. **b**

Abstract

Introduction: resistance to rifampicin is an indicator of multiresistance(MDR) and thus a predictor of chemotherapy failure. A rapid detection of this condition is important in order to control the transmission of MDR-TB. **Objective:** to evaluate and compare two rapid molecular methods used for detection of patients with MDR-TB. **Methodology:** an experimental study was performed in which the efficiency of rifoligotyping and *Inno-LIPA* methods were compared, using the multiple proportions method as the "gold standard" method. The population for this study were 41 isolates from patients with MDR-TB and 43 drug-susceptible isolates. A *rpoB* gene fragment was amplified using a pair of different primers for each method and the existence of mutations conferring resistance to rifampicin was subsequently detected by reverse hybridization in membranes and strips. For each of tests performed the following parameters were calculated: sensibility, specificity, predictive values for MDR (VPMDR) and for susceptibility (VPDS), and the results obtained were compared in terms of efficiency. **Results:** both methods showed a similar efficiency. MDRPVs were 100% and DSPVs were 81.1% and 84.3% respectively, concluding that any of these might represent an adequate method for the rapid detection of MDR-TB among risk populations, preventing the dissemination of these strains by favoring an opportune and appropriate therapy. The distribution of mutations particularly of the colombian strains, showed the necessity for the

design of new membranes or strips including the mutations most commonly observed, since nearly one third of the isolates studied showed mutations which were not detected by any of the methods described. **Key words:** tuberculosis, multiresistance, susceptibility, *rpoB*, rifampicin.

Agradecimientos

El presente estudio se pudo desarrollar gracias al apoyo financiero del INS y de la Red Latinoamericana de Investigación en Tuberculosis (RELACTB), especialmente al doctor Dick van Soolingen del *Mycobacteria Department, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands*, quien amablemente nos suministró su membrana e iniciadores para la metodología "rifoligotyping".

Referencias

1. **Espinal M., Laszlo A., Simonsen L., et al.** Global Trends in Resistance To Antituberculosis Drugs. *N Engl J Med* 2001; 344(17): 1294-1303.
2. **WHO/UICTER.** Antituberculosis Drug Resistance in the World, The WHO/IUATLD Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. Report N° 2. Prevalence and Trends Geneva. 2000.
3. **León CI., Guerrero MI., Naranjo N, Giraldo de B E.** Emergency of *M tuberculosis* MDR onset in Colombia. A classical and molecular approach. *Spanish J of Chemoth.* 1997; 10(2) sup. :115.
4. **Heifets LB, Cangelosi GA.** Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(7): 564-581.
5. **Toman K** Tuberculosis Detección de casos y quimioterapia: preguntas y respuestas. Washington: OMS, 1980.
6. **Drobniewski F, Wilson S.** The rapid diagnosis of Isoniazida and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* A molecular story. *J. Med Microbiology.* 1998; 47: 189-196.
7. **Espinal M., Kim SG., Suarez P., Et al** Standard Short-Course Chemotherapy For Drug-Resistant Tuberculosis. *JAMA*, 2000; 283 (19): 2537-2545.

8. **Ramaswamy S, Musser J.** Molecular genetics basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tub Lung Dis. 1998; 79: 3-29
9. **Telenti A., Imboden P., Marchesi F.** Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993; 341: 647-650.
10. **Kremer K, Van Soolingen D, van Zetten M et al.** PCR + Reverse Line blot hybridization (PLH) to detect rifampin resistance. Laboratory manual. National Institute of Public Health and Environment. Bilthoven 1997.
11. **De Beenhouwer, Lhiang Z, Portaels F.** Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. Tub Lung Dis. 1995; 76: 425-430.
12. **Canetti G, Fox W, Khomenko A.** Advances in techniques of testing Mycobacterial drug sensitivity tests in tuberculosis control programs. Bull. Wld. Hlth. 1969; 41: 21-43.
13. **Rossau R, Traore H, Beenhouwer H.** Evaluation of the INNO-Inno-LiPA Rif. TB assay a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and its resistance to rifampin. Antimic. Agents and Chemother. 1997; 41: 2093-2098
14. **Laszlo A, Rahman M, Raviglione M, et al.** Quality assurance program for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. Int J Tuberc Lung Dis 1997; 1(3):231-238.
15. **Morris S, Han Bai G, Suffys P.** Molecular mechanisms of Multiple drug resistance in Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect Dis. 1995; 171: 954-960.
16. **Murcia MI, León CI, De la Hoz F, Saravia J.** The prevalence of mycobacterial infections in HIV positive patients attending the San Juan de Dios Hospital in Santafe de Bogotá, Colombia. Revista de Salud Pública; 2001 sometido para publicación.
17. **Guerrero MI., Samper S, Martín C, et al.** Tuberculosis drug resistance associated with the presence of HIV in Santa Fe de Bogotá. Abstracts of the International Colloquium "Tuberculosis, The Real Millennium Bug" Amberes Belgica . 1999
18. **Kapur V, Ling L, Iordanescu S.** Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase B subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York city and Texas. Clin. Microbiology. 1994; 32: 1095-1098.
19. **Schilhe K, Weyer K.** Universal pattern of rpoB gene mutations among multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 1994; 3: 620-626.