

TRABAJO ORIGINAL

Evaluación comparativa del método automatizado BACTEC MGIT 960 con el método de las proporciones para determinar susceptibilidad a drogas antituberculosas en Chile

SILVANA PIFFARDI F.*, ANDREA LUNA H.*,
ANDREA SAKURADA Z.** y ROSARIO LEPE L.*

COMPARATIVE EVALUATION OF AUTOMATED BACTEC MGIT 960 FOR TESTING SUSCEPTIBILITY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TO ANTITUBERCULOUS DRUGS IN CHILE

*The automated BACTEC MGIT 960 system was compared with the method of proportion (MP) for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antituberculous drugs. 275 strains of *M. tuberculosis* isolated in Chile from 270 patients between 2001 and 2003 were tested. Concordance of BACTEC MGIT 960 with MP depending on the antituberculous drug tested was the following: 97.0% for streptomycin, 98,9% for rifampicin, 97,4% for isoniazid and 98,1% for ethambutol. Total resistance to antituberculous drugs of the 275 strains of *M. tuberculosis* tested varied from 20.4 % assessed by MP to 25.1% evaluated by BACTEC MGIT 960. These differences were not significant (p : ns; t test). BACTEC MGIT 960 yielded 17 strains as resistant. These same 17 strains were detected as sensitives by MP. Therefore, BACTEC MGIT overestimates the number of resistant strains. In our study BACTEC MGIT 960 showed a very good concordance with MP and besides it allowed to get the results in a much shorter period of time than MP. Additional analysis are needed to know the factors involved in BACTEC MGIT overestimation of resistant strains*

Key words: BACTEC MGIT ; method of proportion; *Mycobacterium tuberculosis*; resistance; antituberculous drugs

RESUMEN

*Se comparó el método automatizado BACTEC MGIT 960 con el método de las proporciones (MP) para la determinación de la susceptibilidad a drogas anti tuberculosas de 275 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de 270 pacientes en Chile entre 2001 y 2003. La concordancia del BACTEC MGIT 960 con el MP según las drogas estudiadas fue de: 97,0% para estreptomicina, 98,9% para rifampicina, 97,4% para isoniazida y 98,1% para etambutol. Los porcentajes globales de resistencia a drogas anti-TBC de las 275 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas, determinados por el BACTEC MGIT960 y el MP fueron de 25,1% y 20,4% respectivamente. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. El BACTEC MGIT 960 dió como resistentes 17 cepas que fueron sensibles por el MP, sobrestimándose*

* Sección Micobacterias, Instituto de Salud Pública de Chile.

** Microbiología, Hospital Clínico. Universidad de Chile.

por este método la información de cepas resistentes. El BACTEC MGIT 960 en nuestra experiencia presentó una muy buena concordancia con el MP permitiendo un notable acortamiento en el tiempo de obtención de los resultados. Sin embargo, la mayor determinación de cepas resistentes por parte de este método requiere de nuevos análisis que permitan conocer los factores que inciden en este fenómeno.

Palabras clave: BACTEC MGIT; método de las proporciones; *Mycobacterium tuberculosis*; resistencia; drogas antituberculosas.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TBC) persiste como problema de salud pública a nivel mundial. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que la TBC era una emergencia global¹.

En 2002 se diagnosticaron en Chile 3.016 casos nuevos de TBC de los cuales, 1.401 fueron tuberculosis pulmonares con baciloscopía positiva. Sin embargo, la enfermedad ha experimentado una disminución de sus tasas de morbilidad estimándose que para 2008-2010 se podría alcanzar el umbral de eliminación avanzada, es decir, tasas menores a 10×10^5 habitantes².

Mediante el uso del método de las proporciones (MP) de Canetti, Rist y Grosset³ se pudo determinar que en Chile en 2001 la resistencia inicial de *M. tuberculosis* a drogas anti-TBC fue de 10,8%; la multirresistencia (resistencia a isoniácida y rifampicina a la vez, con o sin resistencia simultánea a otras drogas esenciales) fue de 0,7%, y la resistencia global adquirida de 20,5%⁴.

El MP es considerado el método de referencia para estudios de resistencia inicial y secundaria a drogas anti-TBC, así como para determinar la susceptibilidad rutinaria de cepas de micobacterias que por norma lo requieren⁵. Es altamente reproducible, de elevada correlación clínica y de bajo costo. Su desventaja principal radica en la demora en la obtención de resultados: 60 a 90 días a partir de aislamientos primarios de *M. tuberculosis* y 28 días después de la obtención de primocultivos⁶.

Contar con métodos rápidos de determinación de la susceptibilidad a drogas anti-TBC es muy importante ya que permitiría cambiar el tratamiento y se podría disminuir la probabilidad de contagio de la población por cepas resistentes⁷. Han sido publicadas⁸ varias evaluaciones de estudios de susceptibilidad no automatizados usando el medio de cultivo MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) del laboratorio BBL⁹. En cambio, son escasas las publicaciones que usan este medio de cultivo y una metodología automatizada⁷.

El método de cultivo bacteriológico automatizado BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc.) permite obtener resultados de pruebas de susceptibilidad a drogas anti-TBC en un menor tiempo que el MP aunque, su implementación y uso es de mayor costo. A diferencia del BACTEC MGIT 460, el BACTEC MGIT 960 no ha sido ampliamente evaluado y presenta la ventaja considerable de ser un método no radioactivo⁷.

El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento comparativo del BACTEC MGIT 960 automatizado con el MP para determinar la susceptibilidad a drogas anti-TBC de 275 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Chile entre 2001 y 2003.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 275 cepas de *M. tuberculosis*, 77 correspondieron a cepas aisladas de pacientes antes tratados (recaídas y abandonos) y controles de tratamiento de más de cuatro meses (sospecha de fracaso) y 198 a pacientes vírgenes de tratamiento. Del total de cepas estudiadas, 230 se aislaron de muestras pulmonares, 36 de extrapulmonares (orina, contenido gástrico, lavado broncoalveolar, etc) y en 9 no se especificó su procedencia.

Los primocultivos efectuados en medio de Löwenstein-Jensen (L-J) fueron recolectadas por la red Nacional de Laboratorios de TBC y enviados a la sección Micobacterias del Instituto de Salud Pública de Chile entre 2001 y 2003. Las cepas H37RV y Sald (aislada en Chile de un paciente autóctono) se usaron como cepas de referencia para el MP

Las siguientes concentraciones críticas de drogas: estreptomycin (S) 4,0 $\mu\text{g/ml}$, isoniácida (H) 0,2 $\mu\text{g/ml}$, rifampicina (R) 40,0 $\mu\text{g/ml}$ etambutol (E) 2,0 $\mu\text{g/se}$ usaron en el MP⁵. Con el método automatizado BACTEC MGIT 960 las concentraciones críticas y altas fueron: S, 1,0 y 4,0 $\mu\text{g/ml}$; H, 0,1 y 0,4 $\mu\text{g/ml}$; R, 1,0 $\mu\text{g/ml}$; E, 5,0 y 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de acuerdo a lo descrito en el manual de instrucciones¹⁰.

Se prepararon inóculos de micobacterias tomando con asa colonias del primocultivo las que se transfirieron a un tubo de 17 x 100 mm que contenía aproximadamente 30 perlas de vidrio de 4 mm de diámetro previamente humedecidas. Se homogeneizó la suspensión bacilar en *vórtex* y se agregó dos veces 0,5 ml de agua destilada estéril, agitándola. Finalmente se adicionó 1 ml de agua destilada. Este preparado constituyó la suspensión madre para el estudio de susceptibilidad. Se ajustó la turbidez de las suspensiones bacilares a un patrón McFarland 0,5 en nefelómetro. Este inóculo se usó en ambos métodos.

La lectura de los estudios de susceptibilidad del MP se efectuó a los 28 días.

El método BACTEC MGIT 960 se procesó siguiendo las instrucciones del fabricante¹⁰. El instrumento entrega resultados automáticamente, utilizando un algoritmo que compara el crecimiento micobacteriano en el tubo que contiene antibiótico con el del tubo control e informa un resultado de sensibilidad o resistencia para cada droga anti-TBC.

La presencia de contaminación bacteriana en las suspensiones de las cepas de *M. tuberculosis* se verificó mediante cultivo de 0,15 ml de éstas, en placas de agar sangre.

El cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se realizó de acuerdo a lo descrito por Gwet¹¹.

RESULTADOS

La concordancia del BACTEC MGIT 960 con el MP según las drogas estudiadas fue de: 97,0% para S; 98,9% para R; 97,4% para H y 98,1% para E.

En la Tabla 1 se resume la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del método BACTEC MGIT 960 para las cuatro drogas de tratamiento anti-TBC de primera línea. Se puede observar que 3, 3, 6 y 5 cepas fueron informadas como resistentes por el BACTEC MGIT 960 y sensibles por el MP para S, R, H y E respectivamente. Discordancia inversa, es decir susceptibles por el BACTEC MGIT 960 y resistentes por el MP se observó sólo para S con cuatro cepas. La sensibilidad comparativa del BACTEC MGIT 960 con el MP fue de 100% excepto para S (83,3%) y la especificidad varió entre 97,6 y 98,9%. El menor VPP del BACTEC MGIT 960 se obtuvo en el estudio de la susceptibilidad de las cepas a E (44,4%) y el mayor fue para S (87,0%). Los VPN fueron de 100% con excepción de S que alcanzó el 98,4%.

Los porcentajes globales de resistencia a drogas anti-TBC de las 275 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas y determinados por el BACTEC MGIT960 y el MP fueron de 25,1% y 20,4% respectivamente. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al calcular el t de Student ($t = 1,05 < 1,96$ con 123 grados de libertad, $p = 0,148$).

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método BACTEC MGIT 960 para estudio de susceptibilidad a drogas anti-TBC de 275 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

| Droga* | Método de las Proporciones | BACTEC MGIT 960 | | | | VPP | VPN |
|--------|----------------------------|-----------------------|------------------------|----------------|-----------------|------|-------|
| | | Cepas resistentes (n) | Cepas susceptibles (n) | % sensibilidad | % especificidad | | |
| S | Resistente | 20 | 4 | 83,3 | 98,8 | 87,0 | 98,4 |
| | Susceptible | 3 | 248 | | | | |
| R | Resistente | 5 | 0 | 100,0 | 98,9 | 62,5 | 100,0 |
| | Susceptible | 3 | 267 | | | | |
| H | Resistente | 23 | 0 | 100,0 | 97,6 | 79,3 | 100,0 |
| | Susceptible | 6 | 246 | | | | |
| E | Resistente | 4 | 0 | 100,0 | 98,2 | 44,4 | 100,0 |
| | Susceptible | 5 | 266 | | | | |

* S: estreptomycin, R: rifampicina, H: isoniácida, E: etambutol

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo negativo.

Tabla 2. Tiempo empleado en realizar la prueba de susceptibilidad sola y asociada a crecimiento previo de 275 cepas de *M. tuberculosis* mediante BACTEC MGIT 960

| Tiempo (días) | Prueba de Susceptibilidad | | Crecimiento y Susceptibilidad | |
|---------------|---------------------------|------|-------------------------------|------|
| | n | % | n | % |
| 3 - 5 | 9 | 3,3 | 0 | 0,0 |
| 6 - 10 | 262 | 95,2 | 31 | 11,3 |
| 11 - 15 | 4 | 1,5 | 225 | 81,8 |
| 16 - 18 | 0 | 0,0 | 19 | 6,9 |

En la Tabla 2 se muestra el tiempo en días que se requirió para obtener los resultados de los estudios de susceptibilidad de las 275 cepas de *M. tuberculosis* mediante el BACTEC MGIT 960. Se puede apreciar que el 95,2% de los estudios demoró entre 6 y 10 días y cuando se adicionó el tiempo requerido para hacer crecer inicialmente las cepas de los primocultivos, el 81,8% demoró de 11 a 15 días.

Contaminación bacteriana se observó en ocho inóculos (tres en ambos métodos, cuatro solo en el BACTEC MGIT 960 y uno solamente en el MP). Estos estudios de susceptibilidad no fueron considerados en el análisis.

DISCUSIÓN

El aumento a nivel mundial de casos de TBC producidos por cepas multirresistentes así como la necesidad de contar con resultados rápidos de pruebas de susceptibilidad para drogas anti TBC ha incentivado la investigación de nuevos métodos de cultivo. En comparación con el cultivo tradicional en medios de L-J, el método BACTEC MGIT 960 ha mostrado buena sensibilidad, acortando el tiempo de detección de crecimiento micobacteriano a partir de muestras clínicas^{8,9}. Por otra parte, existen escasas publicaciones sobre el uso de este método automatizado para determinar la susceptibilidad a drogas anti-TBC de cepas de *M. tuberculosis*. Tortoli y colaboradores⁷ compararon el rendimiento del BACTEC MGIT 960 con el método radiométrico BACTEC 460TB estudiando 133 cepas y observaron una concordancia de 96,7%. En dicho estudio, el BACTEC MGIT 960 determinó un mayor número de cepas resistentes que el BACTEC 460TB. En nuestro trabajo también el BACTEC MGIT 960 detectó resistencia en 17 cepas que fueron sensibles por el MP y 4 con discordancia inversa solo a estreptomycin, so-

brestimándose la información de cepas resistentes, aunque la diferencia de los porcentajes globales de resistencia entre ambos métodos no fue estadísticamente significativa.

En resumen, el BACTEC MGIT 960 en nuestra experiencia presentó una muy buena concordancia con el MP en la determinación de la susceptibilidad a las drogas anti-TBC estudiadas, permitiendo un notable acortamiento en el tiempo de obtención de los resultados. Sin embargo, el hecho que el BACTEC MGIT 960 haya informado un mayor número de cepas resistentes que el MP requiere de nuevos análisis que permitan conocer los factores que producen este hecho.

AGRADECIMIENTOS

A Becton Dickinson de Chile por proveer reactivos y el equipo automatizado Bactec MGIT 960 para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- WHO. Tuberculosis Fact Sheet N° 104. Global Tuberculosis Programme. Geneva. World Health Organization, 1996.
- 2.- ZUÑIGA M. Chile inicia la primera etapa de la eliminación de la tuberculosis. Rev Chil Enf Respir 2000; 16: 105-10.
- 3.- CANETTI G, RIST N, GROSSET J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires pour le méthode des proportions. Rev Tuber (Paris) 1963; 27: 217-72.
- 4.- LUNA A, LEPE R, VELASCO M, PIFFARDI S, ARIAS F, IBARRA P. Evaluación de la red de laboratorios de tuberculosis de Chile. Instituto de Salud Pública de Chile. 2004.
- 5.- WHO. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva, World Health Organization (WHO/CDS/TB/2003.320), 2003.
- 6.- VALENZUELA P, PIFFARDI S, LEPE R, VELASCO M. Vigilancia de la resistencia a fármacos anti-tuber-

- culosis en Chile. Rev Chil Enf Respir 1997; 13: 182-90.
- 7.- TORTOLI E, BENEDETTI M, FONTANELLI A, SIMONETTI M. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol 2002; 40: 607-10.
 - 8.- PALACI M, UEKI S, SATO N, DA SILVA TELLES M A, CURCIO M, MATHEUS SILVA E A. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996; 34: 762-4.
 - 9.- TORTOLI E, CICHERO P, PIERSIMONI M, SIMONETTI T, GESU G, NISTA D. Use of BACTEC MGIT for recovery of mycobacteria from clinical specimens multicenter study. J Clin Microbiol 1999; 37: 3578-82.
 - 10.- BECTON DICKINSON MICROBIOLOGY SYSTEMS. BACTEC MGIT 960 System product and procedure manual. USA, 2001.
 - 11.- GWET K. Handbook of inter-rater reliability. How to estimate the level of agreement between two or multiple raters. Stataxis Publ. Co. USA, 2001; 46-75.