

PRUEBA DE SONDA LINEAL GENOTYPE MTBDRPLUS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE EN PERÚ

Zully M. Puyén Guerra ^{1,a}

RESUMEN

¹ Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

^a Biólogo, doctorado en Microbiología.

Correspondencia

zpuyen@ins.gob.pe

La prueba de sonda lineal Genotype MTBDRplus es un ensayo molecular que permite detectar *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina e isoniacida a partir de muestras de esputo y cultivo en 3 a 5 días. Su uso está aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico rápido de tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR), por ello, los investigadores del Instituto Nacional de Salud (INS) llevaron a cabo su validación e implementación en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) en 2010. Basados en estos hallazgos, la prueba molecular se incluyó en la Norma Técnica Nacional de TB en 2013 como un procedimiento de tamizaje para la detección de TB-MDR. En ese sentido, la implementación del Genotype MTBDRplus nos ha permitido cubrir cada vez más la demanda del diagnóstico de TB-MDR, aumentando la cobertura diagnóstica del 5 al 60% en 2011 y 2015, respectivamente. Así también, el Genotype MTBDRplus se ha descentralizado a dos laboratorios del Centro de Excelencia Contra la Tuberculosis, y para el 2016 se ha programado la transferencia tecnológica al Laboratorio de Referencia DISA II Lima Sur sede Magdalena.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) junto con el VIH son dos de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 1,5 millones de muertes por TB y 9,6 millones de casos nuevos. De este último, solo se reportaron 6 millones de casos a la OMS, es decir, menos de dos tercios (63%) de los 9,6 millones de casos que se habían estimado⁽¹⁾. Esto significa que el 37% de casos nuevos no se diagnostican o simplemente no se reportan, probablemente porque en la mayoría de los escenarios la atención en el primer nivel se desconoce⁽¹⁾. De igual forma, para la TB multidrogorresistente (TB-MDR: TB con resistencia simultánea a isoniacida [INH] y rifampicina [RIF]), se estimó para el 2014, 190 000 muertes y 3,3% de casos nuevos, adicionalmente, 20% de los casos previamente tratados.

Así también, en 2014, el 58% de los pacientes previamente tratados y el 12% de los casos nuevos tuvieron acceso a pruebas de susceptibilidad a fármacos^(1,2), panorama que mejoró respecto

a lo acontecido en el 2013, donde solo el 17% de los pacientes previamente tratados, y el 8,5% de casos nuevos tuvieron acceso a pruebas de susceptibilidad a fármacos^(1,2). Esta relevante mejora se debe principalmente a la implementación de pruebas moleculares rápidas en los laboratorios de TB a nivel mundial^(1,3).

Perú, en 2014, notificó un total de 30 008 casos de TB con una incidencia de 120 por cada 100 000 habitantes⁽¹⁾. De los 30 008 casos, 27 375 (91%) correspondieron a casos nuevos y 2633 (9%) a recaídas. De los casos nuevos, 17 823 (65%) fueron confirmados por bacteriología, 4204 (15%) clínicamente y 5348 (20%) fueron extrapulmonares. Respecto a las recaídas, 2128 (80%) fueron confirmados por bacteriología, 366 (14%) clínicamente y 139 (6%) fueron extrapulmonares^(1,3-4). Por consiguiente, para reducir estas altas cifras de enfermos por TB en todas sus formas, es de vital importancia el manejo de los componentes clave para el control de la TB, en especial el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno⁽⁵⁾.

EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EN EL LABORATORIO DE REFERENCIA NACIONAL DE MICOBACTERIAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Perú es uno de los países del continente americano con una alta carga de TB-MDR y TB extremadamente resistente (XDR). Hasta el 2010, el diagnóstico de la TB-MDR se realizaba por métodos relativamente rápidos, el método colorimétrico Griess proporcionaba resultados positivos en 10 días^(6,7) y el método de observación directa (MODS; método rápido en medio líquido) en 7 días⁽⁸⁾; además de diagnosticar la TB, estos dos métodos también podían determinar la resistencia a INH y RIF. A pesar de su bajo costo y que presentan buenos resultados bajo condiciones bien controladas, no dejan de ser pruebas de cultivo, por lo que se exponen a altos índices de contaminación, y su utilización es limitada, sobre todo en lugares donde el transporte de muestras cumple un rol importante. Finalmente, para diagnosticar TB-XDR se utiliza el método de cultivo de proporciones agar en placa (APP), que

evalúa la resistencia a 11 drogas, incluidas 5 de primera línea y 6 de segunda línea en un periodo de 90 días^(5,6).

Como se puede observar, en las figuras 1 y 2, hasta el año 2010, la detección de casos de TB-MDR, TB-XDR y TB-monorresistente a RIF e INH estaba estabilizándose utilizando los métodos rápidos Griess y MODS, así como el método APP para la confirmación del patrón completo de resistencia; sin embargo, con el ingreso de la prueba Genotype MTBDRplus en el 2011, se incrementó la detección de casos nuevos en menos tiempo.

EXPERIENCIA DEL PROCESO DE IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE ENSAYO LINEAL-GENOTYPE MTBDRPLUS

Los objetivos estratégicos del INS son la incorporación, desarrollo y promoción de nuevas tecnologías para la investigación y producción de productos estratégicos para la salud, y el desarrollo y transferencia de tecnologías acorde a

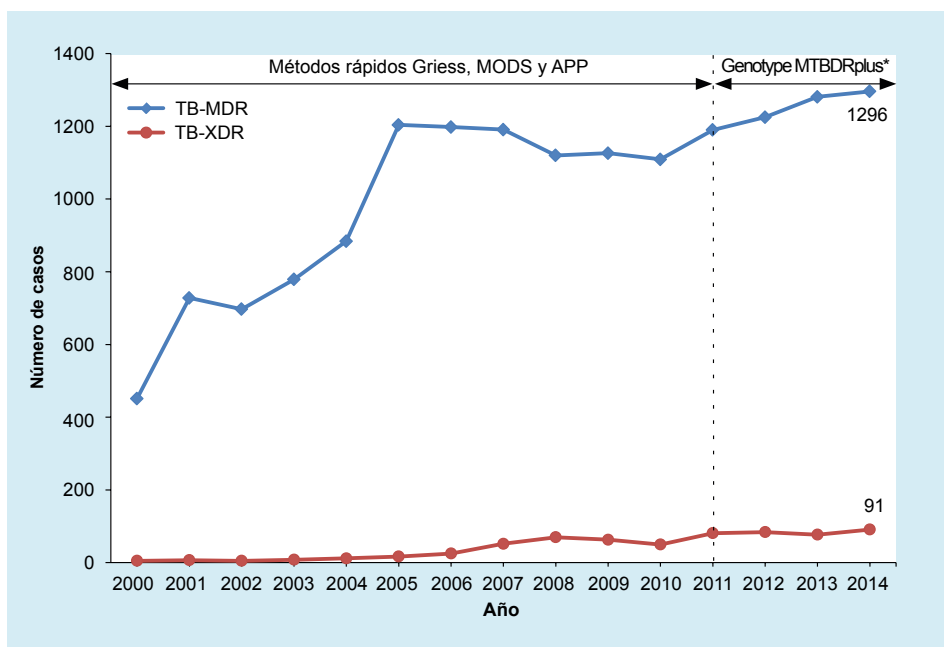


Figura 1. Casos de tuberculosis TB-MDR y TB-XDR, Instituto Nacional de Salud, Perú, 2000–2014. (*) Genotype MTBDRplus solo para detección de casos de TB-MDR

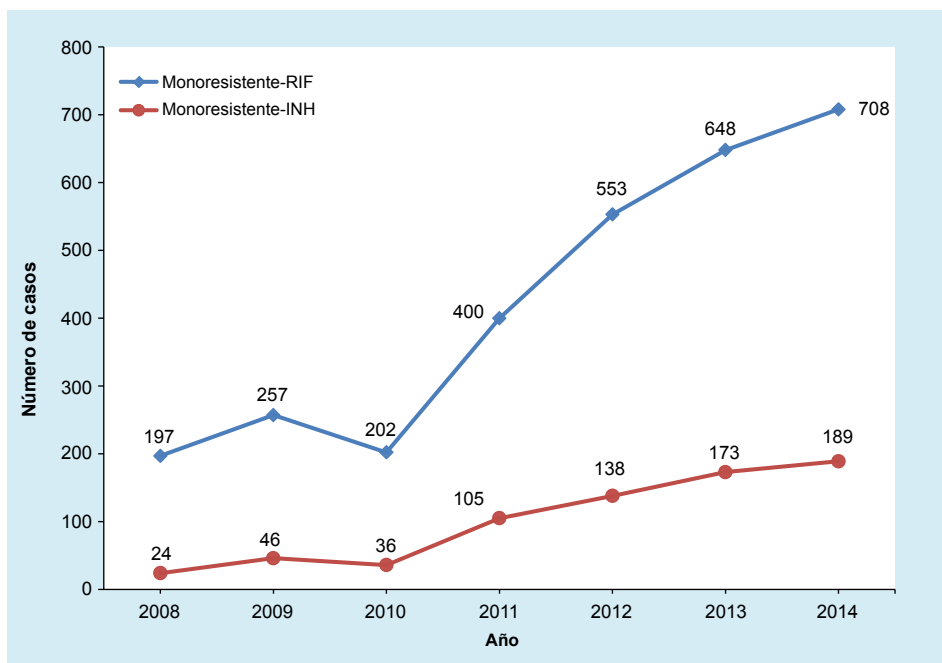


Figura 2. Casos de tuberculosis resistente a isoniacida (monorresistente-INH) y rifampicina (monorresistente-RIF), Instituto Nacional de Salud, Perú, 2008–2014

las necesidades de la población. En este sentido, cuando hablamos de la TB, uno de los principales problemas en el ámbito nacional es el aumento de los casos de TB-MDR. Frente a este problema, el INS a través del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM), comenzó a investigar en el 2008 todas las pruebas para el diagnóstico de TB-MDR, sobre todo los recomendados por la OMS⁽¹⁾. Como resultado de esta búsqueda propusieron la implementación de la prueba molecular Genotype MTBDRplus, un ensayo de sonda lineal que permite confirmar el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) en muestras de esputo y cultivo, además de su resistencia a RIF e INH en 3 a 5 días^(5,9).

Para la implementación del Genotype MTBDRplus en el LRNM-INS fue importante la intervención y el apoyo de la Estrategia Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis (ESNPCT), quien comenzó en 2009 las coordinaciones con los especialistas extranjeros para la transferencia de esta metodología, la adecuación de la

infraestructura del laboratorio y la adquisición de equipos que serían necesarios para realizar este ensayo. Seguidamente, se capacitó al personal profesional y técnico que asumiría la puesta en marcha de la prueba molecular rápida, y a mediados del 2010 se llevó a cabo la validación del ensayo de sonda lineal Genotype MTBDRplus en condiciones bien controladas, obteniéndose una sensibilidad de 95,2 y 96,9% para detección de TB-MDR en muestras de esputo y cultivo, respectivamente⁽¹⁰⁾. Con estos resultados, en 2011, la prueba molecular se puso al servicio de la población en general. Finalmente, en 2013 en coordinación con la ESNPCT se logró incluir el Genotype MTBDRplus en la Norma Técnica de Salud (NTS) para la Atención Integral de las Personas afectadas por Tuberculosis⁽⁵⁾, donde se normó que todo paciente con TB tiene derecho a acceder a una prueba rápida y que el Genotype sirva como una prueba de tamizaje para la detección de TB-MDR, para posteriormente conocer el patrón completo de resistencia por el método de susceptibilidad a drogas de primera y segunda línea (APP).

La implementación de esta prueba conllevó a procesos muy importantes para la institución. Aunque se tuvo que asumir algunos desafíos, se pudo llevar a cabo la puesta en marcha del ensayo. Un reto importante fue que el ensayo molecular requería de una infraestructura adecuada, es decir, un laboratorio de alto riesgo (nivel III) donde se pueda manipular muestras infectadas con MTB, lo cual se pudo conseguir adaptando el LRNM-INS. Por otro lado, adquirir esta metodología no solo era una gran oportunidad para el laboratorio sino también para el país, ya que era la primera vez que se trabajaría con una metodología molecular rápida (3 a 5 días para obtener el resultado) para el diagnóstico de TB-MDR a nivel nacional. En general, la implementación del Genotype se realizó gracias al esfuerzo y compromiso de los integrantes del LRNM, directivos del INS e integrantes de la ESNPCT, donde cada uno de ellos pudo intervenir en la operatividad técnica especializada, acondicionamiento del laboratorio, adquisición de equipos, gestión para la introducción en la NTS, así como búsqueda de financiamiento para la sostenibilidad de la prueba.

En 2015, la implementación del ensayo de sonda lineal Genotype MTBDRplus en el LRNM-INS fue reconocida como una Buena Práctica de Gestión Pública para el control de la TB-MDR en el Perú por la organización sin fines de lucro "Ciudadanos al Día". De la misma forma esta experiencia fue ganadora a nivel gerencial en el XII Encuentro Nacional de Experiencias en Mejoramiento de la Calidad en Salud 2015 organizado por el MINSa.

LAPRUEBADE SONDALINEAL GENOTYPE MTBDRPLUS EN LA ACTUALIDAD

La prueba de sonda lineal Genotype MTBDRplus se implementó en el LRNM-INS en 2011, y desde entonces se viene realizando con regularidad. Esta prueba se puede realizar a partir de muestras de esputo de pacientes con baciloscopia positiva, y a partir de aislados de cultivos en medios sólidos y líquidos. Con la implementación del Genotype se ha podido cubrir cada vez más la demanda del diagnóstico de TB, es así que desde el 2011 hasta el 2015, la cobertura del diagnóstico se ha incrementado de 5 al 60% (Figura 3). Así mismo, la cobertura de la prueba Genotype a partir de muestras de esputo de pacientes con

baciloscopia positiva, se ha incrementado de 3% en el año 2011 hasta 46% en el 2015 (Figura 4).

Por otro lado, varias ventajas para el control de la TB se han obtenido con la implementación de la prueba Genotype en el LRNM-INS. Primero, el tiempo de emisión de resultados de un paciente con TB-MDR, se ha reducido de 90 a 5 días, dado que los resultados se emiten a través del NETI@b.

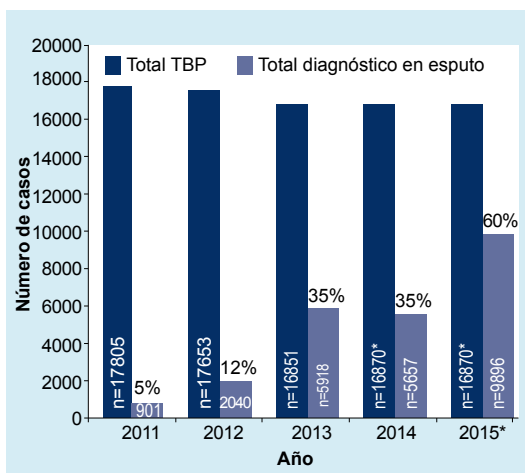


Figura 3. Total de pacientes con diagnóstico de TB en Perú y número total de pruebas Genotype MTBDRplus realizadas entre 2011–2015

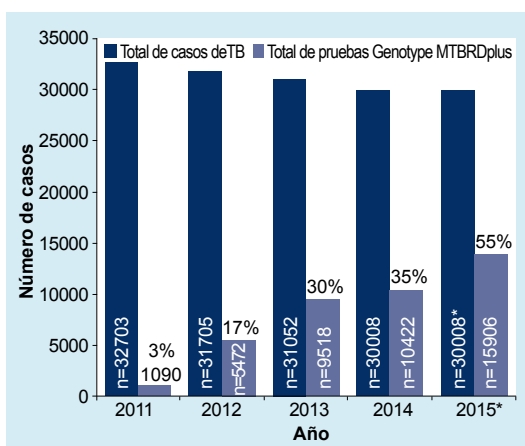


Figura 4. Total de pacientes con TB con baciloscopia positiva en Perú y total de pruebas Genotype MTBDRplus realizadas a partir de muestras de esputo en el Instituto Nacional de Salud, Perú, 2011–2015. (*) Datos tomados del año 2014, ya que no se cuenta con información de 2015.

Segundo, la amplificación de la resistencia de MTB ahora se detecta de una manera más rápida y activa. Finalmente, genera otros beneficios como el ahorro en costos al estado por el tratamiento de pacientes que pudieron haberse contagiado, el mejoramiento de la infraestructura de los laboratorios, la adquisición de equipos de última generación y el reforzamiento de las capacidades del recurso humano mediante capacitaciones en pruebas moleculares.

Así también, con el objetivo de que todo paciente con TB tenga acceso a una prueba rápida de detección de TB-MDR (como se describe en la Norma técnica Nacional de TB), a finales del 2013 se comenzó con el proceso de transferencia tecnológica del Genotype MTBDRplus a los dos laboratorios de TB de los Centros de Excelencia Contra la Tuberculosis (CENEX-TB) ubicados en los hospitales María Auxiliadora e Hipólito Unanue. Este proceso estuvo a cargo del LRNM-INS con la ayuda de la ESNPCT, comenzó en el año 2013 con el diagnóstico situacional de los laboratorios, seguido de la capacitación del personal (año 2014). A partir de septiembre de 2015 esta prueba se realiza en los dos laboratorios de TB de los CENEX-TB para diagnosticar a los pacientes de su jurisdicción.

PERSPECTIVAS

La NTS de la ESNPCT dispone que todas las personas con diagnóstico de TB deben acceder a una prueba rápida para detectar resistencia a RIF e INH, ya sea por métodos moleculares o fenotípicos. En ese sentido, se ha elaborado el "Plan de expansión de pruebas rápidas para la detección de TB-MDR en los laboratorios de la red nacional de salud pública, 2016–2020", este plan contempla la descentralización e implementación de la prueba Genotype MTBDRplus en dos laboratorios referenciales ubicados en Lima Metropolitana (Laboratorio de Referencia DISA II Lima Sur sede Magdalena) y la selva peruana, y la implementación del MODS en 4 laboratorios adicionales. Con la implementación de estas pruebas de laboratorio se espera cubrir al 100% de pacientes diagnosticados con TB.

De la misma forma, para el 2016 se ha programado la implementación de la prueba de ensayo lineal Genotype MTBDRs⁽¹¹⁾ en el LRNM-INS, la cual nos

permitirá, además de diagnosticar a un paciente con TB-XDR, identificar el complejo MTB (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanus* y *M. Microti*) y detectar su resistencia a las fluoroquinolonas y a los péptidos aminoglucósidos (y etambutol).

CONCLUSIÓN

El diagnóstico rápido y la identificación de las cepas multidrogo y extremadamente resistentes, así como el tratamiento oportuno de los pacientes con estas formas de tuberculosis son claves para el control de esta enfermedad. Por lo tanto, el desarrollo e implementación de nuevas herramientas moleculares rápidas para la detección de *M. tuberculosis* y su resistencia a las drogas son requisitos indispensables para la lucha contra la tuberculosis a nivel nacional y mundial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis Report 2015. 20th edition. Geneva: WHO; 2015.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. Geneva: WHO; 2014.
3. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. La Tuberculosis en las Américas. Estimaciones de la OMS en el 2012. Washington, D.C.: OMS/OPS; 2014.
4. Organización Panamericana de la Salud. La Tuberculosis en la Región de las Américas. Informe Regional 2011. Epidemiología, control y financiamiento. Washington, D.C.: OMS/OPS; 2011. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22425&Itemid=
5. Ministerio de Salud, Perú. Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectadas por tuberculosis. NTS 104-MINSA/DGSP-V.01 2013. Lima: MINSA; 2013.
6. Solis LA, Shin SS, Han LL, Llanos F, Stowell M, Sloutsky A. Validation of a rapid method for detection of *M. tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9(7):760–4
7. Shin SS, Asencios L, Yagui M, Yale G, Suárez C, Bayona J, *et al.* Impact of rapid drug susceptibility testing for tuberculosis: program experience in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012; 16(11):1538-43.
8. Caviades L, Moore DA. Introducing MODS: A low-cost, low-tech tool for high-performance detection of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25(2):87-8.
9. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Inf Dis.* 2005;5:62.

10. 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 multidrogoresistente. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2012;29(1):92-8.
11. Mao X, Ke Z, Shi X, Liu S, Tang B, Wang J, *et al.* Diagnosis of Drug Resistance to Fluoroquinolones, Amikacin, Capreomycin, Kanamycin and Ethambutol with Genotype MTBDRsl Assay: a Meta-Analysis. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45(5):533-4.