

ARTÍCULO ORIGINAL

Susceptibilidad de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* frente a drogas antimicobacterianas

Lic. Yoandy Fidel Rivero Pérez¹ , Dra. Silvia Mildestein Verdés¹ , Dra. Maidelys Mendoza Acosta¹ , Dra. Margarita Puerto Díaz² , Dra.C. Dihadenys Lemus Molina³ 

¹Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Villa Clara, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

²Hospital Provincial Universitario Cardiocentro “Ernesto Guevara”, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

³Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción: las infecciones causadas por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* constituyen la primera causa de muerte por un agente infeccioso; en los últimos años se ha asistido a la aparición y a la diseminación de cepas resistentes a múltiples drogas antimicobacterianas. **Objetivo:** determinar los patrones de susceptibilidad de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en pacientes de la Provincia de Villa Clara. **Métodos:** se realizó un estudio descriptivo retrospectivo que incluyó 116 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes de Villa Clara desde julio de 2015 a julio de 2018 con pruebas de susceptibilidad realizadas por el método de la nitrato reductasa y el de las proporciones y por métodos moleculares. **Resultados:** se encontró sensibilidad a isoniacida y a rifampicina en 105 cepas, se encontraron cuatro cepas multidrogosresistentes y una cepa extremadamente resistente. **Conclusiones:** las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en la Provincia de Villa Clara, mayoritariamente, muestran patrones de sensibilidad, un número pequeño es multidrogosresistente y es ínfimo el número de cepas extremadamente resistente. El reconocimiento de la baja prevalencia de estos últimos patrones es una herramienta para el control de su diseminación en la provincia.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; drogas antimicobacterianas; susceptibilidad

ABSTRACT

Introduction: the infections caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex are the first cause of death by an infectious agent; in recent years there has been the emergence and dissemination of strains resistant to multiple antimicrobial drugs. **Objective:** to determine the susceptibility patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in patients of the Villa Clara Province. **Method:** a retrospective descriptive study including 116 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Villa Clara patients from July 2015 to July 2018 was carried out with susceptibility tests performed by the nitrate reductase method, the proportions method and molecular methods. **Results:** sensitivity to isoniazid and rifampicin was found in 105 strains, four multidrug-resistant strains were found, as well as one extremely resistant strain. **Conclusions:** *Mycobacterium tuberculosis* strains

in Villa Clara Province mostly show sensitivity patterns, a small number is multidrug-resistant and the number of extremely resistant strains is negligible. The recognition of the low prevalence of these last patterns is a tool for the control of their dissemination in the province.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; antimicobacterial drug; susceptibility

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han descrito más de 170 especies de micobacterias, muchas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en el ser humano. Entre las infecciones que producen destaca la tuberculosis (TB), causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).⁽¹⁾

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud cerca de 10 millones de personas enfermaron de TB en 2017 y 1,3 millones fallecieron por su causa; la TB es la primera causa de muerte por un agente infeccioso. En los últimos años se ha asistido a la aparición y la diseminación de cepas resistentes a múltiples fármacos antituberculosos.⁽²⁾

En Cuba, en el año 2017, la tasa de incidencia fue de 5,9x100 000 habitantes.⁽³⁾

La vigilancia de la resistencia se lleva a cabo en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en TB, lepra y micobacterias (LNRI-TLM) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) de Ciudad de La Habana y su realización sistemática y oportuna ha puesto de manifiesto una baja prevalencia de tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR).⁽⁴⁾

El propósito de esta investigación es identificar los patrones de susceptibilidad de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en la Provincia de Villa Clara frente a las drogas antimicobacterianas. La información obtenida será de utilidad para enfrentar este problema de salud y servirá como guía de proyectos de intervención.

MÉTODOS

Se realizó en el Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la Ciudad de Santa Clara, Provincia de Villa Clara, un estudio descriptivo retrospectivo que incluyó cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en pacientes de la provincia de julio de 2015 hasta julio 2018. Se realizó un muestreo no probabilístico en el que se tuvieron en cuenta las 116 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que cumplieron con los criterios de inclusión al estudio.

Criterios de selección: Se aplicaron los siguientes criterios de selección a las cepas del género *Mycobacterium* obtenidas mediante cultivo con crecimiento de más de 20 colonias procedentes de muestras de pacientes de la Provincia de Villa Clara.

Criterio de inclusión: Cepas identificadas como *Mycobacterium tuberculosis* y con resultado de las pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas realizadas en el LNRI-TLM del IPK.

Criterio de exclusión: Cepas identificadas como micobacterias no tuberculosas, contaminadas y no viables (o ambos) y cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sin pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas.

Variables del estudio

Susceptibilidad por el método de la nitrato reductasa: el método de la nitrato reductasa (MNR) es una prueba de screening o de cribado, no comercial, que se basa en la capacidad del complejo *M. tuberculosis* para reducir los nitratos a nitritos. Mediante este método se evaluó la susceptibilidad a isoniacida y rifampicina.⁽⁵⁾ Variable cualitativa politómica. Se expresó en resistente o sensible.

Susceptibilidad por el método de las proporciones: método considerado el estándar de oro, consiste en medir la proporción de bacilos resistentes que existe en una cepa de *M. tuberculosis* en una concentración de la droga (concentración crítica) capaz de inhibir el crecimiento de células sensibles, pero no de las resistentes.⁽⁶⁾ Mediante el método de las proporciones (MP) se evaluó la susceptibilidad de las cepas que fueron resistentes por el MNR frente a los fármacos: rifampicina, isoniacida, estreptomina, amikacina, kanamicina, etambutol, capreomicina y ofloxacino. Variable cualitativa politómica. Se expresó en resistente o sensible.

Susceptibilidad por métodos moleculares: se emplearon los estuches comerciales Genotype MTBDR plus y Genotype MTBDRs/^(7,8) para determinar la susceptibilidad de las cepas resistentes por los métodos fenotípicos frente a rifampicina, isoniacida, fluoroquinolonas, drogas inyectables de segunda línea y etambutol. Variable cualitativa politómica. Se expresó en resistente o sensible.

Análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos de la base de datos de TB del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la Provincia de Villa Clara y almacenados y procesados en el software SPSS versión 15 para Windows. La información resultante de la elaboración primaria de los datos, así como de los resultados de las pruebas empleadas, se mostró en cuadros estadísticos para mejor interpretación.

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa sensibilidad a isoniacida y a rifampicina en 105 cepas; la resistente a rifampicina también lo fue a la isoniacida.

Tabla 1. Patrones de susceptibilidad mediante el método de la nitrato reductasa

Cepas	Drogas antituberculosas	
	Isoniacida	Rifampicina
105	S	S
10	R	S
1	R	R

R: resistente, S: sensible

Fuente: Base de datos de TB del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la Provincia de Villa Clara

Los cuatro patrones de susceptibilidad obtenidos mediante el MP se muestran en la tabla 2: cinco cepas solo fueron resistentes a la isoniacida.

Tabla 2. Patrones de susceptibilidad de cepas resistentes de *M. tuberculosis* mediante el método las proporciones

Cepas	Drogas antituberculosas							
	INH	RIF	STR	EMB	AMK	KAN	CAP	OFL
5	R	S	S	S	S	S	S	S
4	R	S	R	S	S	S	S	R
1	R	S	R	S	S	S	S	S
1	R	R	R	R	R	R	S	R

STR: estreptomycin, EMB: etambutol, AMK: amikacina, KAN: kanamicina, CAP: capreomicina, OFL: ofloxacino, R: resistente, S: sensible

Fuente: Base de datos de TB del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la Provincia de Villa Clara

En cuanto a los patrones de susceptibilidad identificados mediante los estuches comerciales Genotype MTBDR plus y MTBDRs/ en siete cepas se identificó mutación en los genes *katG* e *inhA* y se detectó, de esta forma, la resistencia genotípica a la isoniacida. En cinco cepas fueron detectadas mutaciones en los genes *ropB* y *gyrA* y mutaciones en los genes *rrs* y *embB* se evidencian en una cepa (tabla 3).

Tabla 3. Patrones de susceptibilidad obtenidos mediante métodos moleculares

Cepas	Mutaciones				
	Genes <i>katG</i> y <i>inhA</i>	Gen <i>ropB</i>	Gen <i>gyrA</i>	Gen <i>rrs</i>	Gen <i>embB</i>
4	R	R	R	S	S
4	S	S	S	S	S
2	R	S	S	S	S
1	R	R	R	R	R

R: resistente, S: sensible

Fuente: Base de datos de TB del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la Provincia de Villa Clara

DISCUSIÓN

Los métodos para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* juegan un papel primordial en el monitoreo de la resistencia de las cepas de *M. tuberculosis* que circulan.^(4,9) El complejo *M. tuberculosis* suele ser muy sensible a la isoniacida, lo que quedó demostrado en este estudio mediante el método de la nitrato reductasa.

La rifampicina se considera una de las mejores drogas para el tratamiento de la tuberculosis. Para que aparezca un mutante resistente a la rifampicina se necesitan entre 10^7 - 10^9 bacilos, por lo que se convierte en la droga que mayor tasa de mutación necesita y, por tanto, se hace más difícil la selección de mutantes resistentes.^(4,10)

La monorresistencia a la rifampicina es rara y más del 90% de las cepas resistentes a esta droga presentan, además, resistencia a la isoniacida; la resistencia a esta droga es un marcador de multidrogorresistencia (MDR), especialmente en países con una alta prevalencia de cepas resistentes.^(4,11)

Mediante el MNR en la presente investigación solo una cepa fue resistente a la rifampicina y a la isoniacida, lo que la define como una cepa MDR.

Raj y colaboradores,⁽¹²⁾ en la India, en tres años de estudio, informaron un 20,6% y un 14,7% de resistencia para la isoniacida y la rifampicina, respectivamente; utilizaron como método de susceptibilidad la concentración mínima inhibitoria. Los valores no coinciden con los alcanzados en la presente investigación en la que prevalece una mayor monorresistencia a la isoniacida que a la rifampicina.

El MP descrito por Canetti⁽¹³⁾ en la actualidad es la técnica de referencia por ser altamente reproducible, de elevada correlación clínica y de bajo costo. Los resultados alcanzados por este método se semejan a los informados por Sánchez y colaboradores⁽¹⁴⁾ en Ecuador, en los que los mayores por cientos de resistencia alcanzados fueron frente a la estreptomina y la isoniacida. En este estudio se obtuvo una cepa extremadamente resistente (XDR), resultado que difiere a los de estos autores.

Mediante los métodos moleculares se encontraron mutaciones simultáneas en los genes *katG*, *inhA* y *ropB* en cinco cepas definidas como multidrogorresistentes (resistencia a isoniacida y rifampicina). Una de estas cepas presentó mutaciones en los genes codificadores para las fluoroquinolonas y las drogas inyectables de segunda línea y mostraron genotipos extremadamente resistentes (XDR) y corroboraron el método de las proporciones.

CONCLUSIONES

Los estudios de susceptibilidad frente a las drogas antimicobacterianas permiten confirmar que la mayoría de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en la Provincia de Villa Clara muestran patrones de sensibilidad, solamente un número pequeño es multidrogorresistente e ínfimo el número de cepas extremadamente resistentes. El reconocimiento de la baja prevalencia de estos últimos patrones es una herramienta para el control de su diseminación en la provincia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcaide Fernández de Vega F, Esteban Moreno J, González Martín J, Palacios Gutiérrez JJ. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Micobacterias 9a. [Internet]. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2005 [citado 26 May 2018]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
2. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2017 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [citado 26 May 2018]. Disponible en:

https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2018_main_text_28Feb2019.pdf?ua=1

3. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario Estadístico de Salud 2017 [Internet]. La Habana: Minsap; 2018 [citado 26 May 2018]. Disponible en: <http://files.sld.cu/dne/files/2018/04/Anuario-Electronico-Espa%C3%B1ol-2017-ed-2018.pdf>
4. Lemus Molina D. Métodos rápidos para la detección de resistencia en Mycobacterium tuberculosis [tesis doctoral]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 2007 [citado 24 Abr 2016]. Disponible en: <http://tesis.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=91>
5. Angeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol [Internet]. 2002 Feb [citado 24 Abr 2016];40(2):553-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825971>
6. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. Bull World Health Organ [Internet]. 1969 [citado 24 Abr 2016];41(1):21-43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2427409/>
7. Hain Lifescience [Internet]. Nehren (DE): Hain Lifescience GmbH. Products. Genotype® MTBDRplus VER 2.0 – Your test system for a fast and reliable way to detect MDR-TB [citado 24 Apr 2016]. 2015 [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdplus.html>
8. Hain Lifescience [Internet]. Nehren (DE): Hain Lifescience GmbH. Products. Genotype® MTBDRs/ VER 1.0 and VER 2.0 – Your important assistance for detection of XDR-TB. 2016 [citado 24 Abr 2016]:[aprox 1 pantalla]. Disponible en: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdsl.html>
9. Heifets LB, Cangelosi GA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* a neglected problem at the turn of the century. Int J Tuberc Lung Dis [Internet]. 1999 Jul [citado 24 Abr 2016];3(7):564-81. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10423219>
10. Caminero Luna JA. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. Arch Bronconeumol [Internet]. 2001 [citado 24 Abr 2016];37:35-42. Disponible en: <https://www.archbronconeumol.org/es-pdf-S0300289601750053>
11. Palomino JC. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. Curr Opin Pulm Med [Internet]. 2006 May [citado 24 Abr 2016];12(3):172-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582671>
12. Raj Abraham P, Upadhyay P, Faujdar J, Gangane R, Gaddad SM, Sharma Vishnu D, et al. Drug susceptibility profiles of Mycobacterium tuberculosis isolates from Gulbarga, South India. Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis [Internet]. 2015 [citado 24 Abr 2016];64:933–937. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/82241561.pdf>
13. Canetti G, Rist N, Grosset J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria,

results and interpretation. Rev Tuberc Pneumol (Paris) [Internet]. 1963 Feb-Mar [citado 26 Jun 2018];27:217-72. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14018284>

14. Sánchez Chóez J, Granda Pardo JC, Medina Franco S, Kure Segura N, Antepara Sotomayor R. Sensibilidad a drogas de primera línea frente a cepas de M. tuberculosis del CRN Micobacterias, Guayas, 2016. INSPILIP [Internet]. 2018 [citado 26 Jun 2018];2(3):1-9. Disponible en: http://www.inspilip.gob.ec/wp-content/uploads/2019/03/Sensibilidad_drogas_d_-primera_l%C3%ADnea1.pdf

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

YFRP, MMA, SMV, y DLM: Diseñaron el estudio, analizaron los datos y redactaron la primera versión del manuscrito.

MPD: Estuvo implicada en la recogida, el proceso y el análisis estadístico de los datos. Todos los autores revisaron la redacción del manuscrito y aprobaron la versión finalmente remitida.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

Recibido: 13-12-2018

Aprobado: 14-5-2019

Yoandy Fidel Rivero Pérez. Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Villa Clara. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

vdmicrobiologia@infomed.sld.cu

<https://orcid.org/0000-0002-5802-5417>