

Utilización y evaluación de un ensayo con sondas en línea en los pacientes con diagnóstico de tuberculosis en el Perú del 2011 al 2013*

Zully M. Puyén,¹ Joshi Acosta,¹ George Obregon,¹ Edson Pacheco,¹
Hada Ramirez,¹ Alberto Mendoza,² Diana Marín³ y Anthony D. Harries⁴

Forma de citar (artículo original)

Puyén ZM, Acosta J, Obregon G, Pacheco E, Ramirez H, Mendoza A, et al. Use and evaluation of a line probe assay in patients with tuberculosis in Peru: 2011–2013. *Rev Panam Salud Publica*. 2016;39(1):19-25.

RESUMEN

Objetivo. Definir la utilización de un ensayo con sondas en línea y evaluar su desempeño, en comparación con el método convencional de cultivo y antibiograma, en los pacientes registrados con tuberculosis en condiciones programáticas en el Perú del 2011 al 2013.

Métodos. Investigación operativa descriptiva con un estudio transversal de las muestras de esputo de los pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar y baciloscopia positiva y de los cultivos de micobacterias de los pacientes con tuberculosis y baciloscopia positiva o negativa. La farmacorresistencia a la rifampicina, la isoniacida o a ambas, detectada mediante el ensayo con sondas en línea, se comparó con los resultados obtenidos por el método de cultivo y antibiograma. Se calculó la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos del ensayo con sondas en línea y se evaluó su fiabilidad en la detección de la farmacorresistencia mediante el coeficiente *k*, cuyos valores de 0,61 a 0,80 correspondían a una fuerte correlación y los valores de 0,81 o superiores reflejaban una correlación casi perfecta.

Resultados. Del 2011 al 2013 se practicaron 16 169 ensayos con sondas en línea, y la proporción de pacientes con diagnóstico de tuberculosis en quienes se practicaba aumentó de 3,2% a 30,2%. En total, se compararon 2 905 resultados del ensayo molecular con el método convencional. En las muestras de esputo, el ensayo molecular ofreció una sensibilidad de 92% para la resistencia a la rifampicina, 94% a la isoniacida y 88% para la tuberculosis multirresistente; su especificidad fue 92% con respecto a la rifampicina, 92% a la isoniacida y 95% a la tuberculosis multirresistente. En los cultivos de micobacterias, el ensayo con sondas en línea mostró una sensibilidad de 95% para la resistencia a la rifampicina, 96% a la isoniacida y 90% para la tuberculosis multirresistente; la especificidad fue 85% para la rifampicina, 91% para la isoniacida y 94% para la tuberculosis multirresistente. El coeficiente *k* fue 0,81 o superior en todas las comparaciones del ensayo molecular con el método tradicional cuando se usaron muestras de esputo y cultivo, excepto con la isoniacida en cultivo, cuyo coeficiente fue 0,79.

Conclusiones. Los resultados del presente estudio indican que el ensayo con sondas en línea constituye una prueba de detección fiable y rápida para la tuberculosis multirresistente, y se debe considerar apropiada su utilización en la práctica de rutina y la ampliación de su empleo en el Perú.

Palabras clave

Mycobacterium tuberculosis; tuberculosis; tuberculosis resistente a múltiples medicamentos; sondas moleculares; técnicas de sonda molecular; investigación operativa; Perú.

* Traducción oficial al español del artículo original en inglés efectuada por la Organización Panamericana de la Salud. En caso de discrepancia entre ambas versiones, prevalecerá la original (en inglés).

¹ Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. La corresponden-

cia se debe dirigir a Zully M. Puyén, correo electrónico: zpuyeng@gmail.com

² Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis, Lima, Perú.

³ Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.

⁴ Unión Internacional Contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias, París.

El Perú es una república democrática dividida en 25 regiones políticas y con 30 millones de habitantes. En su clasificación actual, el Banco Mundial considera que es un país de ingresos mediano altos con un PIB nominal per cápita de aproximadamente US\$ 7 000; sin embargo, la distribución de la riqueza no es equitativa: en el 2010, cerca del 30% de la población total era pobre (1). El programa nacional contra la tuberculosis se instituyó en el Perú en 1990 y sigue las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2, 3). A pesar del esfuerzo continuo, la tuberculosis (TB) sigue siendo una de las principales enfermedades infecciosas del país.

Se considera que, en la Región de las Américas, el Perú ocupa el quinto lugar en lo que respecta a la carga de tuberculosis y el primero en cuanto a la tuberculosis multirresistente (TB-MDR; resistente tanto a la isoniazida como a la rifampicina) y la tuberculosis extensamente resistente (TB-XDR, denominación que se asigna a la tuberculosis multirresistente que también es resistente a una fluoroquinolona y uno de los medicamentos inyectables de segunda línea) (3). La tasa de incidencia notificada en el 2013 fue de 90 nuevos casos por 100 000 habitantes; en total, se notificaron 31 052 casos de (TB), de los cuales 1 281 tenían TB-MDR y 77, TB-XDR (3, 4).

La Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis (ESN-PCT), que es el programa nacional contra la tuberculosis en el Perú (4), cuenta con una unidad central ubicada en la capital, Lima, y unidades equivalentes en cada región geopolítica del país. La unidad central determina la política nacional de control de la (TB) tanto del sector público como del privado. La ESN-PCT sigue las directrices de la OMS pero las adapta a la situación clínica, epidemiológica y socioeconómica del país (1).

Según la última encuesta nacional sobre farmacorresistencia, 1 de cada 5 enfermos de TB diagnosticados en Lima es resistente a la rifampicina o a la isoniazida (5). La TB está concentrada principalmente en Lima y Callao, donde se registra el 54% de los casos nacionales, el 84% de los casos de TB-MDR y el 90% de los casos de TB-XDR (3, 4). Hay otras 10 regiones geográficas donde la transmisión de la TB se considera alta o muy alta. Además, se ha notificado una prevalencia alta de la resistencia a la isoniazida: 11,5% entre los nuevos enfermos

y 30% entre quienes ya recibieron tratamiento (5).

El tiempo necesario para detectar la TB-MDR —en la mayoría de los casos, transcurren 4 meses desde la primera baciloscopia de esputo positiva hasta que se obtienen los resultados del antibiograma— ha representado un obstáculo importante para el tratamiento porque retrasa el comienzo de la antibioticoterapia de segunda línea. Con el fin de acelerar el diagnóstico y el inicio del tratamiento en los casos de tuberculosis farmacorresistente, en el 2011, el Ministerio de Salud del Perú incorporó un ensayo con sondas en línea (6) para detectar la resistencia a la isoniazida y a la rifampicina directamente a partir de las muestras de esputo con baciloscopia positiva, por la presencia de bacilos acidorresistentes, y de los cultivos positivos de *Mycobacterium tuberculosis*. Este ensayo es una prueba molecular rápida que se emplea para diagnosticar el complejo de *M. tuberculosis* y para detectar la resistencia a la isoniazida y la rifampicina mediante mutaciones génicas, lo que permite diagnosticar la tuberculosis multirresistente, 3 días después de que se obtuvo la muestra de esputo (7).

El ensayo con sondas en línea es un estudio de tamizaje en el Perú. Las directrices nacionales (6) estipulan que, si este ensayo revela resistencia a la isoniazida o la rifampicina, debe iniciarse un esquema antibiótico estandarizado de segunda línea y obtenerse otra muestra de esputo para cultivo y antibiograma frente a cinco antituberculosos de primera línea y seis de segunda línea. Los resultados se emplean para modificar el esquema terapéutico estandarizado contra la tuberculosis multirresistente y así definir un esquema específico e individualizado para cada paciente.

En el 2010, el Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú) validó el ensayo con sondas en línea frente al cultivo y antibiograma a partir de 200 muestras estudiadas en el marco de un estudio experimental de laboratorio (8). Si bien se observó que este método tenía buena sensibilidad y especificidad, no se ha comparado con el cultivo y antibiograma en condiciones de rutina en el Perú, ya sea a partir de muestras de esputo de enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva en regiones donde la carga de tuberculosis farmacorresistente es alta, a partir de muestras de estos mismos enfermos donde la carga es

baja, o a partir de muestras de enfermos de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar con baciloscopia negativa en situaciones en las que es necesario obtener el diagnóstico de la farmacorresistencia con rapidez. Además, está la posibilidad de que, con el transcurso del tiempo, el bacilo *M. tuberculosis* presente mutaciones genéticas que condicionen las comparaciones obtenidas cuatro años atrás en el estudio experimental de laboratorio (8).

Por lo tanto, se realizó el presente estudio para comparar la utilidad y el desempeño del ensayo con sondas en línea con los del cultivo y antibiograma a partir de muestras de enfermos de tuberculosis en condiciones programáticas ordinarias, específicamente llevando adelante las siguientes actividades: 1) registrando del número de ensayos con sondas en línea realizados en relación con el número total de enfermos de tuberculosis registrados y el número de enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva; y 2) evaluando las muestras de esputo y los cultivos micobacterianos mediante el ensayo con sondas en línea, y mediante el cultivo y antibiograma para comparar la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo de cada método respecto de la detección de la resistencia a la isoniazida y a la rifampicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue una investigación operativa y descriptiva de diseño transversal que comparó y evaluó los resultados del ensayo con sondas en línea con los del cultivo y antibiograma en el Perú en los años 2011-2013 a partir de la base de datos nacional de tuberculosis del laboratorio de referencia nacional del Perú.

Entorno

Procedimientos de laboratorio. El Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) pertenece al Instituto Nacional de Salud y encabeza la Red de Laboratorios de Tuberculosis en el Perú. Según las directrices nacionales (6), es preciso determinar la resistencia a la isoniazida y a la rifampicina de todos los casos de tuberculosis nuevos y los ya tratados mediante pruebas diagnósticas rápidas. De conformidad con estas directrices, el LRNM incorporó el ensayo con sondas en línea (Genotype® MTBDRplus, Hain LifeScience, Nehren, Alemania) en el 2011 para detectar la tuberculosis

multirresistente y el complejo de *M. tuberculosis* a partir de las muestras que habían tenido una baciloscopia positiva y de los cultivos micobacterianos positivos, generalmente de las muestras cuya baciloscopia había sido negativa o de las muestras de tuberculosis extrapulmonar. Si el ensayo indica resistencia a la isoniazida, a la rifampicina, o a ambos medicamentos, se realiza un cultivo convencional con medio de Löwenstein-Jensen, y un cultivo y antibiograma con el método de las proporciones con placas de agar 7H10 de Middlebrook BD™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania), ambos preparados en el laboratorio de referencia. Se utilizó el método inmunocromatográfico SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics Incorporated, Gyeonggi-do, República de Corea) para detectar el complejo de *M. tuberculosis* en las muestras de cultivo, que luego fueron sometidas al método de referencia nacional, cultivo y antibiograma (9). La inmunocromatografía se aplicó a los cultivos obtenidos con las muestras enviadas al Instituto Nacional de Salud.

En los primeros años en que se amplió la cobertura del ensayo con sondas en línea, se tomó la decisión de incluir todo resultado que revelara susceptibilidad a la isoniazida y a la rifampicina a fin de facilitar la correlación con los resultados del cultivo y antibiograma. El perfil de susceptibilidad de este último ensayo comprende los siguientes medicamentos: isoniazida (concentración baja y alta), rifampicina, etambutol, estreptomina, ciprofloxacino, kanamicina, capreomicina, cicloserina y ácido paraaminosalicílico. La susceptibilidad o resistencia a la pirazinamida se evalúa con la prueba de la pirazinamida. Los resultados del ensayo con sondas en línea y del cultivo y antibiograma se publican en tiempo real en el sistema NETLab, al que tienen acceso los médicos y los funcionarios del ESN-PCT de todo el país (10). El LRNM participa en las rondas anuales de control de la calidad externa de la Red Supranacional de Laboratorios para pruebas convencionales de susceptibilidad. El ensayo con sondas en línea se realiza en condiciones estrictas conforme a las instrucciones del fabricante, como se describe en Hillemann y cols. (11).

Vinculación con el tratamiento. Las directrices de la ESN-PCT (6) estipulan que, una vez obtenidos los resultados del ensayo con sondas en línea, debe

instituirse un esquema de tratamiento antituberculoso estandarizado definido en función de cuatro situaciones, a saber: 1) sensible a la isoniazida y a la rifampicina; 2) resistente solo a la isoniazida; 3) resistente solo a la rifampicina; y 4) resistente tanto a la isoniazida como a la rifampicina. Estos esquemas estandarizados pueden modificarse a fin de instituir un tratamiento más individualizado a la luz de los resultados del cultivo y antibiograma.

Recopilación y análisis de los datos

Muestras. El estudio incluyó todas las muestras de esputo de los enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva y cultivo micobacteriano que el LRNM sometió al ensayo con sondas en línea, así como los resultados de cultivo y antibiograma registrados en el sistema NETLab entre el 2011 y el 2013, con los que fueron comparados. Si bien en algunos casos se incluyó más de una muestra por paciente, el tiempo entre la obtención de las muestras siempre fue de 6 meses o más.

Variables y recopilación de datos. Los datos se recopilaron entre enero y junio del 2015 en relación con los tres objetivos ya mencionados: 1) el año, el número de ensayos con sondas en línea realizados y el número de pacientes con tuberculosis pulmonar y baciloscopia positiva registrados cada año; y 2) los resultados del ensayo con sonda en línea y del cultivo y antibiograma de las muestras de esputo o de los cultivos micobacterianos que revelaron susceptibilidad a la isoniazida o la rifampicina, resistencia a la isoniazida, resistencia a la rifampicina y resistencia a la rifampicina y a la isoniazida. Los datos se obtuvieron del sistema de NETLab y se volcaron en una planilla de cálculo Microsoft Excel™ (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos).

Análisis de los datos y estadísticas. Los datos de la planilla de cálculo se exportaron a Stata®/ MP13 (StataCorp LP, College Station, Texas, Estados Unidos). Se presentaron los números absolutos y las proporciones tanto del número de ensayos con sondas en línea realizados como del número de enfermos con tuberculosis pulmonar y baciloscopia positiva. Se comparó el desempeño del ensayo con sondas en línea con el del cultivo y antibiograma calculando la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo

positivo y el valor predictivo negativo con intervalos de confianza del 95% (IC del 95%). Se comparó la fiabilidad de la detección de la farmacoresistencia del ensayo con sondas en línea con la del cultivo y antibiograma mediante el coeficiente κ , cuyo grado de concordancia fue definido de la siguiente manera: 0-0,20 = mala; 0,21-0,40 = regular; 0,41-0,60 = moderada; 0,61-0,80 = considerable; y 0,81 a 1,0 = casi perfecta (12, 13).

Ética

Otorgaron la aprobación ética para la realización de este estudio el Grupo Consultivo sobre Ética de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias (París) y el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú).

RESULTADOS

En la figura 1, se muestra el número de ensayos con sondas en línea realizados en el país en relación con el número de enfermos de tuberculosis registrados en el sistema nacional. En todos los casos, el número y la proporción obtenidos con este ensayo a partir de las muestras de esputo y de cultivos aumentaron del 3,2% en el 2011 al 30,2% en el 2013 (figura 1A). En cuanto a los enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva, el número y la proporción obtenidos con este ensayo únicamente a partir de las muestras de esputo aumentaron del 4,9% en el 2011 al 34,7% en el 2013 (figura 1B).

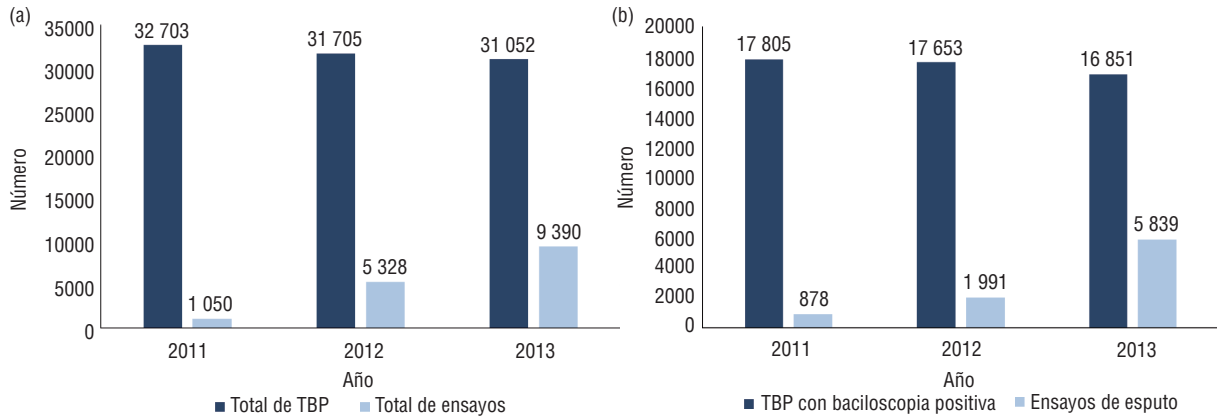
En la figura 2, se observa el número total de ensayos con sondas en línea realizados en el período de tres años junto con los resultados que luego se compararon con los de los cultivos y antibiogramas. Se realizaron en total 16 169 ensayos con sondas en línea, de los cuales más del 99% tuvieron un resultado definitivo de susceptibilidad o resistencia a la rifampicina, la isoniazida, o a ambos medicamentos.

De los 12 620 ensayos con sondas en línea que revelaron susceptibilidad, 493 fueron comparados con los resultados del cultivo y antibiograma. De los 3 442 ensayos que revelaron resistencia a la rifampicina, a la isoniazida o a los dos medicamentos, 2 412 fueron comparados con los resultados del cultivo y antibiograma, con lo cual pudieron compararse, en total, 2 905 de los ensayos realizados.

FIGURA 1. Número de pacientes sometidos al ensayo con sondas en línea en relación con el número de enfermos de tuberculosis registrados, Perú, 2011-2013

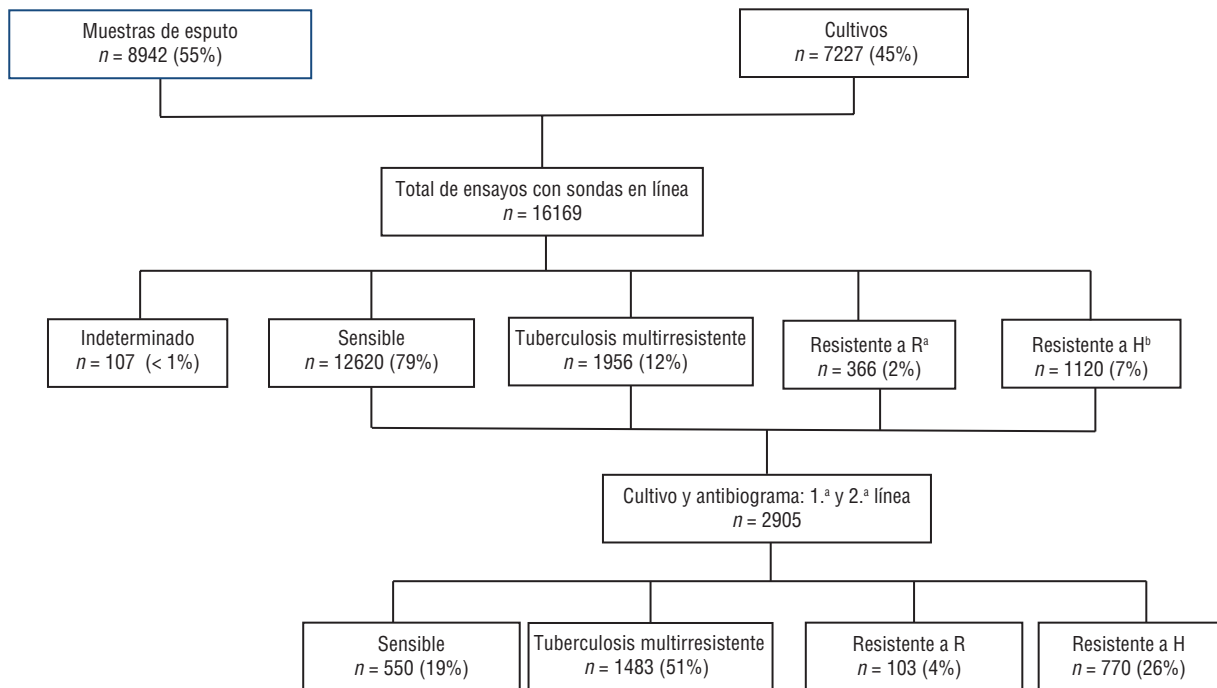
1A. Número total de enfermos de tuberculosis y número total de enfermos a los que se realizó el ensayo con sondas en línea

1B. Número de enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva y número de muestras de esputo sometidas al ensayo con sondas en línea



TBP: tuberculosis pulmonar.

FIGURA 2. Diagrama de flujo que muestra el número de ensayos con sondas en línea a partir de muestras de esputo de enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva y cultivos de enfermos de tuberculosis con baciloscopia negativa o positiva junto con los resultados de los cultivos y antibiogramas, Perú, 2011-2013



Fuente: Diagrama elaborado por los autores a partir de los datos del estudio.

^a Rifampicina.

^b Isoniazida.

No fue posible comparar los resultados de 1 030 que revelaron farmacoresistencia debido a que no se observó ningún crecimiento micobacteriano o a que se contaminaron los cultivos de micobacterias.

En el cuadro 1 se comparan los resultados del ensayo con sondas en línea con los del cultivo y antibiograma como pruebas de susceptibilidad para detectar la

resistencia a la isoniazida, la rifampicina o ambos medicamentos a partir de muestras de esputo y cultivos. En el cuadro 2 se observa el desempeño del ensayo con sondas en línea en cuanto a la detección de la resistencia a la rifampicina, a la isoniazida y a ambos medicamentos a partir de muestras de esputo y cultivos. La sensibilidad, la especificidad y el valor

predictivo positivo del ensayo con sondas en línea a partir de esputo y cultivo, solo respecto a la isoniazida, solo respecto a la rifampicina y en relación con la tuberculosis multirresistente en general se ubicaron en el 90% o en valores superiores. Los valores predictivos negativos fueron del 90% o superiores respecto de la rifampicina y la tuberculosis multirresistente,

CUADRO 1. Comparación de la susceptibilidad a la isoniazida, a la rifampicina o a ambos medicamentos mediante el ensayo con sondas en línea y el cultivo y antibiograma convencional a partir de muestras de esputo de enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva y cultivos de enfermos de tuberculosis con baciloscopia negativa, Perú, 2011-2013

Medicamento			
Rifampicin (R)			
Sputum specimens:	CDST resistant to R	CDST sensitive to R	Total
Resistente a la R (ensayo con sondas)	936	79	1 015
Sensible a la R (ensayo con sondas)	81	908	989
Total	1 017	987	2 004
Cultivos:	Resistente a la R (cultivo y antibiograma)	Sensible a la R (cultivo y antibiograma)	
Resistente a la R (ensayo con sondas)	541	51	592
Sensible a la R (ensayo con sondas)	28	281	309
Total	569	332	901
Isoniazid (H)			
Sputum specimens:	CDST resistant to H	CDST sensitive to H	Total
LPA resistant to H	1 369	46	1 415
LPA sensitive to H	81	508	589
Total	1 451	554	2 004
Cultivos:	Resistente a la H (cultivo y antibiograma)	Sensible a la H (cultivo y antibiograma)	
Resistente a la H (ensayo con sondas)	770	9	779
Sensible a la H (ensayo con sondas)	32	90	122
Total	802	99	901
Isoniazid + rifampicin (multi-drug resistant tuberculosis; MDR-TB)			
Muestras de esputo:	Tuberculosis multirresistente (cultivo y antibiograma)	No hay tuberculosis multirresistente (cultivo y antibiograma)	Total
Tuberculosis multirresistente (ensayo con sondas)	841	51	892
No hay tuberculosis multirresistente (ensayo con sondas)	117	995	1 112
Total	958	1 046	2 004
Cultivos:	Tuberculosis multirresistente (cultivo y antibiograma)	No hay tuberculosis multirresistente (cultivo y antibiograma)	
Tuberculosis multirresistente (ensayo con sondas)	474	23	497
No hay tuberculosis multirresistente (ensayo con sondas)	51	353	404
Total	525	376	901

Fuente: Cuadro elaborado por los autores con datos exportados de la base de datos NETLab (www.netlab.ins.gob.pe/FrmNewLogin.aspx) del Instituto Nacional de Salud del Perú.

CUADRO 2. Comparación del desempeño entre el ensayo con sondas en línea y el cultivo y antibiograma convencional en cuanto a la detección de la resistencia a la isoniazida, a la rifampicina o a ambos medicamentos en muestras de esputo de enfermos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva y en cultivos de enfermos de tuberculosis con baciloscopia negativa o positiva, Perú, 2011-2013

	Rifampicina (IC del 95%) ^a	Isoniazida (IC del 95%)	Tuberculosis multirresistente (IC del 95%)
Muestras de esputo:			
% de sensibilidad	92 (90.0 – 93.6)	94 (93.1 – 95.5)	88 (85.5 – 89.8)
% de especificidad	92 (90.0 – 93.6)	92 (89.1 – 93.9)	95 (93.6 – 96.3)
% de VPP ^b	92 (90.4 – 93.8)	97 (95.7 – 97.6)	94 (92.6 – 95.7)
% de VPN ^c	92 (89.9 – 93.4)	86 (83.2 – 88.9)	90 (87.5 – 91.2)
Coefficiente κ	0.84 (0.82 – 0.86)	0.85 (0.82 – 0.87)	0.83 (0.81 – 0.86)
Cultivos:			
% de sensibilidad	95 (93.0 – 96.7)	96 (94.4 – 97.3)	90 (87.4 – 92.7)
% de especificidad	85 (80.0 – 88.0)	91 (83.4 – 95.8)	94 (91.0 – 96.1)
% de VPP	91 (88.8 – 93.5)	99 (97.8 – 99.5)	95 (93.1 – 97.0)
% de VPN	91 (87.2 – 93.9)	74 (65.0 – 81.3)	87 (83.7 – 90.5)
Coefficiente κ	0.81 (0.77 – 0.85)	0.79 (0.73 – 0.85)	0.83 (0.79 – 0.88)

Fuente: Cuadro elaborado por los autores a partir de los datos del estudio.

^a Intervalo de confianza del 95%.

^b Valor predictivo positivo.

^c Valor predictivo negativo.

pero inferiores al 86% cuando se evaluó en esputo y 74% cuando se evaluó en cultivo respecto de la isoniazida sola. Los coeficientes κ de todas las comparaciones se ubicaron en 0,81 o más cuando se usaron muestras de esputo y cultivo, a excepción de la isoniazida en cultivo, que se ubicó en 0,79.

DISCUSIÓN

Este estudio fue el primero realizado en el Perú con el propósito de comparar el desempeño del ensayo con sondas en línea con el cultivo y antibiograma en condiciones programáticas ordinarias. Desde que esta prueba molecular rápida fue incorporada en el Perú en el 2011, ha venido aumentando gradualmente su utilización. Hacia el 2013, más de un tercio de los enfermos de tuberculosis registrados habían sido sometidos al ensayo como prueba de tamizaje, ya sea a partir del material de cultivo de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar con baciloscopia negativa o de las muestras de esputo de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva. En términos generales, tanto la sensibilidad como la especificidad fueron similares y aceptables cuando se emplearon muestras de esputo o cultivos, si bien los resultados fueron algo mejores respecto de la isoniazida o la rifampicina solas que cuando se evaluaron juntos los dos medicamentos. Los coeficientes κ fueron, en todos los casos, de 0,81 o más, a excepción del estudio de la isoniazida en cultivo, lo que indica una excelente correlación en general.

El desempeño del ensayo con sondas en línea en este estudio programático fue inferior al observado hace cuatro años en condiciones experimentales de laboratorio, ocasión en la que el ensayo realizado a partir de muestras de esputo respecto a la rifampicina y a la isoniazida tuvo una sensibilidad y una especificidad del 96% y 98%, y del 97% y 96%, respectivamente (8). El ensayo experimental se había realizado en condiciones ideales: hubo un control estricto del tipo y volumen de la muestra de esputo y del tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y su recepción en el laboratorio. Este tipo de control de calidad no es posible en condiciones programáticas ordinarias.

¿Qué relación hay entre los resultados obtenidos en el Perú y los de estudios anteriores realizados en otros países? En Viet Nam (14) y Tailandia (15), en condiciones experimentales de laboratorio, se

obtuvieron valores de sensibilidad muy buenos y una especificidad del 100% al comparar el ensayo con sondas en línea con el cultivo y antibiograma. En la India, en condiciones programáticas ordinarias (16), se observaron resultados variables: en un centro de atención terciaria, la sensibilidad y la especificidad fueron excelentes, mientras que en tres laboratorios públicos los resultados no fueron tan buenos y la sensibilidad respecto de la isoniazida fue de solo de 72% (17). En cuanto a los resultados obtenidos en condiciones programáticas ordinarias en otros países, los valores de sensibilidad y especificidad observados en el Perú fueron peores que en Corea (18), similares a los de los estados Bálticos (19) y mejores que en China, Sudáfrica y Brasil (20-22). Tanto en China como en Sudáfrica, el coeficiente κ fue inferior a 0,81 (20, 21).

Hay varios factores que subyacen a las variaciones de desempeño del ensayo con sondas en línea que se observan entre los distintos países. En primer lugar, puede variar tanto el volumen como la calidad del esputo, lo que condiciona considerablemente el resultado. En segundo lugar, es preciso seguir atentamente las instrucciones del fabricante (por ejemplo, en relación con el proceso, el momento de realización, la secuenciación y el control de la temperatura), y los laboratorios que analizan volúmenes cuantiosos de muestras tienen mayores probabilidades de desempeñarse mejor que aquellos que procesan volúmenes más pequeños. En tercer lugar, es probable que los resultados falsos negativos tengan su origen en que la resistencia fenotípica detectada en el cultivo y antibiograma se deba a otras mutaciones farmacorresistentes menores que no se evalúan en la tira del ensayo con sondas o a mutaciones que todavía son desconocidas (23-25). Dada la gran variedad de cepas de *M. tuberculosis* que circulan actualmente por todo el mundo (26), también pueden surgir resultados falsos negativos debido a la presencia de mutaciones genéticas que son propias de cada lugar (27). En cuarto lugar, puede suceder que la mezcla de cepas (sensibles y resistentes) en un medio de cultivo que presente un crecimiento < 1% contenga genes mutantes que se considerarían farmacorresistentes según el ensayo con sondas en línea pero que, según el cultivo y antibiograma convencional, serían sensibles (es decir, un resultado falso positivo) (28). Las cepas sensibles contaminadas con el ADN de cepas resistentes también inducirían a

resultados falsos positivos. Por último, los valores predictivos dependen de la prevalencia de la farmacorresistencia en la comunidad evaluada: por ejemplo, una tasa elevada de tuberculosis multirresistente aumentaría el valor predictivo positivo del ensayo con sondas en línea.

Limitaciones

Las fortalezas de este estudio fueron el gran volumen de ensayos con sondas en línea realizados en el Perú en el período de tres años que duró el estudio, la participación del LRNM en las rondas anuales de garantía de la calidad externa de la Red Supranacional de Laboratorios para pruebas convencionales de susceptibilidad y la realización del ensayo con sondas en línea en condiciones estrictas conforme a las instrucciones de fabricante. En la ejecución y la notificación del desempeño del ensayo con sondas en línea también se respetó la iniciativa STARD (Directrices de comunicación sobre los estudios de precisión de pruebas diagnósticas) (13). Entre las limitaciones relacionadas con la naturaleza operativa del estudio realizado en condiciones programáticas ordinarias se encuentra la gran proporción de muestras que podrían haber servido a los fines comparativos pero que no lograron cultivar micobacterias o que se contaminaron. El estudio también se vio limitado por la naturaleza retrospectiva de la investigación, que derivó en que se aplicaran diferentes criterios durante la práctica corriente para seleccionar las cepas de *M. tuberculosis* o las muestras que se estudiarían con cultivo y antibiograma; por consiguiente, de las 12 620 muestras cuyo ensayo con sondas en línea revelaron susceptibilidad, solo se compararon 493 con los resultados del cultivo y antibiograma.

Conclusiones

Este estudio tiene varias implicaciones programáticas. En primer lugar, se desprende de sus resultados que tiene sentido ampliar el ensayo con sondas en línea a escala nacional debido a que este método permite obtener resultados con rapidez. En los centros de atención terciaria de la India y de Grecia, los resultados de este ensayo se obtuvieron al cabo de 48 horas de haber recibido las muestras de esputo (13, 21). Otros estudios también han demostrado que este método acelera el diagnóstico y el tratamiento de la

tuberculosis farmacorresistente (29, 30). Por consiguiente, la meta en el Perú debe apuntar a que todos los pacientes a los que se diagnostique tuberculosis tengan acceso a esta tecnología. En segundo lugar, es necesario sensibilizar y capacitar a los trabajadores de atención de salud sobre la calidad de la recogida de las muestras de esputo, así como capacitar y supervisar el desempeño del personal de laboratorio. Ya se han difundido directrices nacionales a tal efecto en todo el país (8). En tercer lugar, el cultivo y antibiograma convencional en medio de Löwenstein-Jensen y el método de las proporciones no siempre funcionan bien en el Perú, lo que torna necesario adoptar otro método de referencia comparativo que esté compuesto por menos pasos, esté menos expuesto a la contaminación y obtenga los resultados con mayor rapidez. Por último, el ensayo con sondas en línea permitirá detectar un número cada vez mayor de enfermos de tuberculosis multirresistente, dado que detecta el complejo de *M. tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina y a la isoniazida directamente en el esputo (siempre que este haya dado positivo en la baciloscopia) o bien indirectamente, en el cultivo. El programa nacional contra la tuberculosis tiene que garantizar que el suministro de medicamentos satisfaga la demanda creciente a fin de evitar el desabastecimiento y la interrupción del tratamiento.

En conclusión, los resultados de este estudio indican que el ensayo con sondas

en línea realizado con el propósito de detectar la farmacorresistencia es apropiado para el uso en condiciones de programa, por lo que está justificado ampliar su cobertura en el Perú y vincularlo a los esquemas estandarizados de tratamiento antituberculoso. Estos esquemas estandarizados quizá deban modificarse a fin de ofrecer un tratamiento más individualizado guiado por los resultados del cultivo y antibiograma.

Agradecimientos. Esta investigación se llevó a cabo mediante la Iniciativa de Capacitación Estructurada en Investigación Operativa (SORT IT, por sus siglas en inglés), una alianza mundial dirigida por el Programa Especial de Investigación y Capacitación de Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud (OMS/TDR). El modelo de capacitación se basa en un curso elaborado conjuntamente por la Unión Internacional contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias (The Union) y Médicos Sin Fronteras (MSF). El programa específico SORT IT que dio lugar a esta publicación fue desarrollado y ejecutado conjuntamente por el Programa de Investigación de Enfermedades Infecciosas y el Programa Regional de Control de la Tuberculosis, Organización Panamericana de la Salud (OPS); la Unidad de Investigación Operativa (LUXOR) del Centro Operativo de Bruselas de Médicos Sin Fronteras, Luxemburgo; el Centro de Investigación Operativa, The

Union, París (Francia); el Instituto de Medicina Tropical de Amberes (Bélgica) y la Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia).

Los autores también agradecen a Lely Solari, Alejandra Burela y Carlos Castañón del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú); a Antonieta Alarcón de la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis-Lepra (Lima, Perú) y a Rafael Van den Bergh de MSF por su asistencia inestimable en la ejecución del estudio.

Financiamiento. El programa SORT IT fue financiado por TDR/UNICEF/PNUD/Banco Mundial/OMS, OPS/OMS, The Union, MSF, la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), Adjudicación No. AID-LAC-IO-11-0000,1 y el Departamento para el Desarrollo Internacional (DPDI). Los financiadores no desempeñaron ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y análisis de los datos, la decisión de publicar ni la elaboración del artículo.

Conflicto de intereses. Ninguno declarado.

Declaración. Las opiniones expresadas en este manuscrito son responsabilidad del autor y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la *RPSP/PAJPH* y/o de la OPS.

REFERENCIAS

1. The World Bank. Data on Peru, 2010. Available from: <http://data.worldbank.org/country/peru> Consulta: 3 de febrero del 2016.
2. World Health Organization. *Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes*. 4th ed. Ginebra: OMS; 2009.
3. Organización Mundial de la Salud. *Informe mundial sobre la tuberculosis 2013. Sinopsis*. Ginebra: OMS; 2013.
4. Ministerio de Salud de Perú. *Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis-Lepra*. Sala Situacional 2013. Lima: Ministerio de Salud; 2013.
5. Asencios L, Quispe N, Mendoza-Ticona A, Leo E, Vásquez L, Jave O, et al. Vigilancia nacional de la resistencia a medicamentos antituberculosos, Perú 2005–2006. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2009; 26:278–287.
6. Ministerio de Salud de Perú. *Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectas por la tuberculosis*. Lima: MS; 2013.
7. 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 Infect Dis* 2005;5:62.
8. Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, et al. Prueba molecular genotipo MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogaresistente. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2012;29: 92–98.
9. Gaillard T, Fabre M, Martinaud C, Vong R, Brisou P, Soler C. Assessment of the SD Biline Ag MPT64 Rapid™ and the MGIT™ Tbc identification tests for the diagnosis of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70:154–156.
10. Instituto Nacional de Salud. Sistema informático de los laboratorios de salud pública nacional-NETLab: Base de datos tuberculosis y tuberculosis PR. En línea: <http://www.netlab.ins.gob.pe/FrmNewLogin.aspx>. Consulta: 29 de febrero del 2016.
11. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:2635–2640.
12. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159–174.
13. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwing LM, et al. Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Acad Radiol* 2003;10(6):664–669.
14. Huyen MN, Tiemersma EW, Lan NT, Cobelens FG, Dung NH, Sy DN, et al. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis in South Vietnam. *BMC Infect Dis* 2010;10:149.

15. Anek-Vorapong R, Sinthuwattanawibool C, Podewils LJ, McCarthy K, Ngamlert K, Promsarin B, *et al.* Validation of the GenoType MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. *BMC Infect Dis* 2010;10:123.
16. Yadav RN, Singh BK, Sharma SK, Soneja M, Srenivas V, Myneedu VP, *et al.* Comparative evaluation of GenoType MTBDRplus line probe assay with solid culture method in early diagnosis of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) at a tertiary care centre in India. *PLOS ONE* 2013;8:e72036.
17. Raizada N, Sachdeva KS, Chauhan DS, Malhotra B, Reddy K, Dave PV, *et al.* A multi-site validation in India of the line probe assay for the rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis directly from sputum specimens. *PLOS ONE* 2013;9:e88626.
18. Lyu J, Kim MN, Song JW, Choi CM, Oh TM, Lee SD, *et al.* GenoType MTBDRplus assay detection of drug-resistant tuberculosis in routine practice in Korea. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013;17:120-124.
19. Mironova S, Pimkina E, Kontsevaya I, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Skenders G, *et al.* Performance of the GenoType MTBDRplus assay in routine settings: a multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1381-1387.
20. Chen C, Kong W, Zhu L, Zhou Y, Peng H, Shao Y, *et al.* Evaluation of the GenoType MTBDRplus line probe assay on sputum-positive samples in routine settings in China. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014;18:1034-1039.
21. 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 Clin Microbiol* 2012;50:1189-1194.
22. Maschmann Rde A, Sa Spies F, Nunes Lde S, Ribeiro AW, Machado TR, Zaha A, *et al.* Performance of the GenoType MTBDRplus assay directly on sputum specimens from Brazilian patients with tuberculosis treatment failure or relapse. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1606-1608.
23. Jin J, Zhang Y, Fax X, Diao N, Shao L, Wang F, *et al.* Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay and identification of a rare mutation for improving MDR-TB detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16:521-526.
24. Gitti Z, Mantadakis E, Maraki S, Samonis G. GenoType MTBDRplus compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in a low-resistance locale. *Future Microbiol* 2011;6: 357-362.
25. Al-Mutari NM, Ahmad S, Mokaddas E. Performance comparison of four methods for detecting multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:110-115.
26. Nicol MP, Wilkinson LJ. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2008;102:955-965.
27. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2008;32: 1165-1174.
28. Hanekom M, Streicher EM, Van de Berg D, Cox H, McDermid C, Bosman M, *et al.* Population structure of mixed *Mycobacterium tuberculosis* infection is strain genotype and culture medium dependent. *PLOS ONE* 2013;8:e70178.
29. Jacobson KR, Theron D, Kendall EA, Franke MF, Barnard M, van Helden PD, *et al.* Implementation of GenoType MTBDRplus reduces time to multidrug-resistant tuberculosis therapy initiation in South Africa. *Clin Infect Dis* 2013; 56:503-508.
30. Hanrahan CF, Dorman SE, Erasmus L, Koornhof H, Coetzee G, Golub JE. The impact of expanded testing for multidrug resistant tuberculosis using GenoType MTBDRplus in South Africa: an observational cohort study. *PLOS ONE* 2012;7: e49898.

Manuscrito original en inglés recibido el 24 de julio del 2015. Aceptado para publicación, tras revisión, el 26 de octubre del 2015.

ABSTRACT

Use and evaluation of a line probe assay in patients with tuberculosis in Peru: 2011–2013

Objective. To determine the use and performance of a line probe assay (LPA) compared with conventional culture and drug sensitivity testing (CDST) in patients registered with tuberculosis (TB) under routine program conditions in Peru in 2011–2013.

Methods. This was a descriptive, operational research, cross-sectional study of sputum specimens from patients with smear-positive pulmonary TB and mycobacterial cultures from patients with smear-negative or positive TB. Drug resistance to rifampicin and/or isoniazid detected by LPA was compared to CDST. Sensitivity, specificity, and predictive values were calculated and reliability for detecting drug resistance was assessed through kappa coefficient, with values 0.61–0.80 showing substantial correlation, and 0.81 or above showing almost-perfect correlation.

Results. In 2011–2013, there were 16 169 LPA tests performed, with the proportion of TB patients receiving the test increasing from 3.2% to 30.2%. In all, 2 905 LPA test results were compared to CDST. For LPA in sputum specimens, sensitivity for rifampicin was 92%; isoniazid, 94%; and MDR-TB, 88%; while specificity for rifampicin was 92%; isoniazid, 92%; and MDR-TB, 95%. For LPA in mycobacterial cultures, sensitivity for rifampicin was 95%; isoniazid, 96%; and MDR-TB, 90%; while specificity for rifampicin was 85%; isoniazid, 91%; and MDR-TB, 94%. Kappa coefficients were at 0.81 or above for all comparisons of LPA with CDST using sputum specimens and cultures, except for isoniazid in cultures, which was at 0.79.

Conclusions. This study suggests that LPA is a reliable and rapid screening test for drug-resistant TB and should be considered suitable for routine use and scale up in Peru.

Key words

Mycobacterium tuberculosis; tuberculosis; tuberculosis, multidrug-resistant; molecular probes; molecular probe techniques; operations research; Peru.