

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURI"**  
**SUBDIRECCION DE MICROBIOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA-MICOLOGIA**  
**LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA E INVESTIGACIONES**  
**EN TUBERCULOSIS Y MICOBACTERIAS**

**Métodos rápidos para la detección de resistencia en**  
***Mycobacterium tuberculosis***

**Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias de La Salud**

**Autor:** Lic. Dihadenys Lemus Molina, MCs

**Tutor:** Dr. Ernesto Montoro Cardoso, Dr.C.

**Asesor:** Dr. Juan Carlos Palomino, Dr.C.

**CIUDAD DE LA HABANA**

**2007**

## SINTESIS

Debido a la necesidad de controlar la diseminación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes, nos propusimos evaluar métodos rápidos para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea. Se estudiaron 572 cepas de *M. tuberculosis*. La resistencia a rifampicina se determinó mediante los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina), método de nitrato reductasa (MNR), INNOLipa\_Rif.TB, tubo indicador de crecimiento para micobacterias, BACTEC-460 y el ensayo de amplificación de fagos (EAF); además se evaluaron los ensayos colorimétricos y el método de nitrato reductasa para detectar resistencia a las 4 drogas antituberculosas de primera línea (isoniacida, estreptomycin, etambutol y rifampicina). El Método de las Proporciones se empleó como referencia. Los resultados estuvieron disponibles entre las 48 horas y los 14 días alcanzándose los mejores resultados para isoniacida y rifampicina. Se evidenció las ventajas de los métodos no convencionales (EAF, métodos colorimétricos y MNR) como una alternativa rápida y de fácil ejecución para la detección de cepas multidrogorresistentes en laboratorios de escasos recursos. De esta forma, el Centro Colaborador de Tuberculosis, dispone de novedosas herramientas que permitirán enfrentar los nuevos desafíos de la tuberculosis no sólo en Cuba sino en países de la región.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>I.1.</b> Introducción	<b>1</b>
<b>I.2.</b> Hipótesis	<b>4</b>
<b>I.3.</b> Objetivos	<b>5</b>
<b>I.4.</b> Novedad científica	<b>6</b>
<b>I.5.</b> Valor teórico	<b>6</b>
<b>I.6.</b> Valor práctico	<b>7</b>
<b>II. REVISION BIBLIOGRAFICA</b>	<b>9</b>
<b>II.1.</b> Situación actual de la tuberculosis	<b>9</b>
<b>II.2.</b> Taxonomía y características generales de las micobacterias	<b>11</b>
<b>II.3.</b> La envoltura celular de las micobacterias	<b>13</b>
<b>II.4.</b> Mecanismo de acción y de resistencia de las principales drogas empleadas en el tratamiento de la tuberculosis.	<b>15</b>
<b>II.4.1.</b> Estreptomycin	<b>17</b>
<b>II.4.2.</b> Isoniacida	<b>18</b>
<b>II.4.3.</b> Pirazinamida	<b>19</b>
<b>II.4.4.</b> Rifampicina	<b>20</b>
<b>II.4.5.</b> Etambutol	<b>21</b>
<b>II.5.</b> Origen de la resistencia en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<b>23</b>
<b>II.6.</b> Métodos empleados en los estudios de susceptibilidad a las drogas antituberculosas	<b>27</b>
<b>II.6.1.</b> Métodos convencionales	<b>29</b>
<b>II.6.2.</b> Métodos rápidos	<b>30</b>
<b>II.6.2.1.</b> Métodos genotípicos	<b>30</b>
<b>II.6.2.2.</b> Métodos fenotípicos	<b>34</b>
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>40</b>
<b>III.1.</b> Evaluación de métodos rápidos para la detección de resistencia a la rifampicina	<b>41</b>

<b>III.2.</b> Aplicación del ensayo de amplificación de fagos para la detección de resistencia a la rifampicina.	<b>50</b>
<b>III.3.</b> Evaluación del método de la nitrato reductasa y los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina) para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea.	<b>52</b>
<b>III.4.</b> Utilización del método de la nitrato reductasa para la vigilancia de la resistencia de <i>M. tuberculosis</i> .	<b>54</b>
<b>III.5.</b> Participación en un proceso de garantía de la calidad de los ensayos colorimétricos y el método de la nitrato reductasa.	<b>54</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>IV.1.</b> Evaluación de métodos rápidos para la detección de resistencia a la rifampicina	<b>57</b>
<b>IV.2.</b> Aplicación del ensayo de amplificación de fagos para la detección de resistencia a la rifampicina.	<b>60</b>
<b>IV.3.</b> Evaluación del método de la nitrato reductasa y los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina) para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea.	<b>62</b>
<b>IV.4.</b> Utilización del método de la nitrato reductasa para la vigilancia de la resistencia de <i>M. tuberculosis</i> .	<b>69</b>
<b>IV.5.</b> Participación en un proceso de garantía de la calidad de los ensayos colorimétricos y el método de la nitrato reductasa.	<b>70</b>
<b>V. DISCUSION</b>	<b>73</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>98</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>100</b>
<b>VIII.1.</b> Referencias bibliográficas	<b>100</b>
<b>VIII.2.</b> Producción científica de la autora relacionada con el tema de la tesis	<b>122</b>
<b>VIII.3.</b> Producción científica de la autora no relacionada con el tema de la tesis	<b>123</b>
<b>VIII.4.</b> Presentación en eventos científicos	<b>124</b>
<b>ANEXOS</b>	

## ABREVIATURAS

AA: Alamar azul

ABC: Area bajo la curva

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

ATCC: Colección de cultivos tipo americana

ATP: Trifosfato de adenosina

CFB: Concentración fraccionaria bactericida

CFI: Concentración fraccionaria inhibitoria

CFX: Ciprofloxacina

CLS: Cicloserina

CMB: Concentración mínima bactericida

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CPM: Capreomicina

DMF: Dimetilformamida

*DOTS*: Tratamiento acortado estrictamente supervisado

EAF: Ensayo de amplificación de fagos

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EMB: Etambutol

*GFP*: Proteína de fluorescencia verde

HDF: Formación de *heteroduplex*

INH: Isoniacida

LJ: Löwenstein-Jensen

KNM: Kanamicina

LNR-TB-IPK: Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

MAA: Microensayo alamar azul

MDR: Multidrogorresistentes

*MGIT*: Tubo indicador de crecimiento para Micobacterias

MNR: Método de la nitrato reductasa

MP: Método de las proporciones

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio  
NAD: Dinucleótido de nicotinamida adenina  
NADH: Dinucleótido reducido de nicotinamida adenina  
NBT/BCIP: Nitroazul de tetrazolio/fosfato dipotásico de 5-bromo-4cloro-3-indol  
OADC: Acido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
OPS: Organización Panamericana de la Salud  
PAS: Acido para-aminosalicílico  
pb: Pares de bases  
PBS: Solución salina fosfato  
PNC: Programa nacional de control  
PZA: Pirazinamida  
RCP: Reacción en cadena de la polimerasa  
RES: Resazurina  
RIF: Rifampicina  
ROC: Curva de las características operativas para el receptor  
SDS: Duodecil sulfato de sodio  
SHA: Sulfato de hierro amoniacal  
SSCP: Polimorfismo conformacional de simple cadena  
STR: Estreptomina  
TB: Tuberculosis  
UFP: Unidades formadoras de placas  
UICter: Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias  
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana  
XDR: Extremadamente resistente  
XTT: 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio-5-carboxinilide

## I. INTRODUCCION

### I.1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad muy antigua. Se han reportado lesiones de posible etiología tuberculosa en huesos de momias egipcias que datan de 3 700 años antes de nuestra era. Sin embargo, no fue hasta 1882, que el Dr. Robert Koch, logró el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de esta entidad clínica. Desde entonces, disímiles esfuerzos se han hecho por contrarrestar a este patógeno. Hace más de 50 años se dispone de la quimioterapia antituberculosa con drogas altamente eficaces como la isoniacida (INH) y la rifampicina (RIF) y desde 1963, fue descrita la prueba de referencia para los estudios de susceptibilidad a las drogas antituberculosas [método de las proporciones (MP)], sin embargo, la TB, no puede considerarse una enfermedad del pasado, ya que provoca cada año la muerte a más de un millón de personas (Canetti *et al.*, 1963; Canetti *et al.*, 1969; World Health Organization, 2004).

La persistencia de la TB está asociada a varios factores, entre los que se destacan los problemas socioeconómicos y el descuido de los Programas de Control, la crisis económica mundial, el aumento de la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el creciente aumento de la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas (Marrero *et al.*, 1999; Rieder, 1999; Bastian y Portaels, 2000; Enarson *et al.*, 2000; Wade y Zhang, 2004); en este sentido, la circulación de cepas multidrogorresistentes (MDR), resistentes al menos a la INH y la RIF, las dos drogas más importantes del tratamiento y la reciente aparición de las cepas extremadamente resistentes (XDR), cepas MDR con resistencia añadida a alguna fluoroquinolona y a una de las tres drogas inyectables de segunda línea [amikacina, kanamicina (KNM) y capreomicina (CPM)], vuelven aún más difícil y costoso el control de esta enfermedad, la que pudiera llegar a ser incurable (Caminero, 2001; Centers for Disease Control and Prevention, 2006<sup>a,b</sup>; Masjedi *et al.*, 2006).

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la TB como una emergencia sanitaria mundial y partir de 1994, el Programa Mundial de TB de la OMS y la Unión Internacional contra TB y Enfermedades Respiratorias (UICTER) inició un proyecto mundial para la vigilancia de la resistencia a las drogas antituberculosas, que ha permitido estimar la existencia de alrededor de 50 millones de personas infectadas con cepas MDR alrededor del mundo, siendo la media de prevalencia en casos nuevos del 1,1% (rango 0-14,2%) y entre los casos previamente tratados 7,0% (rango 0-58,3%) (World Health Organization, 2004; World Health Organization, 2005). Esta situación, que hasta hace muy poco tiempo era considerada tan solo el comienzo de una epidemia de consecuencias impredecibles, tiene en la actualidad una mayor repercusión debido a la aparición de las cepas XDR. De esta forma se ha hecho un llamado a nuevas investigaciones encaminadas a buscar nuevos métodos de diagnóstico, nuevos medicamentos y nuevas vacunas (Farga, 2004; Centers for Disease Control and Prevention, 2006<sup>a,b</sup>).

El tratamiento de los casos activos de TB constituye el componente más importante del programa de control de esta enfermedad. Es por esto que contar con métodos diagnósticos que brinden resultados confiables de la susceptibilidad es de gran utilidad para evaluar la calidad del tratamiento antituberculoso (Heifets y Cangelosi, 1999; Schluger, 2001). Los métodos de susceptibilidad *in vitro* juegan un papel fundamental en el monitoreo de la resistencia de las cepas que circulan y en la selección de la terapia adecuada en pacientes infectados con cepas MDR (Heifets y Cangelosi, 1999). Las técnicas convencionales como el MP, el método de las concentraciones absolutas y el método del cociente de resistencia se basan en el crecimiento de las micobacterias en medios de cultivo que contienen las drogas antituberculosas y usualmente requieren varias semanas para que se obtengan los resultados (Heifets, 2000).

La introducción del sistema radiométrico BACTEC-460 y su adaptación en los estudios de susceptibilidad en *M. tuberculosis*, sentó las bases en el desarrollo de

métodos rápidos de detección de la resistencia. Este sistema es empleado actualmente en numerosos países del mundo, principalmente en los desarrollados o en laboratorios de referencia con una costosa inversión de recursos que impide su utilización de forma rutinaria (Heifets y Cangelosi, 1999; Palomino, 2000).

Recientes avances en el campo de la Biología Molecular y progresos en el estudio de las bases moleculares de la resistencia proveen herramientas útiles para la detección rápida de cepas MDR pero desafortunadamente, debido a los costos que involucra la implementación de estas técnicas, se hace imposible su empleo en países de limitados recursos económicos, en muchos de los cuales la TB y la MDR constituyen un importante problema de salud (Palomino, 2000).

A finales del siglo pasado se desarrollaron métodos alternativos para la detección de resistencia en *M. tuberculosis*. Algunos de ellos como los ensayos colorimétricos MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio) y resazurina (RES), el método de la nitrato reductasa (MNR) y el ensayo de amplificación de fagos (EAF) han mostrado muy buena correlación con los métodos convencionales y prometen ser una interesante opción para las pruebas de susceptibilidad dado lo simple que resulta su aplicación y la rápida disponibilidad de los resultados (Abate *et al.*, 1998; McNerney *et al.*, 2000; Ängeby *et al.*, 2002; Palomino *et al.*, 2002).

En Cuba se realiza el estudio longitudinal de vigilancia de la resistencia, en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNR-TB-IPK), paralelo al Programa Nacional de Control (PNC), desde el año 1975 (Valdivia *et al.*, 1982) y además, se dispone de trabajos previos realizados por Valdivia y Suárez-Méndez (1968) y González *et al.*, (1974). De esta forma, fue factible la adopción de los nuevos criterios recomendados por la OMS y participar en los tres estudios mundiales de vigilancia de la resistencia, dándose a conocer a nivel internacional que en Cuba el fenómeno de la resistencia no constituye un problema. Nuestro país

obtuvo en el tercer estudio mundial cifras de resistencia combinada de 6,1% y una MDR de 0,5% (World Health Organization, 2004; Montoro *et al.*, 2006).

No obstante, dada la compleja situación epidemiológica que presenta la TB y tomando en consideración que el LNR-TB-IPK rige como Centro Colaborador de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) / OMS en la región de las América, se hace necesario contar con métodos rápidos de detección de resistencia que brinden resultados confiables de la susceptibilidad y permitan enfrentar los retos que esta enfermedad imponga. Por todo esto, mediante el presente estudio nos propusimos evaluar varios métodos que permiten determinar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* mediante el empleo de indicadores tempranos del metabolismo celular.

## **I.2. Hipótesis**

La incorporación en el LNR-TB-IPK de métodos alternativos para la detección rápida de resistencia a las drogas antituberculosas, permitirá disponer de herramientas útiles para el estudio de la susceptibilidad de *M. tuberculosis*.

### I.3. Objetivos

#### Objetivo general:

- Evaluar métodos rápidos para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea.

#### Objetivos específicos:

1. Evaluar los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina), el método de la nitrato reductasa, el tubo indicador de crecimiento para micobacterias y el INNOLipa\_Rif.TB para detectar la resistencia de *M. tuberculosis* a la rifampicina.
2. Aplicar el ensayo de amplificación de fagos para detectar la resistencia a la rifampicina en *M. tuberculosis*.
3. Evaluar el método de la nitrato reductasa y los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina) para la detección de la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas de primera línea.
4. Utilizar el método de la nitrato reductasa para la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*.
5. Participar en un proceso internacional de garantía de la calidad de los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina) y el método de la nitrato reductasa para la detección de la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas de primera línea.

#### **I.4. Novedad científica**

La novedad científica de este trabajo esta dada por el abordaje de las nuevas tecnologías para el estudio de la resistencia de *M. tuberculosis* en el LNR-TB-IPK. Los resultados alcanzados han contribuido a elevar el conocimiento en el tema de la resistencia y a su vez dan respuesta a los términos de referencia del Centro Colaborador OPS/OMS. De esta forma el LNR-TB-IPK dispone de varios métodos rápidos que permiten un mejor enfrentamiento a la problemática de la TB no sólo en Cuba sino en países de la región de las América.

#### **I.5. Valor teórico**

El presente documento muestra los resultados alcanzados por el LNR-TB-IPK a punto de partida de la incorporación de metodologías no convencionales para la detección rápida de la resistencia de *M. tuberculosis*. El valor teórico del mismo radica en los aportes que brinda para la detección rápida de cepas resistentes de *M. tuberculosis* en nuestro país lo cual trasciende a nivel internacional con los trabajos publicados (7). Dos de los objetivos de esta tesis se encuentran publicados en una revista de alto impacto (*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*), constituyendo los primeros artículos donde se evalúan por primera vez varios métodos simultáneamente. En el primero de los artículos anteriormente referidos, se incluyen los resultados de la aplicación de 7 métodos para la detección de resistencia a la RIF y en el segundo artículo, se muestran los resultados de 4 métodos para la detección de resistencia a las 4 drogas antituberculosas de primera línea.

Los resultados incluidos en este trabajo han recibido los siguientes reconocimientos: Resultados Relevantes del IPK (2002, 2004, 2006), Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (2004), Resultado Relevante Municipal y Provincial del XV y XVI Forum de Ciencia y Técnica (2003, 2005), premio en el XXXIII Congreso

Nacional de Microbiología, México (2002). Además han constituido tema de tres tesis de Maestría en Bacteriología-Micología (2002, 2003, 2005).

### **I.6. Valor práctico**

Los resultados obtenidos mediante el presente trabajo permiten que el LNR-TB-IPK disponga de nuevas tecnologías, rápidas y de elevada sensibilidad y especificidad para la detección de cepas de *M. tuberculosis* MDR. Recientemente, uno de los métodos evaluados (MNR) fue incorporado a la vigilancia de la resistencia que se realiza sistemáticamente y punto de partida de los resultados alcanzados, se recomendó a través de la Red Supranacional de Laboratorios / OPS, el empleo de este método en otros laboratorios de la región. De esta forma el LNR-TB-IPK, como Centro Colaborador OPS/OMS, cuenta con eficaces herramientas que permitirán un mejor enfrentamiento a la problemática que esta enfermedad reemergente pudiera ocasionar no sólo en Cuba sino en otros países, donde la MDR constituye un grave problema de salud.

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA

### II.1. Situación actual de la TB

En 1993 la OMS declaró la TB como una emergencia sanitaria mundial. Varios factores, entre los que se destacan los socioeconómicos y el abandono de los programas de control determinaron este fenómeno. El impacto de la pandemia del VIH y la MDR han agravado esta situación (Marrero *et al.*, 1999; Rieder, 1999; Enarson *et al.*, 2000; Marrero *et al.*, 2000; Palomino, 2005). En la actualidad una tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* (1 722 millones de personas). Se estima que para el año 2020 alrededor de 1 000 millones de personas podrían contraer la infección, 200 millones desarrollar la enfermedad y unos 35 millones morir a causa de ésta (Bastian y Portaels, 2000; Rigouts y Portaels, 2001; World Health Organization, 2004). En América Latina se producen anualmente entre 250-300 mil nuevos casos y entre 20-25 mil muertes (Guevara *et al.*, 2003). El tratamiento de la MDR con drogas de segunda línea, las que son menos eficaces, más tóxicas y más caras, se encuentra en estos momentos amenazado con la aparición de las cepas XDR (Centers for Disease Control and Prevention, 2006<sup>a,b</sup>; Masjedi *et al.*, 2006).

Todo lo anteriormente descrito convierte a la TB en una de las enfermedades transmisibles de mayor importancia. Afortunadamente, se han realizado grandes esfuerzos por controlar esta enfermedad que es curable, siempre y cuando se detecte a tiempo y se mantenga al paciente bajo un régimen de tratamiento estricto (Guevara *et al.*, 2003; Montoro, 2004). Según recomendaciones de la OMS, la principal estrategia para el control de la TB, además del apoyo político y financiero de los gobiernos, es la implementación del tratamiento acortado estrictamente supervisado (*DOTS*, en inglés), el monitoreo y la evaluación de los PNC usando las normas estándares internacionales (World Health Organization, 2000; World Health Organization, 2001<sup>a,b</sup>).

En Cuba la evolución de la TB desde 1971 a 1991, muestra una tendencia descendente como resultado de la lucha contra esta enfermedad, el fortalecimiento del Sistema Nacional de Salud y las transformaciones socioeconómicas operadas en el país (González *et al.*, 1995; Marrero y Carreras, 1996; World Health Organization, 2000). La tendencia de la morbilidad en el período comprendido entre 1982-1991 refleja un descenso del 5%, cifra que nos situó entre los países con una baja incidencia (Marrero *et al.*, 1999).

Entre 1992-1994, la tasa de incidencia de TB se incrementó desde una tasa de 5,0-14,3 x 100 000 habitantes. Este incremento ocurrió como consecuencia de un fenómeno multicausal asociado a una probable subestimación de casos en el período comprendido entre 1988-1992, que generó fuentes contagiosas en la comunidad, un incremento considerable del retardo del diagnóstico desde la consulta médica inicial hasta el comienzo del tratamiento antibacilar (56,9 días en 1993), a reactivaciones endógenas en adultos de la tercera edad, así como problemas de operación del PNC de la TB debido a dificultades económicas. En 1995 se logró detener este ascenso, iniciándose una declinación en el número de casos (Marrero *et al.*, 1999; Marrero *et al.*, 2000). La tasa registrada en el 2005 fue de 6,5 x 100 000 habitantes. La mortalidad en los últimos 5 años no ha tenido variaciones significativas y se ha mantenido en tasas de 1 x 100 000 habitantes (Montoro *et al.*, 2006).

En el tercer estudio mundial de vigilancia de la resistencia, Cuba reportó valores de MDR de 0,3% en casos nuevos (resistencia primaria) y 2,6% en pacientes con antecedentes de tratamiento previo (resistencia adquirida), poniéndose de manifiesto que la resistencia no constituye un problema de salud en el país (World Health Organization, 2004; Montoro *et al.*, 2006). El fenómeno de coinfección VIH/TB no ha constituido un factor significativo en el curso de la TB en Cuba; esta asociación representa, aproximadamente entre el 1-2% de los casos de TB notificados anualmente (Marrero *et al.*, 1999; MINSAP, 2001).

## II.2. Taxonomía y características generales de las micobacterias

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente al género *Mycobacterium*, único de la familia Mycobacteriaceae, perteneciente al orden Actinomycetales. En el esquema de clasificación de Bergey, dicha familia se incluye dentro del grupo de bacilos aerobios grampositivos, donde se encuentran además, la familia Corynebacteriaceae y las Nocardioformes (incluye a los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*) (Rastogi *et al.*, 2001).

El género *Mycobacterium* incluye más de cien especies que se dividen en tres grupos: Complejo Tuberculosis, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG), *M. africanum* y *M. microti* (Casal, 1990; Leão *et al.*, 2004); recientemente fueron identificadas tres subespecies de *M. tuberculosis*: *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 1999; Aranaz *et al.*, 2003), *M. canettii* (Pfyffer *et al.*, 1998) y *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003). El otro grupo está formado por el Complejo Lepra, que incluye *M. leprae* y *M. leprae-murinum*, causantes de la lepra en el hombre y en el ratón respectivamente; y un grupo de especies denominadas micobacterias "no tuberculosas", donde se incluyen el resto de las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores, las que pueden ser patógenas verdaderas, patógenas oportunistas o saprófitas. Además de su capacidad de infectar al hombre, estos microorganismos son también una de las grandes causas de infección de diversos animales domésticos y salvajes (Rastogi *et al.*, 2001). La fuente natural de estos microorganismos es el suelo, el agua, los alimentos y algunos animales (Casal, 1990; Montoro *et al.*, 2001; Leão *et al.*, 2004).

Las micobacterias son consideradas bacilos ácido alcohol resistentes por presentar resistencia a la decoloración con alcohol ácido al 3% durante la tinción de Ziehl-Neelsen. Esta resistencia se cree que dependa de la integridad de la cubierta de cera. Morfológicamente, son bacilos o cocobacilos ligeramente curvos o rectos, en

pocas ocasiones ramificados, miden entre 0,4x3,0  $\mu\text{m}$ , no esporulan, no tienen flagelos ni cápsulas. (Brooks *et al.*, 1999; Montoro *et al.*, 2001; Montoro, 2003).

Las micobacterias forman más de una clase de colonias. Estas pueden ser rugosas, color hueso crema, elevadas, convexas, de bordes irregulares, con bacilos densos y compactos (*M. tuberculosis*), o pueden ser lisas y transparentes, con bacilos sin agrupaciones discernibles (*M. intracellulare*), o de aspereza intermedia (*M. kansasii*). Las colonias de algunas especies (*M. xenopi* y algunas de crecimiento rápido) forman extensiones filamentosas frágiles ramificadas, otras extensiones pueden penetrar en el medio y hasta proyectarse en el aire. En dependencia de la producción de pigmento se dividen en: fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmentos), escotocromógenas (forman pigmento en presencia o ausencia de luz) y no cromógenas (no producen pigmentos) (Roberts *et al.*, 1991; Montoro, 2003).

Las micobacterias son microorganismo aerobios estrictas y obtienen la energía de la oxidación de compuestos sencillos del carbono. Tienen una velocidad de crecimiento mucho más lenta que la mayoría de las bacterias, *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación de 18 horas, por lo que necesita de 3-4 semanas de incubación a 37°C para formar colonias visibles macroscópicamente (Brooks *et al.*, 1999). Las formas saprófitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan bien entre 22-37°C, producen más pigmento y son menos ácido resistente que las formas patógenas (Roberts *et al.*, 1991; Brooks *et al.*, 1999). Hasta el presente, no se ha logrado obtener el crecimiento *in vitro* de *M. leprae*; en los modelos murinos esta especie crece lentamente y requiere entre 20-30 días para dividirse y una temperatura óptima de 30°C (Sasseti *et al.*, 2003; Leão *et al.*, 2004).

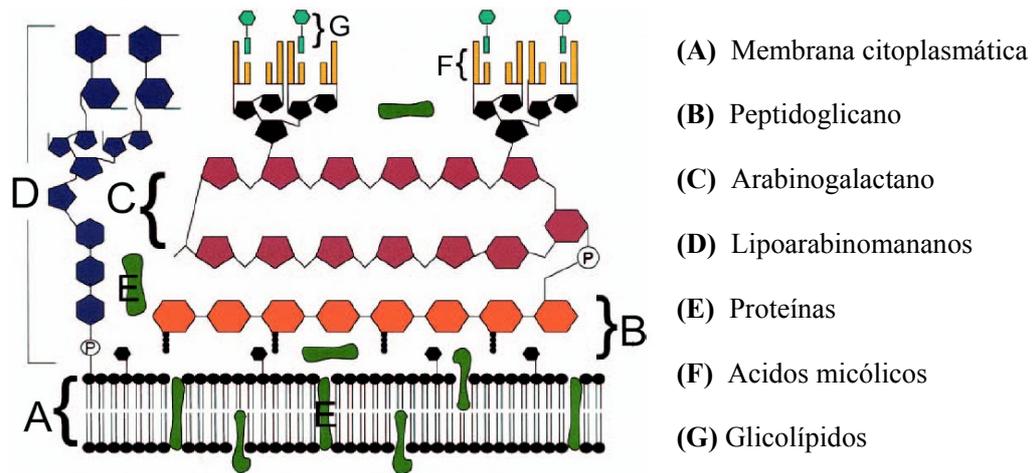
### II.3. La envoltura celular de las micobacterias

Las micobacterias, se consideran diferentes del resto de las bacterias, debido a la particular estructura y composición química de su pared celular (Skerman *et al.*, 1980). La envoltura celular de las micobacterias, al igual que la de las bacterias grampositivas y gramnegativas incluye la membrana citoplasmática que está formada por una bicapa lipídica rodeada por un espacio periplasmático y cantidades variables de peptidoglicano, siendo este último el responsable de la forma celular (Parsons *et al.*, 1997; Brennan, 2003).

La estructura más original de la célula micobacteriana es su pared celular, una estructura con múltiples capas, de aproximadamente 20 nm de espesor. Químicamente, la pared es muy compleja y bien diferente a la que presentan las bacterias grampositivas y gramnegativas. Al igual que en los otros grupos bacterianos está formada por cadenas de polisacáridos y similar a las bacterias gramnegativas, presentan lípidos externos. Contiene, además, abundantes lípidos complejos, algunos de los cuales son exclusivos de las micobacterias y producen marcados efectos biológicos sobre el huésped. Presenta una capa de peptidoglicano, arabinogalactano (complejo polisacárido covalentemente unido al peptidoglicano, formado por unidades de arabinosa y galactosa) y ácidos micólicos (Draper, 1991; Rastogi, 1991; Montoro *et al.*, 2001; Brennan, 2003; Montoro, 2003).

Los ácidos micólicos, uno de los componentes más distintivos de la pared micobacteriana, son largas cadenas de ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono, perpendiculares a la superficie de la célula, presentan pocos dobles enlaces, lo cual le confiere la hidrofobicidad a la capa y la convierte en una efectiva barrera contra la penetración de nutrientes hidrofílicos y antibióticos (Draper, 1991; Rastogi, 1991; Parsons *et al.*, 1997; Montoro, 2003).

La siguiente figura muestra una representación esquemática de la pared celular de las micobacterias (Besra y Chatterjee, 1994; Brennan y Nikaido, 1995; Karakousis *et al.*, 2004):



La porción más externa de la pared micobacteriana está compuesta por glucósidos fenólicos, glicolípidos (principalmente trehalosa unida a las fracciones de ácidos micólicos) y glicopeptidolípidos (Grange, 1996). Otros componentes lipídicos importantes son los lipoarabinomananos, los cuales se extienden desde la membrana citoplasmática hasta la superficie celular y cuya estructura parece jugar un papel importante en la patogenicidad de *M. tuberculosis* (Besra y Chatterjee, 1994; Brennan, 2003; Montoro, 2003; Karakousis *et al.*, 2004).

Los canales en la pared celular micobacteriana son de naturaleza protéica, y constituyen una ruta de entrada de pequeñas moléculas de antibióticos hidrofílicos como la INH. Las moléculas grandes hidrofóbicas como la RIF y los macrólidos se disuelven en la fase lipídica y se ponen en contacto con la fase acuosa en el interior de la célula. El paso a través de la bicapa lipídica juega un papel importante en la penetración de solutos debido a que la ruta hidrofílica es ineficiente. Muchas de las drogas efectivas contra micobacterias muestran hidrofobicidad variable, estudios

*in vitro* han demostrado que los derivados hidrofóbicos de aminoglucósidos son más activos contra *M. tuberculosis* que la mayoría de los derivados hidrofílicos (Rastogi y David, 1993; Nikaido, 1994; Brennan y Nikaido, 1995; Barry y Mdluli, 1996; Montoro, 2003; Karakousis *et al.*, 2004).

#### **II.4. Mecanismo de acción y de resistencia de las principales drogas empleadas en el tratamiento de la TB.**

El tratamiento de la TB se basa en conceptos muy distintos al resto de las otras infecciones bacterianas debido a que *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en períodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo cual dificulta la acción de los antimicrobianos (Wayne, 1994; Coll, 2003).

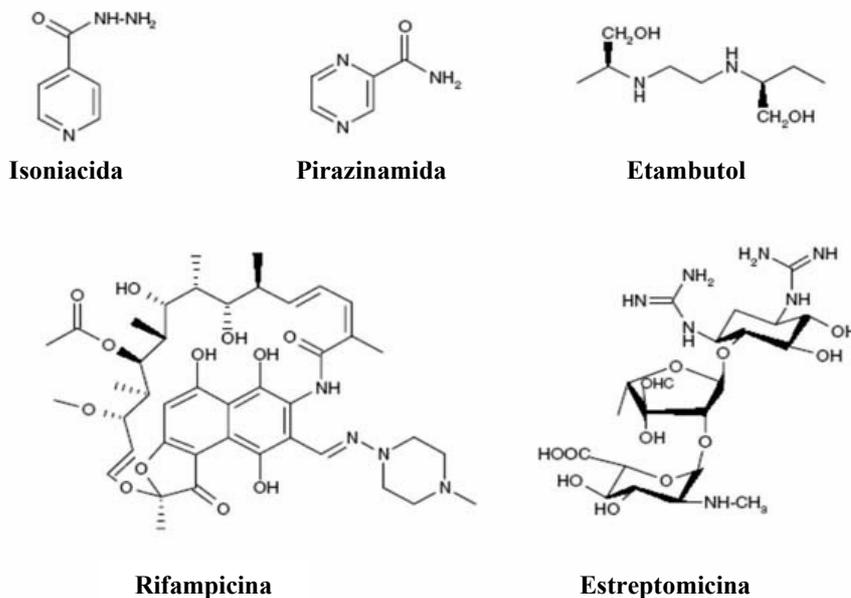
Para indicar el tratamiento se debe tener presente que existen poblaciones de bacilos diferentes en función de su localización y actividad. Así, los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio; los del interior de los macrófagos lo hacen en un ambiente ácido microaerofílico que induce la latencia, y los que se encuentran en el interior del *caseum* tienen sólo ocasionalmente un ciclo replicativo (crecimiento intermitente). Además, *M. tuberculosis* puede multiplicarse en los tejidos, donde la penetración de las drogas antituberculosas es fácil o, bien, encontrarse en las cavidades pulmonares, pus o material caseoso, sitios donde la penetración de éstas resulta más difícil. Finalmente, hay que señalar que el pH del material caseoso y el del interior de los macrófagos es muy bajo, lo cual condiciona la actividad de las distintas drogas (Gillespie, 2002), las que presentan un perfil de actividad diferenciado frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones, siendo necesario asegurarse de que el tratamiento prescrito sea activo frente a todas ellas (Coll, 2003).

Las micobacterias presentan una resistencia natural a varias drogas, por el hecho de poseer una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos (Brennan y Nikaido, 1995; Parsons *et al.*, 2004; De Rossi *et al.*, 2006); por ello, el tratamiento de la TB se realiza con drogas específicas (con actividad antituberculosa). También se han descrito enzimas modificantes como las betalactamasas (Kwon *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 2004) o sistemas de eflujo que conllevan a la resistencia (Cole *et al.*, 1998; Viveiros *et al.*, 2003; Parsons *et al.*, 2004; Colangeli *et al.*, 2005; De Rossi *et al.*, 2006).

El tratamiento efectivo de la TB se basa en la aplicación sistemática de la terapia multidroga directamente supervisada que asegura, en los casos no complicados, una tasa de curación superior al 95% y tiene como objetivos: curar al paciente, evitar que el paciente fallezca de una TB activa o de sus consecuencias, evitar la recaída y disminuir la transmisión a otras personas. El éxito de este tratamiento se basa en la asociación de fármacos nunca antes empleados en dicho paciente para evitar la selección de células resistentes (Coll, 2003).

Los fármacos de primera línea incluyen: la INH, la RIF, la pirazinamida (PZA), el etambutol (EMB) y la estreptomina (STR). Existen también otros fármacos de segunda línea o de reciente desarrollo que constituyen, alternativas para el tratamiento de aquellos pacientes infectados con cepas resistentes. Los principales grupos son: los aminoglucósidos, polipéptidos, fluoroquinolonas, etionamida (ETH), cicloserina (CLS) y ácido para-aminosalicílico (PAS) (Centers for Disease Control and Prevention, 2006<sup>a</sup>).

En la siguiente figura se muestra la estructura química de las drogas antituberculosas de primera línea (Zhang, 2005):



#### II.4.1. Estreptomicina

El descubrimiento de la STR revolucionó el desarrollo de drogas antituberculosas; ésta fue introducida en 1944 para el tratamiento de la TB (Duncan, 2003). La STR, al igual que otros aminoglucósidos, interfiere en la síntesis de proteínas procarióticas, produce errores de lectura en el código genético como son la inhibición de la iniciación y la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica durante la transcripción del ARN (ácido ribonucleico) mensajero (Parsons *et al.*, 1997; Coll, 2003). La proteína S12, una subunidad del ribosoma 30S, es el principal blanco de la STR (Rastogi y David, 1993; Wade y Zhang, 2004; Zhang, 2005).

La resistencia a esta droga está asociada a mutaciones cromosómicas que afectan a los genes *rpsL* o *rrs* que codifican para la subunidad protéica S12 y el ARNr 16S, respectivamente (Nair *et al.*, 1993; Telenti, 1998; Drobniowski y Wilson, 1998; Gillespie, 2002). Aislamientos con bajos niveles de resistencia a la STR pueden no mostrar mutaciones en estos marcadores y presentar alteraciones en la permeabilidad celular que afecta la incorporación de la STR al interior de la célula (Parsons *et al.*, 1997).

#### II.4.2. Isoniacida

La INH es una droga sintética introducida en la terapéutica a partir de 1952, tiene efecto un bactericida frente a *M. tuberculosis* y los otros miembros del complejo TB, mientras que su empleo en el tratamiento de otras micobacterias es muy limitado (Coll, 2003; Duncan, 2003).

La INH es una pre-droga que requiere para su activación del complejo micobacteriano catalasa-peroxidasa, siendo la susceptibilidad a la INH dependiente de la presencia de esta enzima, codificada por el gen *katG*. El derivado activo de la INH bloquea la síntesis de ácidos micólicos (Cohen *et al.*, 2003; Wade y Zhang, 2004; Zhao *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que mutaciones en el gen *katG* ofrecen altos niveles de resistencia a la INH en el 22-64% de los casos (Parsons *et al.*, 1997; Somoskövi *et al.*, 2001; Zhang, 2005). La mutación más comúnmente encontrada es en Ser315Thr; esta variante manifiesta una capacidad reducida de activación de la pre-droga y la mitad de la actividad catalasa de las cepas salvajes (Cohen *et al.*, 2003).

Si la enzima catalasa-peroxidasa se encuentra intacta, el derivado activo de la INH bloquea la síntesis de los ácidos micólicos. Una de las dianas intracelulares del derivado activo sería la reductasa de la proteína transportadora de ácidos grasos acilenólicos codificada por el gen *inhA*. En aproximadamente el 25% de las cepas resistentes se producen mutaciones en la región *inhA* y suelen asociarse a una resistencia de bajo nivel. La mayor parte de estas mutaciones se han descrito en la región reguladora del gen y originan una sobreexpresión de la enzima que compensa la acción inhibitoria de la droga (Vilcheze *et al.*, 2000; Wade y Zhang, 2004; Zhang, 2005; Leung *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006).

La resistencia a la INH también puede deberse a mutaciones en el gen *ndh* que codifica para la enzima NADH deshidrogenasa. Mutaciones en este gen producen

un incremento del cociente dinucleótido reducido de nicotinamida adenina / dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH/NAD<sup>+</sup>). Estos altos niveles de NADH inhiben competitivamente la unión de INH-NAD al sitio activo de la enzima InhA (proteína que adiciona el NADH necesario para la elongación de los ácidos grasos y biosíntesis de ácidos micólicos). Además, como NADH es sustrato de las enzimas KatG y AphC, altos niveles de NADH pueden competitivamente inhibir la peroxidación de la INH por KatG (Lee *et al.*, 2001).

Sólo el 10-20% de las cepas resistentes a la INH no presentan alteraciones en los genes *katG* o *inhA*. Se han encontrado otros genes involucrados en la resistencia a esta droga como el *ahpC* (alquil hidroperoxidorreductasa), *kasA* (cetoácido sintasa), *ceoA* (UDP galactopiranososa reductasa), *mabA* (3-cetoacil reductasa), *oxyR*, *acpM* y *furA*, aunque queda por determinar el papel exacto de las alteraciones encontradas en estos genes y su relación con la resistencia a la INH (Blanchar, 1996; Wilson y Collins, 1996; Parsons *et al.*, 1997; Drobniewski y Wilson, 1998; Lee *et al.*, 2001; Somoskövi *et al.*, 2001; Gillespie, 2002; Coll, 2003; Leung *et al.*, 2006).

#### **II.4.3. Pirazinamida**

La PZA fue descubierta en 1952 y constituye una de las drogas de primera línea más importantes en el tratamiento de la TB (Zhang, 2005). Esta droga es un análogo de la nicotinamida y difunde al interior de la célula por transporte pasivo (Somoskövi *et al.*, 2001).

La PZA es una pre-droga que es convertida en su forma activa (ácido pirazinoico) por acción de la enzima micobacteriana pirazinamidasa cuando el pH extracelular es ácido. Debido a los ineficientes mecanismos de eflujo, se produce en el citoplasma de *M. tuberculosis* una acumulación de ácido y por tanto una disminución del pH que trae como consecuencia afectaciones del potencial de membrana y se produce la muerte bacteriana (Zhang., 2005).

El 72-97% de los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a la PZA tienen afectada usualmente, la actividad de la pirazinamidasasa, enzima que es codificada por el gen *pncA*; aunque también, la resistencia puede deberse a afectaciones durante la incorporación de la droga (Scorpio y Zhang, 1996; Somoskövi *et al.*, 2001).

Durante el tratamiento la PZA ejerce, junto a la RIF, un efecto esterilizante. Esta droga actúa sobre los bacilos en estado de latencia que persisten en el ambiente ácido de los macrófagos (Heifets y Lindholm-Levy, 1990). Los estudios de susceptibilidad *in vitro* con esta droga se han visto limitados debido a que el ambiente ácido que ella necesita para ejercer su efecto bactericida dificulta el crecimiento de *M. tuberculosis* (Martin *et al.*, 2006<sup>a</sup>).

#### **II.4.4. Rifampicina**

La RIF es un derivado semisintético de la rifamicina B, es una droga de amplio espectro que fue introducida en la terapéutica en el año 1967 y se ha convertido en una droga de primera línea en el tratamiento de la TB. Es altamente efectiva contra *M. tuberculosis* y difunde fácilmente a través de la envoltura celular (Parsons *et al.*, 1997; Wade y Zhang, 2004). La actividad de la RIF, junto con la inclusión de la PZA en los esquemas terapéuticos, permitió disminuir a seis meses el tratamiento de la TB no complicada. La RIF tiene un efecto bactericida sobre las células metabólicamente activas de *M. tuberculosis* y también sobre las bacterias en estado de latencia (Coll, 2003).

La RIF es un potente inhibidor de la síntesis de ARN mensajero, y por tanto, de la transcripción genética; su mecanismo de acción primario el bloqueo del paso de elongación dependiente de ácido desoxirribonucleico (ADN) que es llevado a cabo por la enzima ARN polimerasa de los procariontes. La RIF ejerce su acción al fijarse a la subunidad  $\beta$  de dicha enzima, codificada por el gen *rpoB*; mutaciones en este gen generan altos niveles de resistencia a la RIF (Parsons *et al.*, 1997;

Chopra y Brennan, 1998; Williams *et al.*, 1998<sup>b</sup>; Somoskövi *et al.*, 2001; Coll, 2003).

Más del 96% de las cepas resistentes a la RIF presentan mutaciones que ocurren dentro de la porción central del codón 27 del gen *rpoB*. A pesar de que se han descrito 35 variantes alélicas distintas, con ligeras variaciones en su distribución geográfica, las mutaciones más comunes (65-86%) son las que afectan al codón His526 o Ser531 y dan lugar a una resistencia de alto nivel (Telenti *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1994; Schluger, 2001; Somoskövi *et al.*, 2001; Gillespie, 2002). Los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a la RIF que no contienen mutaciones en el gen *rpoB* son raros. En estas cepas, la resistencia puede deberse a mutaciones fuera de esta región, particularmente en la región amino terminal (Somoskövi *et al.*, 2001), así como cambios en la permeabilidad de la membrana que afectan la incorporación de la droga (Parsons *et al.*, 1997; Schluger, 2001; Coll, 2003; Zhang, 2005).

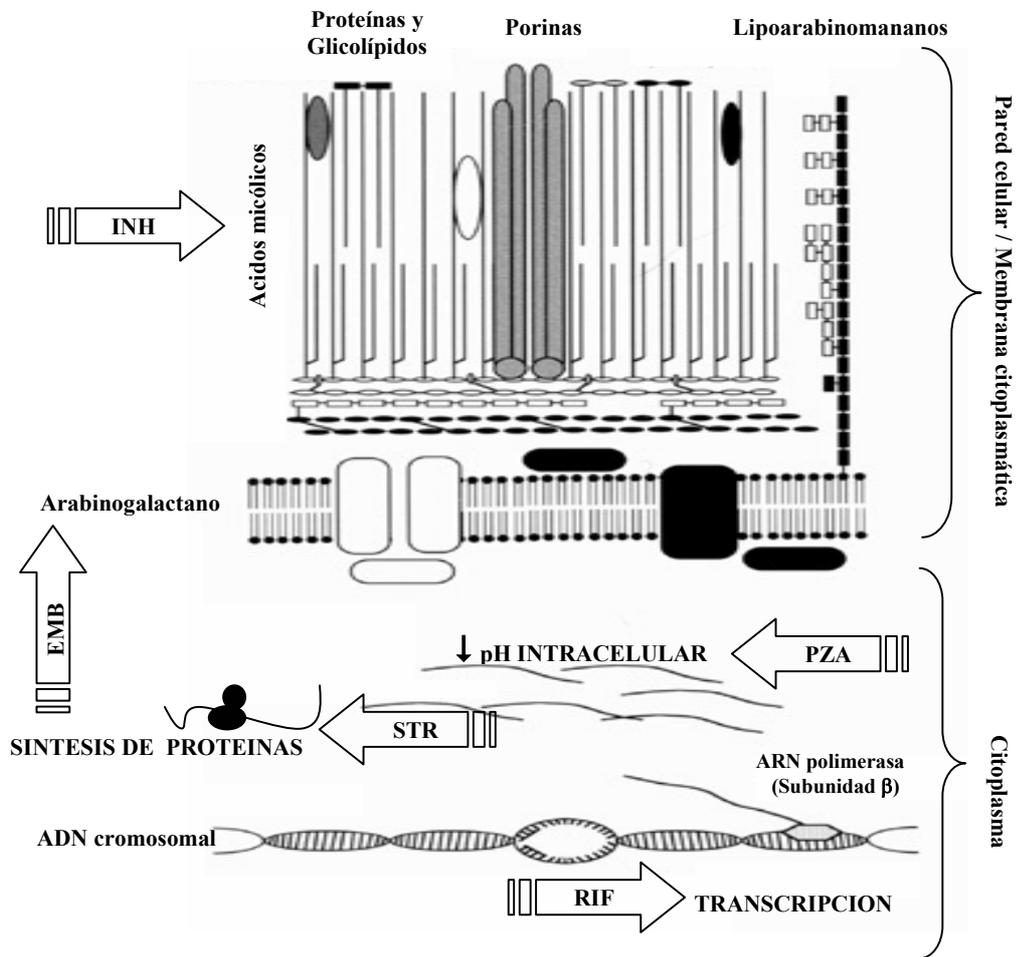
#### **II.4.5. Etambutol**

El EMB es un derivado de la etilendiamina. Los primeros tratamientos con esta droga datan de 1968 (Duncan, 2003). Es una droga activa frente a cepas metabólicamente activas de *M. tuberculosis*. Tiene una actividad variable sobre las demás especies de micobacterias de crecimiento lento y su actividad es mucho menor en las especies de crecimiento rápido (Telenti *et al.*, 1997).

El EMB bloquea la incorporación de los ácidos micólicos al arabinogalactano o un paso en la biosíntesis de arabinogalactanos y lipoarabinomanano lo que provoca una inhibición de la biosíntesis de la pared micobacteriana. La inhibición de la síntesis de este componente por el producto del operón *embABC* (arabinosil transferasa) podría explicar la acumulación de ácidos micólicos y sus efectos sobre la permeabilidad de la pared celular (Blanchar, 1996; Sreevatsan *et al.*, 1997; Gillespie, 2002; Coll, 2003; Wade y Zhang, 2004).

Es de gran importancia el sinergismo entre el EMB y la STR cuando ambos se combinan durante el tratamiento; el EMB en su acción desestabilizadora de la pared micobacteriana produce pequeños poros que favorecen que la STR penetre al interior celular (Chopra y Brennan, 1998).

La siguiente figura muestra el sitio de acción de la INH, la STR, el EMB, la RIF y la PZA (Parsons *et al.*, 1997; Somoskövi *et al.*, 2001):



### II.5. Origen de la resistencia en *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* es uno de los más fieles exponentes de la presión selectiva a la que han sido sometidas muchas especies, mostrando una capacidad de adaptación a medios adversos realmente insuperable, fenómeno que muestra dos excelentes evidencias, una puramente microbiológica y la otra con connotaciones epidemiológicas. Esta última resulta clara al comprobar cómo en las últimas décadas *M. tuberculosis* ha ido desplazándose en el mundo hasta afectar fundamentalmente a las poblaciones más vulnerables del planeta, o sea, se ha trasladado hacia aquellos lugares donde las condiciones de extrema pobreza (hacinamiento, desnutrición, falta de recursos sanitarios, entre otras), le aportan condiciones favorables para su perpetuación. Esto se comprueba al evidenciarse que el 95% de los casos de enfermedad y muerte por este patógeno ocurren en los países más pobres y poblados de la tierra (Caminero, 2001).

La evidencia microbiológica tan sólo ha podido seleccionarse en las últimas 3-4 décadas, cuando la presión selectiva de las drogas antituberculosas ha permitido descubrir una de las tantas herramientas que *M. tuberculosis* tenía guardada para defenderse de la agresión humana. Así, sólo hasta la introducción de las drogas al tratamiento de la TB, pudo comprobarse que dentro de la enorme población de microorganismos que tiene un enfermo, muchos de ellos presentan mutaciones genéticas que los hacen comportarse como resistentes. Estaba surgiendo la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas, fenómeno que se ha convertido en el último decenio en uno de los mayores obstáculos que las organizaciones internacionales identifican para controlar esta descontrolada enfermedad (Caminero, 2001).

La resistencia en *M. tuberculosis* surge, en primer lugar, por mutaciones genéticas espontáneas. En toda población de células sensibles, existe una pequeña proporción de mutantes resistentes por cada generación, que varía en dependencia de la droga a

la cual se manifieste la resistencia. Cuando una única droga es utilizada en el tratamiento de la TB, la mayoría de los bacilos, sensibles a ésta, son inhibidos o muertos, pero se favorece la selección de mutantes resistentes a la droga empleada. Además, como el tratamiento es a largo plazo debido a que la población bacteriana es elevada, las células mutantes resistentes continúan su multiplicación y se tornan en mayoría (Caminero, 2001; Montoro, 2003; Parsons *et al.*, 2004).

Actualmente, se acepta que en un cultivo salvaje de *M. tuberculosis* aparece, por mutación espontánea, un microorganismo resistente a la INH por cada  $10^5$ - $10^7$  bacilos, tasa igual a la encontrada para el EMB, la STR, la KNM y el PAS. La aparición de mutantes resistentes a la RIF es menos frecuente ( $10^7$ - $10^9$  bacilos), en cambio puede ser muy elevada ( $1 \times 10^3$ ) para la ETH, la CLS, la CPM, la viomicina, la tiacetazona y la embiomicina, y de  $1 \times 10^2$ - $10^4$  para la PZA (Riska *et al.*, 2000). Se sabe que la mutación de los bacilos es independiente para cada una de las drogas, por lo que la posibilidad de que se presenten asociadas es igual al producto de sus tasas respectivas de mutación (Caminero, 2001).

Por tanto, toda monoterapia (real o encubierta por asociación con fármacos previamente resistentes e ineficaces) llevará al fracaso y a la selección de resistencia. De esta forma, la asociación de fármacos nunca usados en el enfermo (o que se hayan utilizado asociados adecuadamente) debe ser la primera premisa que ha de tenerse en cuenta en el tratamiento de la TB, hecho relativamente fácil de seguir si se trata de un paciente inicial, pero que se torna a veces difícil de realizar cuando un enfermo ha recibido previamente varios esquemas terapéuticos (Caminero, 2001; Montoro, 2003).

Según lo expuesto previamente, existirían tres conceptos completamente diferentes de resistencias. El primero de ellos sería la denominada “resistencia natural”, que es aquella que presentan las cepas salvajes, como fruto de su multiplicación continua que hace que, al alcanzar un determinado número de bacilos, se produzca una

mutación genética en un bacilo concreto, mutación que puede afectar específicamente al lugar donde interviene alguna de las drogas. Pero esta resistencia natural debe ser seleccionada por la droga para que se exprese fenotípicamente. Cuando esto se produce por una mala terapéutica (monoterapia real o encubierta) se da lugar a la “resistencia en casos previamente tratados“, denominada hasta hace algunos años como “resistencia adquirida”, que siempre tendrá detrás de sí una mala actuación por parte de la especie humana, ocasionándose por una inadecuada prescripción del tratamiento por parte del médico, o por una mala adherencia del paciente al tratamiento (Caminero, 2001; Montoro, 2003; Parsons *et al.*, 2004).

Si un paciente portador de una resistencia adquirida contagia a un individuo que no había recibido con anterioridad tratamiento antituberculoso, le podrá ocasionar una TB con una resistencia, denominada “resistencia en casos nuevos“, anteriormente definida como “resistencia primaria”, por presentarse en individuos que nunca antes han sido tratados (Caminero, 2001; World Health Organization, 2004).

Como se ha expresado, las alteraciones de los genes intrínsecos es el mecanismo primario del desarrollo de la resistencia en *M. tuberculosis*, pues esta ocurre independientemente del contacto previo del bacilo con las drogas. El tipo de resistencia más frecuentemente encontrado, en otras especies de bacterias, ha sido la adquisición de nuevos determinantes de resistencia llevados a cabo por elementos genéticos móviles como son: secuencias de inserción, plásmidos y transposones. Ninguno de estos elementos ha sido encontrado en *M. tuberculosis* como transmisor de resistencia de una cepa a otra (Hatfull, 1996; Caminero, 2001).

La probabilidad de la transferencia de elementos genéticos que confieren resistencia a las drogas antituberculosas, al interior de *M. tuberculosis* parece ser remota, pues esta especie sobrevive poco tiempo fuera del hospedero, además rara vez se han

identificado bacterias que porten genes de resistencia antimicrobiana junto a *M. tuberculosis*, en los profundos nichos pulmonares. Sin embargo, la TB en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, es una infección diseminada con bacilos moviéndose hacia todas las partes del organismo; por lo que es importante el desarrollo de estudios para una mejor administración de antibióticos en humanos, especialmente cuando existe la potencialidad de transferencia de genes que codifican resistencia desde otros géneros bacterianos hacia el interior de este peligroso patógeno (Parsons *et al.*, 1997; Picardeu y Vincent, 1997).

Otros factores pueden influir en la emergencia de la resistencia. Aunque *M. tuberculosis* se replica activamente *in vivo*, tiene un tiempo de generación prolongado y la tendencia a desarrollar períodos de latencia. Estas variaciones en el metabolismo hacen más difícil la terapia antituberculosa. Además, la penetración de los antibióticos a los diferentes tejidos varía significativamente, alcanzando en algunos concentraciones subóptimas que favorecen la selección de mutantes resistentes. Por tanto, la influencia individual de cada paciente al desarrollo de la resistencia también debe ser considerada, quedando aún por dilucidar muchos de los factores que contribuyen a la emergencia de este fenómeno.

La resistencia cruzada puede ocurrir entre las drogas químicamente relacionadas o que tienen sitios de acción similares dentro de la célula. Se ha señalado que entre el 70-90% de las cepas resistentes a la RIF, muestran también resistencia a rifabutin y algunos aislamientos resistentes a la INH se comportan de igual forma frente a la ETH; sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la resistencia cruzada entre la INH y la PZA, drogas análogas de la nicotinamida (Parsons *et al.*, 2004).

## II.6. Métodos empleados en los estudios de susceptibilidad a las drogas antituberculosas

Los métodos de susceptibilidad *in vitro* juegan un papel primordial en el monitoreo de la resistencia a las drogas antituberculosas y en la selección de la terapia en pacientes infectados con cepas MDR (Heifets y Cangelosi, 1999). Su principal requerimiento es que permitan diferenciar cepas sensibles y resistentes, siendo la concentración crítica la que permite hacer dicha distinción (Picardeu y Vincent, 1997; Heifets, 2000). Por tanto, la detección de la resistencia subyace como uno de los pilares más importantes, contribuyendo al mejor conocimiento y manejo de la TB, minimizando en consecuencia los riesgos de contagio y diseminación de la enfermedad (Chan *et al.*, 2000; Guevara *et al.*, 2003; Brodie y Schluger, 2005).

Los métodos de susceptibilidad a las drogas antituberculosas basados en el cultivo de las micobacterias sobre medios de huevo o agar, pueden ser directos si los medios controles y los medios con drogas son inoculados directamente con el producto patológico, lo que permite disponer de los resultados en 3 ó 4 semanas, o indirectos si se inoculan los medios con una suspensión bacteriana preparada a partir de un cultivo en medio sólido o líquido, de esta forma se requiere de un período entre 7-12 semanas para obtener los resultados. La ventaja de los métodos directos radica en la rapidez de los resultados y en la mayor representatividad de la población bacilar original (Heifets y Cangelosi, 1999; Heifets, 2000; Brodie y Schluger, 2005).

Desde hace varios años se dispone de métodos cuantitativos que permiten estudiar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* frente a las drogas antituberculosas (Heifets, 1988). Entre ellos se describen los siguientes:

- **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** Es la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de más del 99% de la población bacteriana contenida en un medio de cultivo.
- **Concentración mínima bactericida (CMB):** Es la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de matar a más del 99,9% de la población bacteriana contenida en un cultivo en caldo. El índice CMI/CMB es la expresión estándar empleada para indicar la potencia de un antimicrobiano.
- **Concentración fraccionaria inhibitoria (CFI):** Es una interacción de coeficientes que indica cuándo una combinación de antimicrobianos con actividad inhibitoria es sinérgica ( $CFI < 0,5$ ), aditiva ( $CFI = 0,5-4$ ) o antagónica ( $CFI > 4$ ), donde:  
$$CFI = (CMI_a \text{ en combinación} / CMI_a \text{ sola}) + (CMI_b \text{ en combinación} / CMI_b \text{ sola}).$$
a y b son los antimicrobianos en los que se determinan su CFI.
- **Concentración fraccionaria bactericida (CFB):** Es una interacción de coeficientes que indica cuándo una combinación de antimicrobianos con actividad bactericida es sinérgica ( $CFB < 0,5$ ), aditiva ( $CFB = 0,5-4$ ) o antagónica ( $CFB > 4$ ), donde:  
$$CFB = (CMB_a \text{ en combinación} / CMB_a \text{ sola}) + (CMB_b \text{ en combinación} / CMB_b \text{ sola}).$$
a y b son los antimicrobianos en los que se determinan su CFB.

Estos métodos cuantitativos se reservan básicamente para el estudio *in vitro* de antimicrobianos. Sin embargo, la CMI y la CFI son también empleadas en la determinación de la susceptibilidad de aislamientos clínicos; para un gran número de especies bacterianas se acepta que la CMI constituye el método cuantitativo estándar. Mientras que el empleo de la CFI se reserva para aquellos casos que necesitan el empleo combinado de antimicrobianos. Por otro lado, la CMB y la CFB no se realizan rutinariamente por su laboriosidad y costo elevado (Heifets, 1988).

### II.6.1. Métodos convencionales

- **Método de las proporciones**

El MP o Método Proporcional de Canetti fue descrito en 1963 por Canetti *et al.*, y es en la actualidad la prueba de referencia (método de oro) recomendada por la OMS para monitorear la quimioterapia de la TB (Canetti *et al.*, 1963; Canetti *et al.*, 1969).

Este método consiste en medir la proporción de bacilos resistentes que existe en una cepa de *M. tuberculosis* a una concentración de la droga (concentración crítica), capaz de inhibir el crecimiento de células sensibles, pero no de las resistentes. Para cada droga está definida una proporción de mutantes resistentes (proporción crítica) por debajo de la cual la cepa es considerada sensible. Los resultados se obtienen luego de 4-6 semanas de incubación a 37°C (Canetti *et al.*, 1963; Canetti *et al.*, 1969; Heifets, 2000).

- **Método de las concentraciones absolutas**

Se utilizan diferentes concentraciones de la droga para determinar la concentración más baja que inhibe el crecimiento. Se puede emplear una concentración crítica y la cepa se considera resistente cuando hay un crecimiento de 20 ó más colonias sobre esta concentración. Los resultados se obtienen en 4-6 semanas (Rieder *et al.*, 1998; Heifets, 2000).

- **Método del cociente de resistencia**

Es una variante del método de las concentraciones absolutas. Se define como el cociente entre las CMI de la droga para la cepa problema y la cepa de referencia sensible (H37Rv). Un cociente  $\leq 2$  indica sensibilidad mientras que uno  $\geq 8$  define la cepa como resistente (Rieder *et al.*, 1998; Heifets, 2000).

- **Sistema radiométrico BACTEC-460** (*Becton Dickinson*)

Se detecta la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  como resultado del metabolismo del ácido palmítico marcado radiactivamente que se encuentra contenido en el medio de cultivo Middlebrook 7H12. El  $^{14}\text{CO}_2$  liberado es registrado como índice de crecimiento; por tanto, cuando se utilizan drogas antituberculosas capaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* se afecta la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  (Deland y Wagner, 1969; Palomino, 2000; Schluger, 2001).

## II.6.2. Métodos rápidos

**II.6.2.1. Métodos genotípicos:** El conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a las drogas, así como la disponibilidad de nuevas técnicas de Biología Molecular, ha permitido el desarrollo de diferentes métodos genotípicos para la detección rápida de resistencia a las drogas antituberculosas. Estos métodos se encargan de buscar determinantes de resistencia y no resistencia fenotípica (Takiff, 2000; Palomino, 2005).

- **Secuenciación automática de ADN**

La secuenciación del ADN amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) ha sido la técnica más utilizada y es actualmente considerada la regla de oro para estos fines. Entre los procedimientos utilizados (manuales y automatizados) para su realización, los automatizados tienen una mayor demanda. Su aplicación está descrita en la caracterización de mutaciones en el gen *rpoB* de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la RIF. También se ha empleado en la detección de mutaciones responsables de la resistencia a la INH, la STR, la PZA y la ciprofloxacina (CFX) (Takiff *et al.*, 1994; Mestdagh *et al.*, 1999; Palomino, 2005).

- **RCP-SSCP (RCP- polimorfismo conformacional de simple cadena)**

Se basa en la propiedad de una simple cadena de ADN de doblarse y formar una estructura terciaria cuya forma depende de su propia secuencia. Después de la amplificación de la región de interés por RCP, las cadenas de ADN amplificadas se separan y se doblan adoptando una conformación característica, que las hace diferir en su movilidad electroforética. Esta técnica ha sido utilizada en la detección de resistencia a la INH, la STR, la RIF y la CFX. (Scarpellini *et al.*, 1997; Palomino, 2000; García de Viedma, 2003).

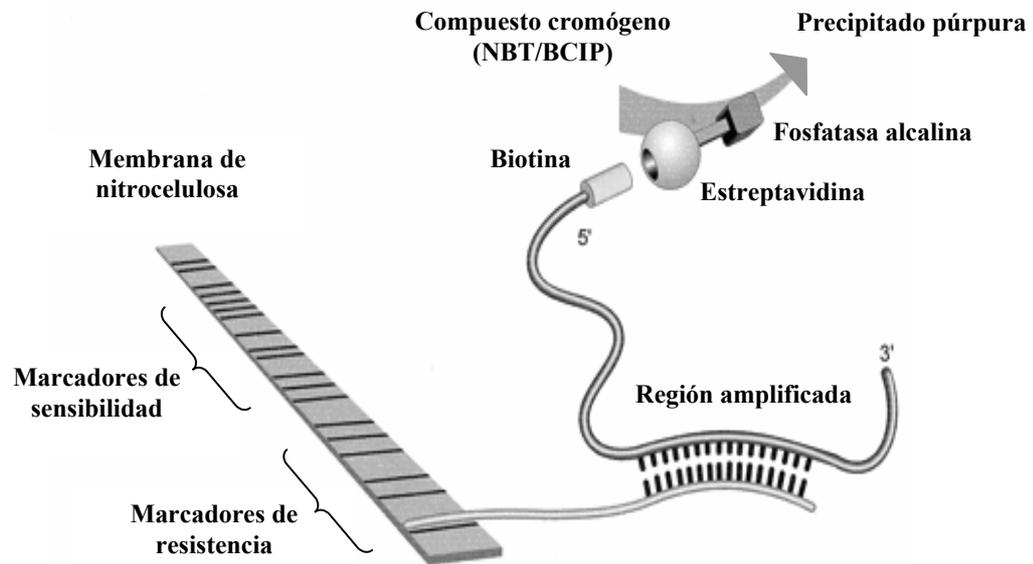
- **RCP-HDF (RCP-formación de *heteroduplex*)**

Se realiza utilizando el ADN amplificado de las cepas en estudio con el de la cepa control susceptible para obtener un ADN complementario híbrido. Si está presente una cepa resistente, la mutación produce un *heteroduplex* que tiene una movilidad en el gel diferente al *homoduplex* que no tiene mutación. Este método ha sido empleado en la detección de cepas resistentes a la RIF con mutaciones en la región de 305 pares de base (pb) del gen *rpoB* (Williams *et al.*, 1998<sup>a</sup>; Palomino, 2000).

- **Hibridación en fase sólida**

Se encuentran comercialmente disponibles dos estuches de hibridación en fase sólida. El más utilizado ha sido el INNOLipa\_Rif.TB (*Innogenetics NV*, Bélgica) que permite una amplificación de la región central de 81 pb del gen *rpoB* el cual codifica para la subunidad beta de la enzima ARN polimerasa presente en todos los miembros del complejo TB, seguida de una hibridación reversa. La biotina que actúa de marcador se incorpora durante la fase de amplificación, de esta forma, el producto amplificado biotinilado es posteriormente desnaturalizado e hibridado con 10 sondas oligonucleotídicas inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa a modo de líneas paralelas. El híbrido se detecta mediante una reacción colorimétrica. Este ensayo se completa en aproximadamente 12 horas (Rossau *et al.*, 1997; Palomino, 2000; Morcillo *et al.*, 2002; García de Viedma, 2003; Morgan *et al.*, 2005).

La siguiente figura muestra el proceso de hibridación en el sistema comercial INNOLipa\_Rif.TB (Cockerill, 1999).



El otro sistema disponible comercialmente es el *GenoType* MTBDR (*Hain Lifesciences*, Neheren, Alemania) que permite detectar simultáneamente resistencia a la INH y a la RIF mediante la búsqueda de las mutaciones más frecuentes en los genes *katG* y *rpoB*, respectivamente (Hillemann *et al.*, 2005; Mäkinen *et al.*, 2006; Palomino, 2006).

- **Microarreglos de ADN**

Se basa en la hibridación de ADN amplificado frente a cientos o miles de oligonucleótidos de alta densidad organizados en un soporte de vidrio miniaturizado, lo que brinda la posibilidad de evaluar y comparar una gran cantidad de secuencias simultáneamente en un simple paso de hibridación (Troesch *et al.*, 1999; Gryadunov *et al.*, 2005; Palomino, 2006).

- **Sistema de proteínas reporteras**

Es un procedimiento basado en el principio de emisión de luz debido a una actividad enzimática. Uno de los métodos emplea la enzima luciferasa aislada de una variedad de luciérnagas, cuyo gen ha sido clonado en los bacteriófagos L5 y phAE88. Estos funcionan como un vehículo para introducir la mencionada enzima dentro de la célula sin recurrir a la lisis celular. El principio de este método es la detección de fotones liberados por reacciones dependientes de trifosfato de adenosina (ATP), metabolito muy ligado a la actividad vital de la célula y que en ambientes desfavorables, como es presencia de antibióticos, se ve afectada su producción (Palomino, 2000; Schluger, 2001).

Hace unos años fue descrito un sistema similar al Luciferasa, que utiliza la proteína de fluorescencia verde (*GFP*, en inglés) de la medusa *Aequorea victoria*, la cual se emplea como molécula indicadora. Este sistema no requiere cofactores ni sustratos debido a la naturaleza fluorescente intrínseca del *GFP* (Palomino, 2000; Hazbon *et al.*, 2003).

- **RCP en tiempo real**

En la RCP en tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior lo que disminuye las posibilidades de contaminación. Mediante detección por fluorescencia se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. La RCP en tiempo real proporciona un método ágil y sencillo para la identificación de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a drogas antituberculosas (García de Viedma, 2003; Costa, 2004; Marín *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2004; Espy *et al.*, 2006; Palomino, 2006).

**II.6.2.2. Métodos fenotípicos:** Hasta hace algunos años la mayoría de los métodos fenotípicos disponibles requerían del crecimiento de *M. tuberculosis*, sobre los medios de cultivo, para realizar la interpretación de los resultados y debido al crecimiento lento de esta bacteria, se necesitaban varias semanas para poder disponer de los resultados. Desde hace algunos años se han desarrollado un grupo de novedosos métodos fenotípicos, estos brindan resultados rápidos mediante la detección de signos tempranos del metabolismo celular. Algunos miden el metabolismo mediante el empleo de indicadores de oxidación-reducción, detección del consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono, otros realizan la visualización temprana de microcolonias o utilizan la multiplicación de fagos para indicar la viabilidad de *M. tuberculosis* (Kalantri *et al.*, 2005; Palomino, 2005).

- **Tubo indicador de crecimiento para micobacterias (MGIT, siglas en inglés)** (*Becton Dickinson*)

El fundamento de este método descansa en la propiedad fluorescente de un compuesto sensible al oxígeno que está contenido en un tapón de silicona ubicado en el fondo del tubo que contiene el medio de cultivo Middlebrook 7H9. El oxígeno disuelto en el medio extingue la fluorescencia, de tal forma, que la remoción del oxígeno producto del metabolismo de las micobacterias permite la manifestación de fluorescencia cuando el tubo se expone a un transiluminador de luz ultravioleta con una  $\lambda=365$  nm. Por tanto, cuando se emplean drogas antituberculosas capaces de inhibir a *M. tuberculosis* se ve imposibilitada la manifestación de fluorescencia (Schluger, 2001; Sanders *et al.*, 2004; Fegou *et al.*, 2006; Kruuner *et al.*, 2006).

- **Método de detección de microcolonias**

Se basa en la detección de microcolonias en medio sólido. Con la ayuda del microscopio se detectan las microcolonias típicas que crecen en una capa fina de medio Middlebrook 7H11. Se ha visto que con este método se acorta el tiempo en el cual se obtienen los resultados de las pruebas de resistencia por lo que constituye una alternativa para los estudios de susceptibilidad en laboratorios con recursos

limitados (Mejia *et al.*, 1999; Palomino, 2000; Palomino y Portaels, 2000; Robledo *et al.*, 2006).

- **E-Test (AB BIODISK, Suecia)**

El E-Test es un método de detección de CMI, su principio está basado en el uso de tiras de papel que contienen un gradiente logarítmico de concentración de un antimicrobiano. Este induce una zona de inhibición de forma elipsoidal en la superficie de un medio de cultivo sólido donde se hace crecer la cepa en estudio. Debido a la necesidad de acortar el tiempo en brindar los resultados de las pruebas de susceptibilidad, este método puede ser una herramienta útil para el estudio a partir de muestras clínicas con baciloscopía positiva (Ramachandran y Paramasivan, 2003; Akcali *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2005; Palomino, 2005; Fegou *et al.*, 2006).

- **Citometría de flujo**

Este método se basa en la capacidad de *M. tuberculosis* de hidrolizar el diacetato de fluoresceína lo que produce un efecto de fluorescencia en el bacilo. Cuando esta técnica es utilizada en estudios de susceptibilidad, en las cepas sensibles se produce una disminución de la reacción de hidrólisis produciéndose una menor fluorescencia. Los valores de CMI obtenidos por este método se han correlacionado con los determinados por los métodos convencionales y pueden obtenerse resultados en menos de 24 horas (Palomino, 2000; Reis *et al.*, 2004).

- **Sistema de cultivo II ESP**

Es un sistema completamente automatizado. El fundamento de este método se basa en la detección de los cambios de presión que se producen debido al consumo o producción de gas, durante el crecimiento de *M. tuberculosis* (Palomino, 2000).

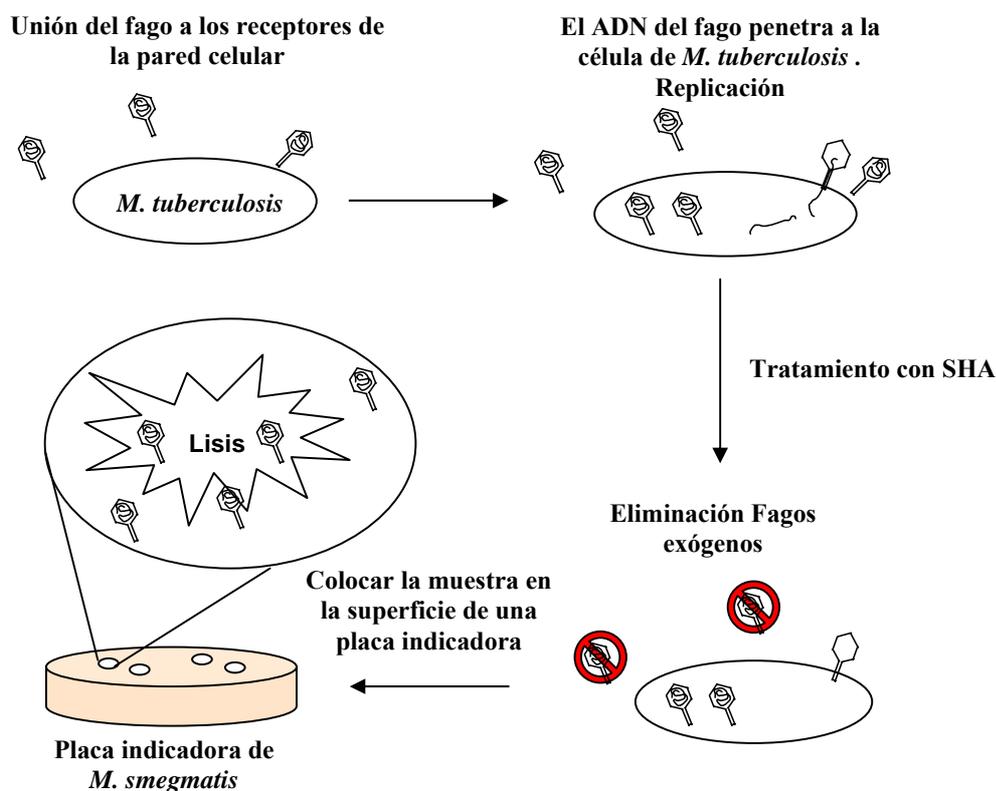
- **Método de la nitrato reductasa**

La enzima nitrato reductasa es la encargada de reducir los nitratos a nitritos y se encuentra presente en muchos microorganismos entre los que se destaca el género *Mycobacterium* y específicamente *M. tuberculosis*. La reacción bioquímica no se puede evidenciar a simple vista, por lo que es necesario utilizar una mezcla de reactivos (HCl + sulfanilamida + N-1-naftil etilendiamina dihidroclorhidrato) que al unirse con el nitrito presente en el medio dan origen a un derivado azoico coloreado (parasulfobencenoato-alfa-naftilamina) que indica la reducción (Virtanen, 1960; Golyshevskaja *et al.*, 1996; Ängeby *et al.*, 2002).

Este método, que ha sido utilizado rutinariamente en la identificación de especies, constituye una alternativa para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas; la detección de nitrito se emplea como un indicador de viabilidad celular luego de la exposición de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas (Ängeby *et al.*, 2002; Coban *et al.*, 2004).

- **Ensayo de amplificación de fagos**

El EAF emplea el micobacteriófago D29, virus ADN, que tiene la habilidad de infectar micobacterias de crecimiento lento y de crecimiento rápido como *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, respectivamente. Este fago es capaz de replicarse en el interior de estas micobacterias, provocando la lisis de la pared celular y la liberación por ende de la nueva progenie de fagos. La replicación del fago se ve afectada cuando se emplean drogas antituberculosas. En el ensayo los fagos exógenos son inactivados por tratamiento químico mientras que el número de fagos endógenos, el cual es un indicador del número de células de *M. tuberculosis* viables, es determinado después de ciclos de infección, replicación y liberación en una placa indicadora que contiene a *M. smegmatis*. Los resultados se obtienen en 24-48 horas a través de la aparición de zonas claras o de lisis (David *et al.*, 1980<sup>a</sup>; McNerney, 1999; Palomino, 2000; McNerney *et al.*, 2004; Kalantri *et al.*, 2005). La siguiente figura muestra el fundamento del EAF (Mole y Maskell, 2001):

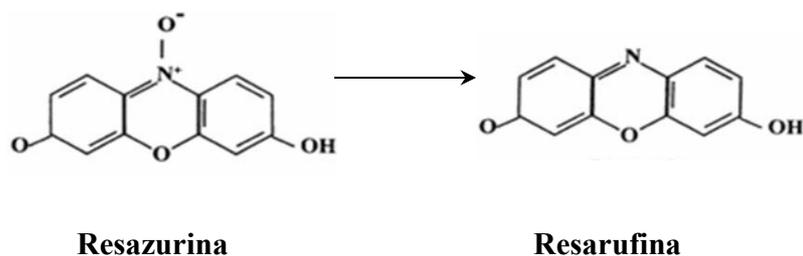


- **Microensayo resazurina**

La RES es un reactivo de óxido-reducción. Este indicador cambia de color azul (no fluorescente) cuando está en su estado oxidado a rosado intenso (fluorescente) frente a un ambiente reductor como el generado durante el metabolismo celular, el cambio de color puede detectarse visualmente. Esta propiedad ha sido utilizada para medir la viabilidad de *M. tuberculosis* luego de la exposición a las drogas antituberculosas. Es un método simple, rápido y de bajo costo que no requiere de un equipamiento especial para su utilización (Palomino *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Palomino, 2006).

Hace pocos años fue identificada la RES como el principal componente del alamar azul (AA) (Rasmussen, 1999; O'Brien *et al.*, 2000). Al ser la RES un producto que no se encuentra bajo licencia, es más económico que el AA y por tanto se vuelve asequible para laboratorios de escasos recursos económicos (Palomino *et al.*, 2002;

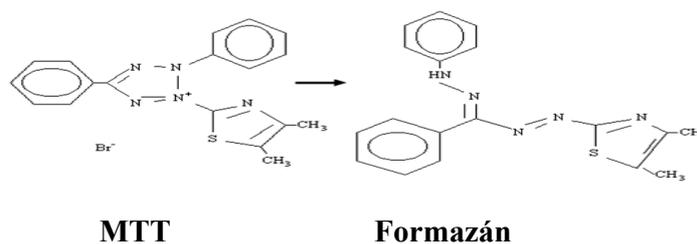
Martin *et al.*, 2003). En la siguiente figura se observa la estructura química de la RES y de su forma reducida (resarufina) (Perrot *et al.*, 2003):



- **Microensayo MTT**

El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio) es una sal de color amarillo y soluble en agua. Cuando es reducido por la deshidrogenasa mitocondrial, se produce una destrucción del anillo tetrazolio, formándose cristales púrpuras insolubles (formazán), que luego de la solubilización pueden medirse por espectrofotometría y de forma visual (Mosmann, 1983). La producción de formazán ha sido empleada como una medida indirecta de la viabilidad celular de *M. tuberculosis* luego de la exposición a las drogas antituberculosas (Gómez-Flores *et al.*, 1995; Abate *et al.*, 1998; Mshana *et al.*, 1998; De Logu *et al.*, 2001; Sánchez y Königsberg, 2006).

La siguiente figura muestra las estructura química del MTT y del formazán (Sánchez y Königsberg, 2006):



Algunos autores recomiendan solubilizar el formazán con una mezcla duodecil sulfato de sodio (SDS) - ácido clorhídrico, isopropanol o una mezcla de SDS - dimetilformamida (DMF) (Vistica *et al.*, 1991; Abate *et al.*, 1998; Mshana *et al.*, 1998).

### III. MATERIALES Y METODOS

La investigación correspondiente al primer objetivo de este trabajo fue realizada en la Unidad de Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical de Amberes en Bélgica. Para dar respuesta al resto de los objetivos, las investigaciones fueron realizadas en el LNR-TB-IPK.

- **Medios de cultivo:** Para la realización del MP, se empleó el medio Löwenstein-Jensen (LJ) con las drogas antituberculosas añadidas antes de la coagulación (Anexo 1), este mismo medio de cultivo fue utilizado para la realización del MNR conteniendo  $\text{KNO}_3$  a una concentración de 1 000  $\mu\text{g/mL}$ . Para la ejecución de los ensayos colorimétricos y el EAF, se empleó el medio Middlebrook 7H9 (*Difco Laboratories*) (Anexo 2), enriquecido con un 10% de OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) (*Difco Laboratories*).
- **Drogas antituberculosas:** Se preparó una solución madre (1 000  $\mu\text{g/mL}$ ) para cada una de las drogas. La INH, la STR y el EMB fueron diluidas en agua destilada estéril; para diluir la RIF se empleó una mezcla de metanol y agua destilada estéril (1:2) para lograr una mejor disolución. (Todas las drogas empleadas fueron suministradas por la casa comercial *Sigma-Aldrich*, Bornem, Bélgica).
- **MTT:** Una solución madre de MTT (*Sigma*, EUA) a una concentración de 5 mg/mL fue preparada en solución salina fosfato (PBS) (Anexo 3), fue filtrada y conservada a 4°C protegida de la luz. Para realizar la solubilización del formazán (cristales de MTT reducidos), se utilizó una mezcla 1:1 de SDS al 20% y DMF al 50%.

- **RES:** Se preparó una solución madre de RES (*Acros Organic NV*, Geel, Bélgica) al 0,01% en agua destilada estéril y posteriormente, esta se filtró y conservó a 4°C protegida de la luz.
- **Cepas:** Se investigaron 572 cepas de *M. tuberculosis*, 235 fueron recibidas en el LNR-TB-IPK desde los diferentes laboratorios del país para la ejecución del estudio de vigilancia de la resistencia, 50 pertenecían a la colección de la Unidad de Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica y el resto (287), integran la colección del LNR-TB-IPK (Anexo 4). En cada uno de los ensayos realizados se incluyeron las siguientes cepas de referencia de *M. tuberculosis* procedentes de la colección de cultivos tipo americana (ATCC): H37Rv (ATCC 27294) sensible a la INH, la STR, el EMB y la RIF y cepas de *M. tuberculosis* portadoras de monorresistencia a las drogas antituberculosas de primera línea: ATCC 35822, ATCC 35820, ATCC 35837 y ATCC 35838, resistentes a la INH, la STR, el EMB y la RIF, respectivamente.

### III.1. Evaluación de métodos rápidos para la detección de resistencia a la RIF

Se determinó la resistencia a la RIF en 20 cepas codificadas de *M. tuberculosis* que pertenecían a la colección de la Unidad de Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica. Los resultados obtenidos mediante el sistema radiométrico BACTEC-460 y el MP fueron utilizados como referencia para la interpretación de los resultados.

#### III.1.1. Sistema radiométrico BACTEC-460 (*Becton Dickinson*, EUA).

Para el estudio de susceptibilidad mediante el sistema radiométrico BACTEC-460 se siguió la metodología recomendada por Roberts *et al.*, 1983.

**Preparación de la droga:** A partir de la solución madre (1 000 µg/mL) se realizó una dilución en agua destilada estéril hasta alcanzar la concentración de trabajo (2 µg/mL).

**Preparación del inóculo:** Con un asa de 5 mm de diámetro, se tomo de un cultivo de *M. tuberculosis* en medio LJ de 3-4 semanas de incubación el mayor número de colonias posible y la biomasa obtenida se colocó en un frasco estéril de 5 cm de diámetro conteniendo en su interior 30 perlas de vidrio (3 mm de diámetro) y 2 ó 3 gotas de agua destilada estéril. Posteriormente, con el objetivo de disgregar esta biomasa, se realizaron movimientos circulares. A continuación, se agregaron 3 mL de agua destilada estéril, se agitó y se dejó reposar unos minutos. Una parte del sobrenadante se recogió y fue empleada para preparar una suspensión bacilar con turbidez similar al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  células/mL) y seguidamente se realizó una dilución 1:10 en agua destilada estéril.

**Inoculación:** La inoculación se realizó en el medio líquido Middlebrook 7H12. En el caso de los viales controles de crecimiento, este procedimiento se realizó empleando 0,1 mL del inóculo 1:10. Mientras que, para la inoculación de los viales con la RIF se empleó 0,1mL de una suspensión bacteriana equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

**Incubación:** Los viales fueron incubados a 37°C durante 3-13 días.

**Lectura e interpretación:** La lectura se realizó diariamente, a partir del tercer día, hasta que el vial de control del crecimiento alcanzó un valor de índice de crecimiento superior a 30, o el de la RIF un valor de 999. Diariamente, se calculó la diferencia de índice de crecimiento con la del día anterior. Se definió la cepa como sensible si el valor de índice de crecimiento obtenido en el vial control de crecimiento fue mayor que el obtenido en el vial con la RIF; de lo contrario la cepa se definió como resistente.

### III.1.2. Tubo indicador de crecimiento para micobacterias (*Becton Dickinson*, EUA)

La aplicación del *MGIT* se realizó siguiendo la metodología recomendada por Palomino *et al.*, 1999.

**Preparación de la droga:** A partir de la solución madre (1 000 µg/mL) se realizó una dilución en agua destilada estéril hasta alcanzar la concentración de trabajo (1 µg/mL).

**Preparación del inóculo:** El inóculo se preparó en PBS, siguiendo la metodología descrita en III.1.1. Una vez obtenida la suspensión bacteriana con una turbidez similar al tubo 0,5 de la escala de McFarland, se realizó una dilución 1:5 en PBS.

**Inoculación de los tubos:** A cada uno de los tubos se les añadió 0,5 mL de OADC y seguidamente fueron inoculados con 0,5 mL del inóculo diluido 1:5.

**Incubación:** Se incubaron los tubos a 37°C durante 3-13 días.

**Lectura e interpretación:** La lectura se realizó diariamente colocando los tubos en un transiluminador de luz ultravioleta ( $\lambda=365$  nm). Una vez detectada la fluorescencia en el tubo control de crecimiento, durante los dos días siguientes, se verificó la fluorescencia en el tubo con la RIF y si no se observó, la cepa se definió como sensible, de lo contrario fue definida como resistente.

### III.1.3. INNOLiPA\_Rif.TB (*Innogenetics NV*, Bélgica)

Se empleó el sistema INNOLiPA\_Rif.TB para detectar mutaciones en el gen *rpoB* siguiendo la metodología descrita por Rossau *et al.*, 1997.

**Extracción del ADN:** Se recogió una asada de biomasa de *M. tuberculosis* a partir de un cultivo de 3-4 semanas en medio LJ. Esta biomasa fue resuspendida en 400  $\mu\text{L}$  de *buffer* TE (Anexo 5) y fue calentada a 95°C durante 5 minutos, seguidamente fue centrifugada a 3 000 g y 2  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fueron transferidos a la mezcla de RCP.

**Amplificación de la región de 81pb:** La mezcla de amplificación estuvo formada por los *primers* marcados con biotina (25 pmol), 5  $\mu\text{L}$  de *buffer* 10X, 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP, 10 mM) y 1U de Taq polimerasa por mezcla de reacción en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . La reacción de amplificación se efectuó durante 40 ciclos bajo las condiciones que se muestran en la siguiente tabla:

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Cantidad de ciclos</b>
Incubación	95°C	1 minuto	/
Desnaturalización	95°C	30 segundos	} Repetir el ciclo 40 veces
Hibridación	62°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión Final	72°C	5 minutos	/

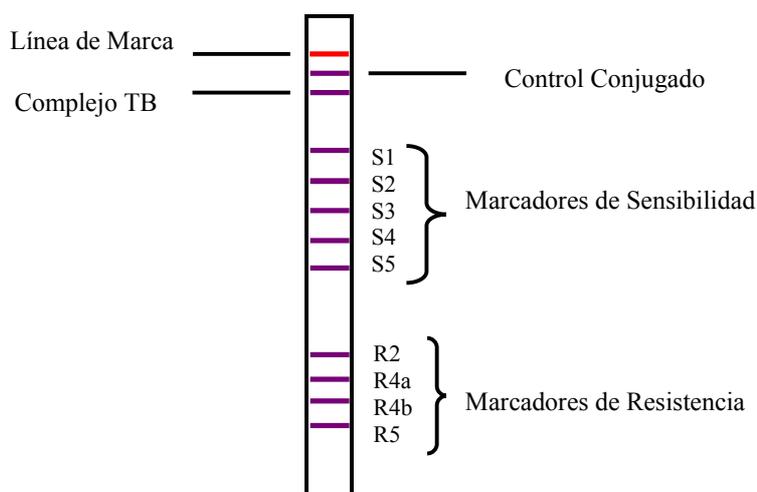
El producto amplificado se verificó mediante una electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se utilizó el marcador de peso molecular de 50 pb *DNA Step Ladder*, y se empleó *Orange G* como colorante para la corrida electroforética que se realizó a 70 volts en *buffer* Tris Borato EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 0,5X.

**Desnaturalización e hibridación:** El producto de RCP fue desnaturalizado e hibridado a una membrana de nitrocelulosa que contenía 10 oligonucleótidos inmovilizados.

**Revelado del ensayo:** Para verificar la presencia de hibridación se añadió el conjugado formado por estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina y seguidamente se añadió el sustrato cromógeno NBT/BCIP (nitroazul de tetrazolio/fosfato dipotásico de 5-bromo-4cloro-3-indol) el cual al ser degradado por la enzima permitió la formación de un precipitado púrpura en cada una de las bandas donde ocurrió la hibridación.

**Lectura e interpretación:** Debe tenerse en cuenta que sólo ocurre la formación del precipitado cuando se produce una perfecta hibridación entre el oligonucleótido inmovilizado y el producto de RCP marcado. El ensayo se consideró válido cuando se visualizaron en las tiras, las bandas para el control del conjugado y la banda específica para el complejo TB. La presencia de hibridación con los 5 oligonucleótidos de sensibilidad indicó ausencia de mutaciones en el gen *rpoB* y la cepa se consideró sensible a la RIF. La ausencia de una de las bandas de sensibilidad o la presencia de una banda de resistencia indicó que la cepa contenía mutaciones en el gen *rpoB* y por tanto se consideró resistente a la RIF.

El siguiente esquema muestra la distribución de los diferentes oligonucleótidos en la membrana de nitrocelulosa:



#### III.1.4. Método de la nitrato reductasa

Para la realización del MNR se siguió la metodología descrita por Ängeby *et al.*, (2002).

**Preparación del inóculo:** El inóculo se preparó en PBS, siguiendo la metodología descrita en III.1.1. Una vez obtenida una suspensión bacteriana con turbidez similar al tubo 1 de la escala de McFarland, se realizó una dilución 1:10 en PBS.

**Inoculación de los tubos:** Se inocularon 3 tubos de medio control LJ + KNO<sub>3</sub> con 200 µL de la dilución 1:10 de la suspensión de *M. tuberculosis* ajustada según la turbidez del tubo 1 de la escala de McFarland. Los tubos con RIF (concentración crítica de 40 µg/mL) se inocularon con 200 µL de la suspensión bacteriana con turbidez similar al tubo 1 de la escala de McFarland.

**Incubación:** Los tubos se incubaron a 37°C en posición inclinada, de forma tal que el inóculo se distribuyera sobre toda la superficie, manteniendo las tapas ligeramente cerradas durante 24-48 horas. Pasado este tiempo, se ajustaron las tapas y se colocaron los tubos en posición vertical hasta que se realizó la lectura (7, 10 ó 14 días).

**Revelado del ensayo:** Al séptimo día de incubación se reveló uno de los tubos control de crecimiento, añadiéndole 500 µL de la mezcla reveladora que estuvo formada por: 1 volumen (HCl al 50%) + 2 volúmenes (sulfanilamida al 0,2%) + 2 volúmenes (N-1-naftil etilendiamina dihidroclorhidrato al 0,1%). La formación de un compuesto de color rosado indicó la viabilidad de *M. tuberculosis* y por tanto se reveló el tubo con RIF, de lo contrario los tubos fueron reincubados y el revelado del tubo con droga se efectuó el día 10 ó 14 en dependencia del cambio de color en el tubo control de crecimiento.

**Lectura e interpretación:** La cepa se consideró sensible cuando no se desarrolló color en el tubo con RIF o si el color en el tubo con droga fue más débil que en el tubo control de crecimiento, de lo contrario se consideró resistente.

### III.1.5. Ensayos colorimétricos.

Para la realización de los ensayos colorimétricos MTT y RES se siguieron los mismos procedimientos. Se utilizó como referencia las metodologías descritas por Abate *et al.*, (1998) y Palomino *et al.*, (2002), respectivamente.

**Preparación de la droga:** A partir de la solución madre (1 000 µg/mL) se realizó una dilución en medio Middlebrook 7H9 estéril hasta alcanzar la concentración de trabajo (8 µg/mL).

**Preparación del inóculo:** El inóculo se preparó en medio Middlebrook 7H9 siguiendo la metodología descrita en III.1.1. Una vez obtenida una suspensión bacteriana con turbidez similar al tubo 1 de la escala de McFarland, se realizó una dilución 1:20 en medio Middlebrook 7H9 la cual fue empleada para la ejecución de los ensayos colorimétricos.

**Montaje de la placa:** Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y tapas. Fue posible estudiar dos cepas en duplicado en cada una de ellas y de esta forma se efectuó el revelado empleando simultáneamente el MTT y la RES.

- Se depositaron 200 µL de agua destilada estéril en todos los pocillos de la periferia de la placa. Seguidamente se adicionaron 100 µL de medio Middlebrook 7H9 + OADC al resto de los pocillos con excepción de las columnas 6 y 7.

- Se añadieron 100  $\mu$ L de la dilución de trabajo de la RIF (8  $\mu$ g/mL) en los pocillos B2, B4, B8 y B10 y se realizaron diluciones dobles seriadas hasta la fila G desechando los 100  $\mu$ L finales. De esta forma la droga quedó en un rango de concentración de 4-0,125  $\mu$ g/mL.
- Seguidamente fueron adicionados 100  $\mu$ L del inóculo en todos los pocillos con excepción de los pocillos marcados como CM (control de esterilidad del medio), que recibieron 100  $\mu$ L más de medio Middlebrook 7H9 + OADC. De esta forma todos los pocillos alcanzaron un volumen de 200  $\mu$ L y la droga quedó en el rango de concentración de trabajo (2-0,062  $\mu$ g/mL).

**Incubación:** Las placas fueron colocadas en bolsas plásticas, selladas e incubadas durante 7-15 días a 37°C.

El siguiente esquema muestra la distribución de la placa empleada para los ensayos colorimétricos MTT y RES durante la evaluación de la actividad antituberculosa de la RIF.

	Cepa 1					Cepa 2						
		RIF		RIF			RIF		RIF			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			CM		CM				CM		CM	
C			CC7		CC7				CC7		CC7	
D			CC9		CC9				CC9		CC9	
E			CC11		CC11				CC11		CC11	
F			CC13		CC13				CC13		CC13	
G			CC15		CC15				CC15		CC15	
H												

**Leyenda:**

 Pocillos con agua destilada estéril

**CM:** Control de esterilidad del medio

**CC7-CC15:** Control de crecimiento para los días 7, 9, 11, 13 y 15.

**Revelado del ensayo**

El revelado del primer pocillo control de crecimiento (CC7) se efectuó al séptimo día de incubación. El cambio de color de azul a rosado de la RES y el cambio de color de amarillo a violeta del MTT, indicó la viabilidad de *M. tuberculosis* y por consiguiente se procedió a revelar los pocillos con droga. De no ocurrir cambio de color en el pocillo CC7, las placas fueron reincubadas. El cambio de color en los pocillos CC7 al CC15 indica el momento en que se deben revelar los pocillos con droga.

- **RES:** Se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de RES en uno de los pocillos control de crecimiento y se incubaron las placas 24 horas.
- **MTT:** Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de MTT en uno de los pocillos control de crecimiento y se incubaron las placas 24 horas. Si ocurrió formación de un precipitado violeta, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del *buffer* de solubilización (SDS/DMF).

**Lectura e interpretación de los resultados:** La lectura se realizó de manera visual pasadas las 24 horas de añadidos los indicadores de oxidación-reducción. La CMI se definió como la menor concentración de la droga donde no ocurrió cambio de color.

**III.1.6. Método de las proporciones**

Para realizar el MP se empleó la metodología descrita por Canetti *et al.*, (1969).

**Preparación del inóculo:** El inóculo se preparó en agua destilada estéril, siguiendo la metodología descrita en III.1.1. Una vez obtenida una suspensión bacteriana con turbidez similar al tubo 0,5 de la escala de McFarland, se tomó 1 mL de esta suspensión y se realizaron diluciones decimales seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , en tubos que contenían 9 mL de agua destilada estéril.

**Inoculación de los tubos:** Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de las suspensiones bacterianas  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  a 2 tubos de medio control y a un tubo con RIF (concentración crítica de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Incubación:** Los tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en posición inclinada, de forma tal que el inóculo se distribuyera sobre toda la superficie, manteniendo las tapas ligeramente cerradas durante 24-48 horas. Pasado este tiempo, se ajustaron las tapas y se colocaron los tubos en posición vertical hasta que se realizó la lectura (28 y 42 días).

**Lectura e interpretación:** Una primera lectura se realizó a los 28 días, esta fue definitiva sólo para aquellas cepas que evidenciaron resistencia. La lectura final se realizó a los 42 días, escogiendo la dilución en la cual aparecieron colonias contables (menos de 100). La media de la suma de la cantidad de colonias contadas en los tubos sin droga indicó la cantidad de bacilos inoculados en todos los tubos. Seguidamente se contaron la cantidad de colonias crecidas en los tubos con RIF y se calculó la proporción de bacilos resistentes que existía en cada cepa, para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Proporción de bacilos resistentes} = \frac{\text{Número de colonias en tubo con droga} \times 100}{\text{Media del número de colonias en los 2 tubos sin droga (control)}}$$

La proporción obtenida se comparó con la proporción crítica establecida para la RIF (1%). Por debajo de esta proporción la cepa se consideró sensible y si la proporción fue igual o superior se consideró resistente.

### III.2. Aplicación del EAF para la detección de resistencia a la RIF

Se estudiaron 102 cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la colección del LNR-TB-IPK. Para la realización del EAF se siguió la metodología descrita en el

año 2000 por McNerney *et al.* El MP se empleó como referencia para el análisis de los resultados y se siguió la metodología descrita en **III.1.6.**

**Preparación de la droga:** A partir de la solución madre (1 000 µg/mL) se realizó una dilución en medio Middlebrook 7H9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 10% OADC hasta alcanzar la concentración de trabajo (20 µg/mL).

**Preparación del inóculo:** El inóculo se preparó en medio Middlebrook 7H9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 10% OADC siguiendo la metodología descrita en **III.1.1.** Fue empleada en el ensayo una suspensión bacteriana con turbidez similar al tubo 1 de la escala de McFarland.

**Ensayo de susceptibilidad:** Se colocaron en un vial 75 µL de la RIF a una concentración de 20 µg/mL y seguidamente se añadieron 75 µL de la suspensión bacteriana, de esta forma la droga quedó a una concentración de 10 µg/mL.

Durante la evaluación de cada cepa fue incluido un vial control de crecimiento en el cual fueron depositados 75 µL de medio Middlebrook 7H9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 10% OADC y 75 µL de la suspensión bacteriana.

**Incubación:** Los viales fueron incubados durante 24 horas a 37°C.

**Amplificación del fago:** Pasadas las 24 horas de incubación se añadió 50 µL de una suspensión del micobacteriófago D29 (Anexo 6) a una concentración de 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Placas (UFP)/mL en medio Middlebrook 7H9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub>.

**Incubación:** Los viales fueron incubados durante 60-90 minutos a 37°C.

**Inactivación de los fagos exógenos:** Se añadieron, a cada vial, 100  $\mu$ L de sulfato de hierro amoniacal (SHA) 30mM y seguidamente se procedió a revelar el ensayo.

**Revelado del ensayo:** Se colocaron 10  $\mu$ L de la muestra con RIF y de la muestra control de crecimiento en la superficie de una placa indicadora (Anexo 7).

**Incubación:** Las placas indicadoras fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.

**Interpretación de los resultados:** Se observó la aparición de zonas claras (placas de lisis) en la superficie de la placa indicadora. Si hubo lisis en la muestra control de crecimiento y en la muestra con RIF la cepa se consideró resistente; si solamente hubo formación de lisis en el control de crecimiento, la cepa se reportó como sensible.

**Análisis de los resultados:** Los resultados fueron incorporados a tablas de doble entrada y se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia, tomando como referencia los resultados del MP (Anexo 8).

### **III.3. Evaluación del MNR y los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina) para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea.**

Se estudiaron 100 cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la colección del LNR-TB-IPK. Para la realización del MNR y los ensayos colorimétricos se siguió la metodología descrita en III.1.4 y III.1.5., respectivamente. El MP se empleó como referencia para el análisis de los resultados y se siguió la metodología descrita en III.1.6.

A continuación se muestran las concentraciones de las drogas empleadas en cada uno de los métodos:

Drogas antituberculosas	MP / MNR µg/mL	ensayos colorimétricos MTT / RES (Filas B-G) µg/mL
INH	0,2	1-0,031
STR	4	8-0,25
EMB	2	16-0,5
RIF	40	2-0,062

En cada placa de 96 pocillos fue evaluada una cepa de *M. tuberculosis* en duplicado. Una réplica fue utilizada para el revelado con MTT y la otra se reveló con RES.

El siguiente esquema muestra la distribución de la placa empleada para los ensayos colorimétricos MTT y RES durante la evaluación de las cuatro drogas antituberculosas de primera línea:

**Cepa 1**

	INH STR EMB RIF				INH STR EMB RIF							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B						CM					CM	
C						CC7					CC7	
D						CC9					CC9	
E						CC11					CC11	
F						CC13					CC13	
G						CC15					CC15	
H												

**Leyenda:**

 Pocillos con agua destilada estéril

**CM:** Control de esterilidad del medio

**CC7-CC15:** Control de crecimiento para los días 7, 9, 11, 13 y 15.

**Análisis estadístico de los resultados:** El procesamiento de los resultados se realizó mediante el programa estadístico MedCalc para *Windows*, versión 8.1.0.0 (MedCalc *Software*, Mariakerke, Bélgica) con el cual se construyó la curva de las características operativas para el receptor (ROC) para cada droga, empleando como referencia los resultados obtenidos mediante el MP. Se determinaron los puntos de corte de cada una de las drogas para los ensayos colorimétricos y se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia.

#### **III.4. Utilización del método de la nitrato reductasa para la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*.**

Se estudiaron 320 cepas de *M. tuberculosis*, 235 de las cuales fueron recibidas en el LNR-TB-IPK para la ejecución del estudio de vigilancia de la resistencia en el período comprendido entre septiembre/2004 hasta julio/2005, el resto pertenecen a la colección de dicho laboratorio.

Para la realización del MNR y el MP se emplearon las metodologías descritas en **III.1.4.** y **III.1.6.**, respectivamente. Las drogas fueron empleadas a las mismas concentraciones que aparecen referidas en **III.3.**

**Análisis estadístico de los resultados:** Fueron calculados los valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia utilizando como referencia los resultados del MP (Anexo 8).

#### **III.5. Participación en un proceso de garantía de la calidad de los ensayos colorimétricos y el MNR.**

Se estudiaron 30 cepas codificadas de *M. tuberculosis* recibidas en el LNR-TB-IPK como parte de un estudio multicéntrico internacional. Las cepas procedían de la Unidad de Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.

Una vez obtenidos los resultados fueron enviados a dicho laboratorio para verificar la coincidencia de los mismos.

Para realizar el MNR, los ensayos colorimétricos y el MP, se siguieron las metodologías descritas en **III.1.4**, **III.1.5** y **III.1.6.**, respectivamente. Se emplearon las 4 drogas antituberculosas de primera línea (INH, STR, EMB y RIF) a las mismas concentraciones que aparecen referidas en **III.3**.

**Análisis estadístico de los resultados:** Fueron calculados los valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente de concordancia, tomando como referencia los resultados del MP (Anexo 8).

## IV. RESULTADOS

## IV.1. Evaluación de métodos rápidos para la detección de resistencia a la RIF

En la tabla 1 se muestran los resultados para las 20 cepas estudiadas. Se obtuvo una concordancia total al comparar cada método con las técnicas de referencia (MP y sistema radiométrico BACTEC-460).

**Tabla 1.** Resultados de las 20 cepas de *M. tuberculosis* evaluadas para detectar resistencia a la RIF

Cepas	MP	BACTEC	MGIT	MNR	INNOLipa_Rif.TB		CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
					Patrón	Resultado	MTT	RES
ITM-1	R	R	R	R	R2	R	>2	>2
ITM-2	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-3	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-4	R	R	R	R	R5	R	>2	>2
ITM-5	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-6	R	R	R	R	$\Delta\text{S1}$	R	>2	>2
ITM-7	R	R	R	R	R2	R	>2	>2
ITM-8	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-9	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-10	R	R	R	R	R5	R	>2	>2
ITM-11	R	R	R	R	R2	R	>2	>2
ITM-12	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-13	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-14	R	R	R	R	R5	R	>2	>2
ITM-15	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-16	R	R	R	R	$\Delta\text{S1}$	R	>2	>2
ITM-17	R	R	R	R	R2	R	1	>2
ITM-18	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-19	S	S	S	S	WT	S	<0,062	<0,062
ITM-20	R	R	R	R	R5	R	>2	>2
<b>Tiempo (días)</b>	28-42	6-13	4-13	7-14		1-2		8-13

WT: tipo salvaje

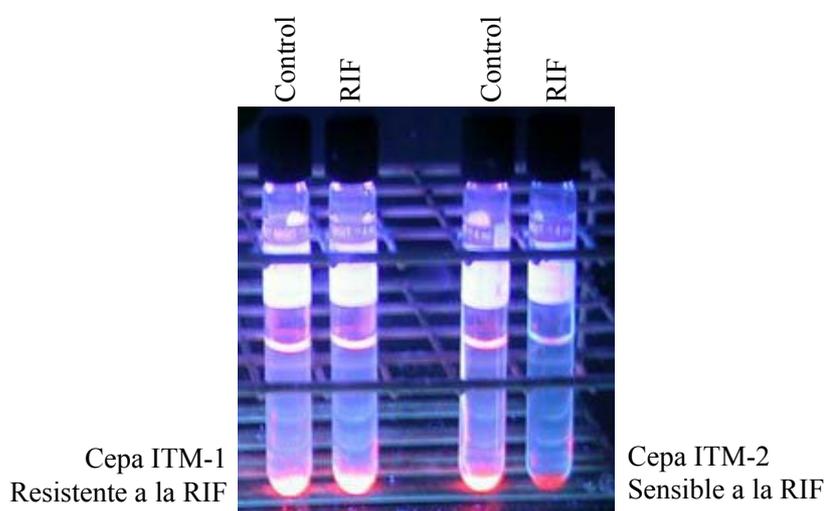
R2  $\rightarrow$  Asp-516-Val

R5  $\rightarrow$  Ser-531-Leu;

$\Delta\text{S1}$ : mutación en la región 1 (L511P; L511R; S512T; Q513L; Q513K).

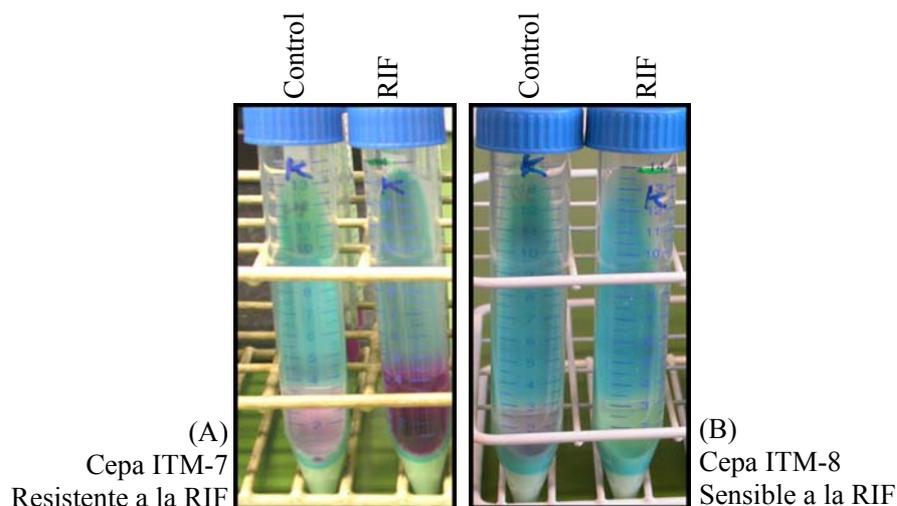
Se definieron 10 cepas como sensibles y 10 como resistentes. Los resultados de la mayoría de los métodos evaluados se obtuvieron en un período entre 4-14 días, a diferencia del MP que requirió de 28-42 días de incubación para la interpretación de los mismos. El INNOLipa\_Rif.TB, fue una excepción, los resultados se obtuvieron a las 48 horas.

En la figura 1 se muestran los resultados para dos de las cepas evaluadas mediante el *MGIT*. En la cepa resistente se observa fluorescencia (color rosado) en el tubo control de crecimiento y en el tubo con RIF.



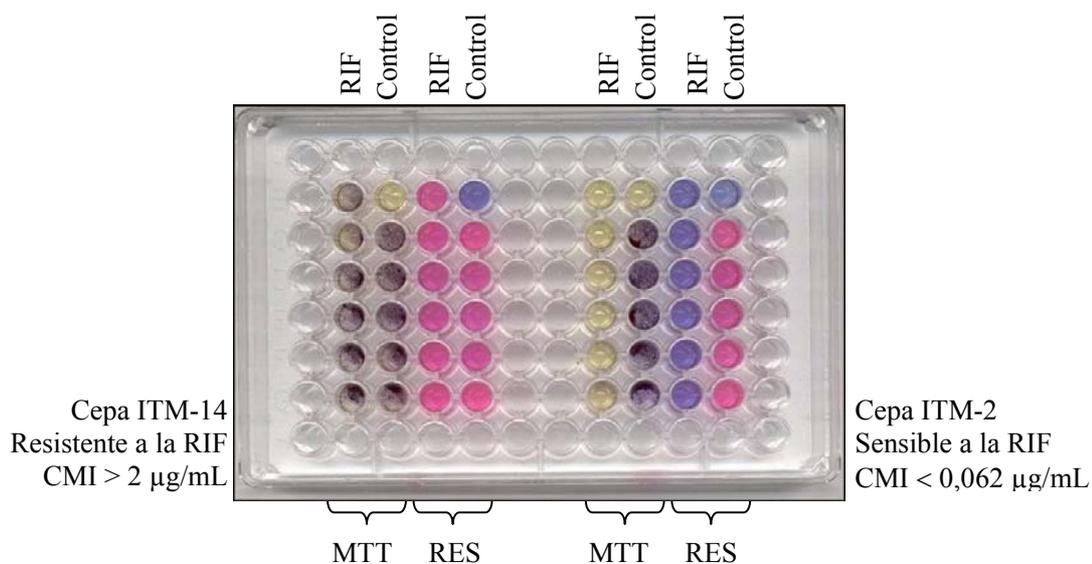
**Figura 1.** Resultados para las cepas ITM-1 e ITM-2, resistente y sensible a la RIF, respectivamente, mediante el *MGIT*

Los resultados para el MNR estuvieron disponibles en un tiempo promedio de 10 días. En la figura 2 se muestran resultados para una cepa sensible y otra resistente, observándose en la cepa resistente un cambio de color más intenso en el tubo con RIF que en el tubo control de crecimiento.



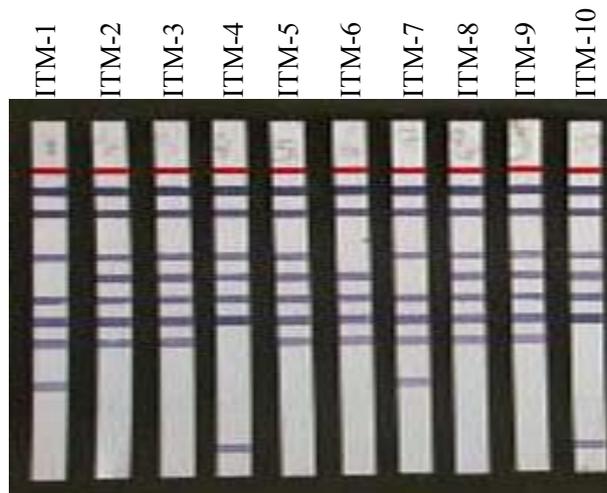
**Figura 2.** Resultados del MNR para las cepas ITM-7 (A) e ITM-8 (B), resistente y sensible, respectivamente a la RIF

En la figura 3 se muestran resultados para los microensayos colorimétricos. Los resultados estuvieron disponibles entre los 8-13 días. Para las 10 cepas sensibles la CMI de la RIF fue  $< 0,062 \mu\text{g/mL}$ . En 9 de las 10 cepas resistentes, la CMI fue  $> 2 \mu\text{g/mL}$  por los dos ensayos colorimétricos; en una de las resistentes la CMI fue de  $1 \mu\text{g/mL}$  sólo por el ensayo con MTT mientras que con el ensayo con RES la CMI fue  $> 2 \mu\text{g/mL}$ .



**Figura 3.** Resultados de los ensayos colorimétricos MTT y RES para las cepas ITM-14 e ITM-15, resistente y sensible a la RIF, respectivamente

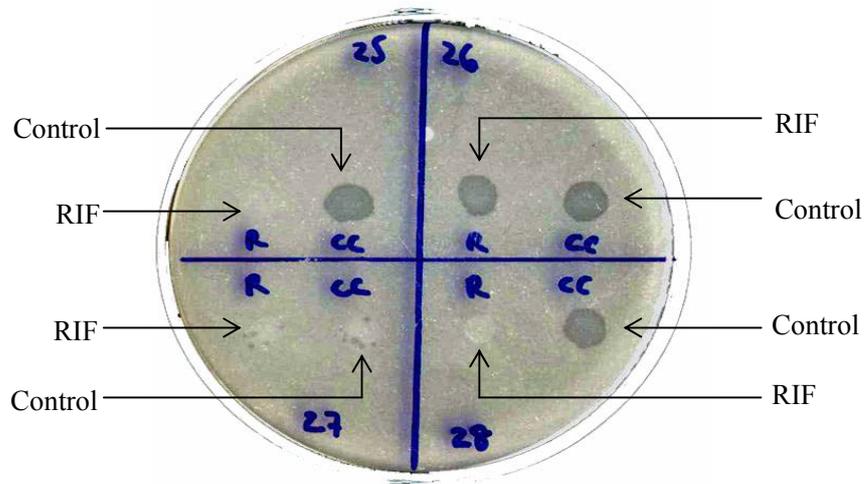
La aplicación del INNOLiPA\_Rif.TB permitió verificar la presencia de mutaciones en la región de 81 pb del gen *rpoB* de las cepas resistentes. En la figura 4 se muestran los resultados para 10 de las cepas estudiadas. Los patrones de resistencia encontrados fueron R2 (Asp-516-Val) para las cepas ITM-1, ITM-7, ITM-11 e ITM-17, R5 (Ser-531-Leu) para las cepas ITM-4, ITM-10, ITM-14 e ITM-20 y  $\Delta S1$  para las cepas ITM-6 e ITM-16.



**Figura 4.** Resultados del INNOLiPA\_Rif.TB para 10 de las cepas estudiadas (ITM-1-ITM-10). Sensibles: ITM-2, ITM-3, ITM-5, ITM-8 e ITM-9. Resistentes: ITM-1, ITM-4, ITM-6, ITM-7 e ITM-10

#### **IV.2. Aplicación del EAF para la detección de resistencia a la RIF**

Los resultados del EAF estuvieron disponibles a las 48 horas de incubación. La figura 5 muestra los resultados para cuatro de las cepas evaluadas.



**Figura 5.** Resultados obtenidos mediante el EAF para las cepas 26 y 27, resistentes a la RIF y para las cepas 25 y 28, sensibles a la RIF

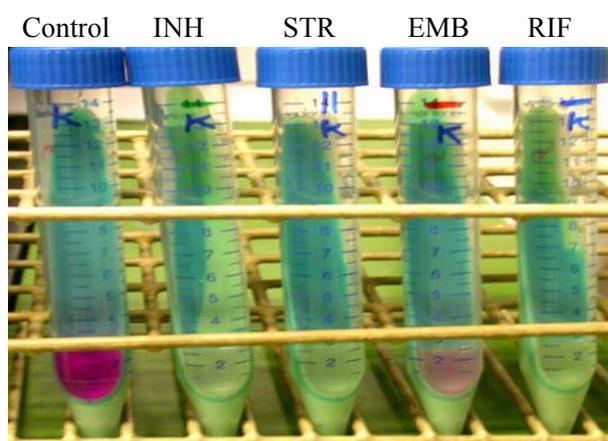
Sólo se obtuvo un resultado discordante, alcanzando el EAF una sensibilidad del 97,8% y una especificidad del 100% y una concordancia total con el MP del 99,01%. En la tabla 2 aparecen los resultados obtenidos mediante el EAF y el MP.

**Tabla 2.** Resultados obtenidos para las 102 cepas de *M. tuberculosis* evaluadas mediante el EAF

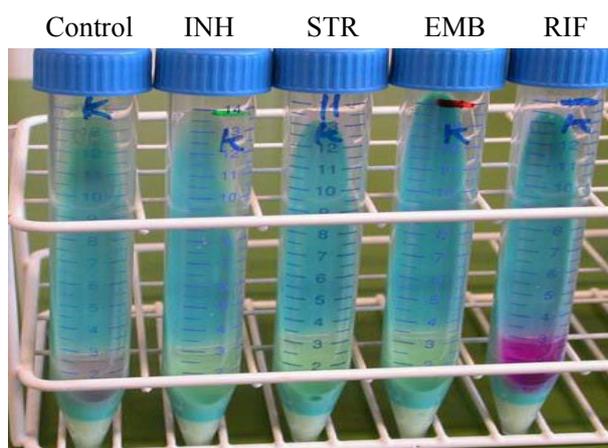
	MP (resistente)	MP (sensible)	Total
<b>EAF (resistente)</b>	44	0	44
<b>EAF (sensible)</b>	1	57	58
<b>Total</b>	45	57	102

### IV.3. Evaluación del MNR y los ensayos colorimétricos (MTT y resazurina) para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea.

La aplicación de los ensayos colorimétricos y el MNR permitió verificar la utilidad de las nuevas técnicas para la detección rápida (7-14 días) de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea. En las figuras 6 y 7 se muestran resultados del MNR para una cepa sensible a las cuatro drogas evaluadas y una cepa resistente a la RIF, respectivamente.



**Figura 6.** Resultados del MNR para una cepa sensible a las 4 drogas antituberculosas de primera línea



**Figura 7.** Resultados del MNR para una cepa sensible a la INH, la STR y el EMB y resistente a la RIF

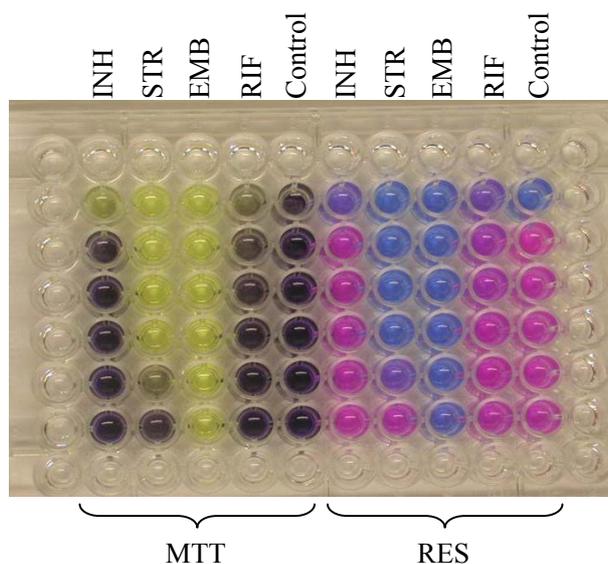
En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos mediante el MNR y el MP. Para la INH, 43 cepas fueron resistentes y 55 sensibles por ambos métodos; se obtuvieron para esta droga dos resultados falsos negativos. Para la STR 45 cepas fueron resistentes y 51 sensibles por ambos métodos; se obtuvieron 4 resultados discordantes, uno falso positivo y 3 falsos negativos. Con el EMB se encontraron 17 y 82 cepas resistentes y sensibles por ambos métodos, respectivamente; para esta droga se obtuvo un resultado falso positivo. La RIF fue la única droga para la cual hubo una perfecta correlación entre los dos métodos.

**Tabla 3.** Resultados de la susceptibilidad mediante el MNR

MNR	Método de las Proporciones							
	INH		STR		EMB		RIF	
	R	S	R	S	R	S	R	S
<b>R</b>	43	0	45	1	17	1	37	0
<b>S</b>	2	55	3	51	0	82	0	63
<b>Total</b>	45	55	48	52	17	83	37	63

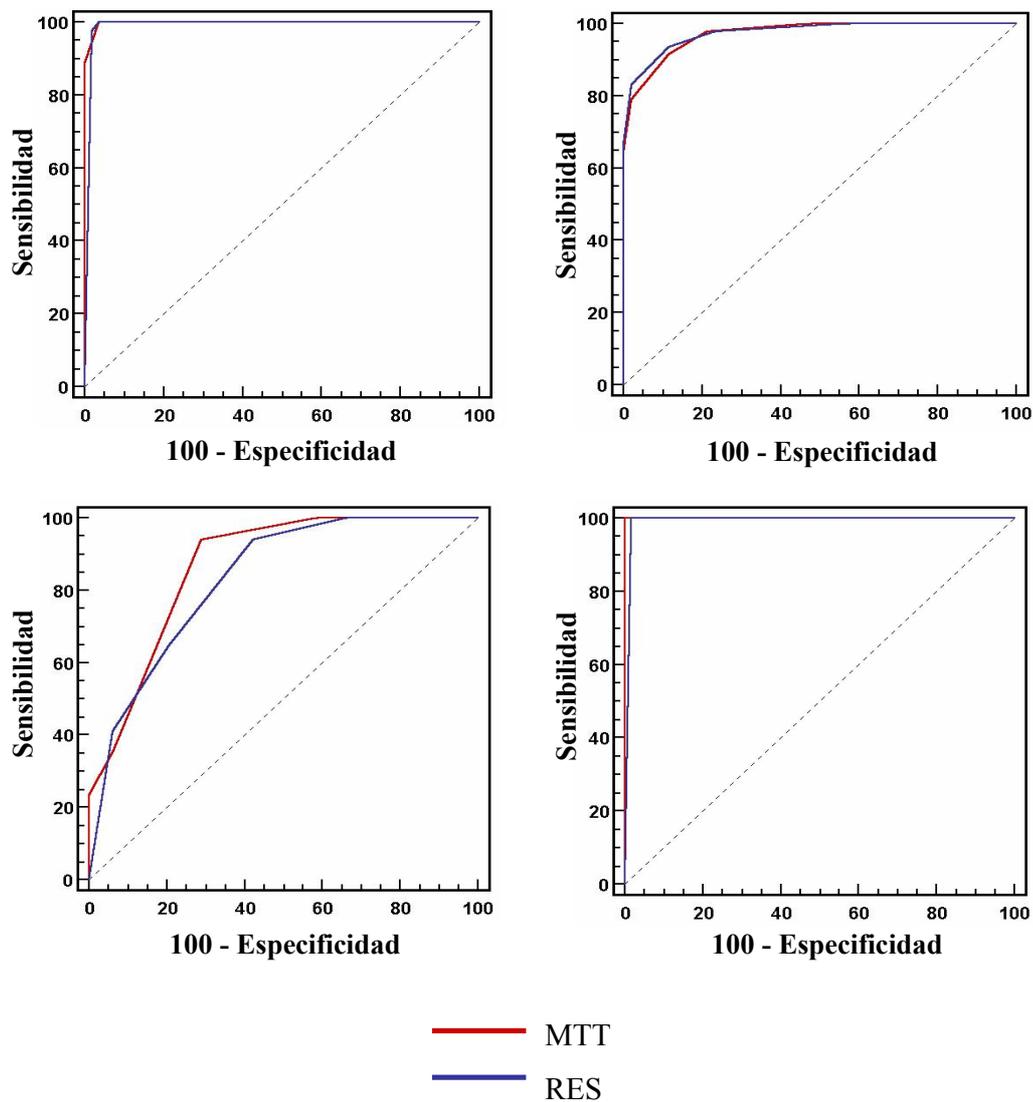
Mediante el MNR la sensibilidad fue 95,6% para la INH, 93,7% para la STR y 100% para el EMB y la RIF. Para la INH y la RIF se alcanzaron valores de especificidad del 100%, mientras que este parámetro fue del 98,0% y 98,7% para la STR y el EMB, respectivamente. La concordancia global alcanzada fue del 98,2%.

En la figura 8 se muestran resultados de los ensayos colorimétricos para una cepa resistente a la INH y a la RIF. Los valores de CMI obtenidos para esta cepa fueron iguales por ambos métodos: 1 µg/mL para la INH, 1 µg/mL para la STR, < 1 µg/mL para el EMB y > 2 µg/mL para la RIF.



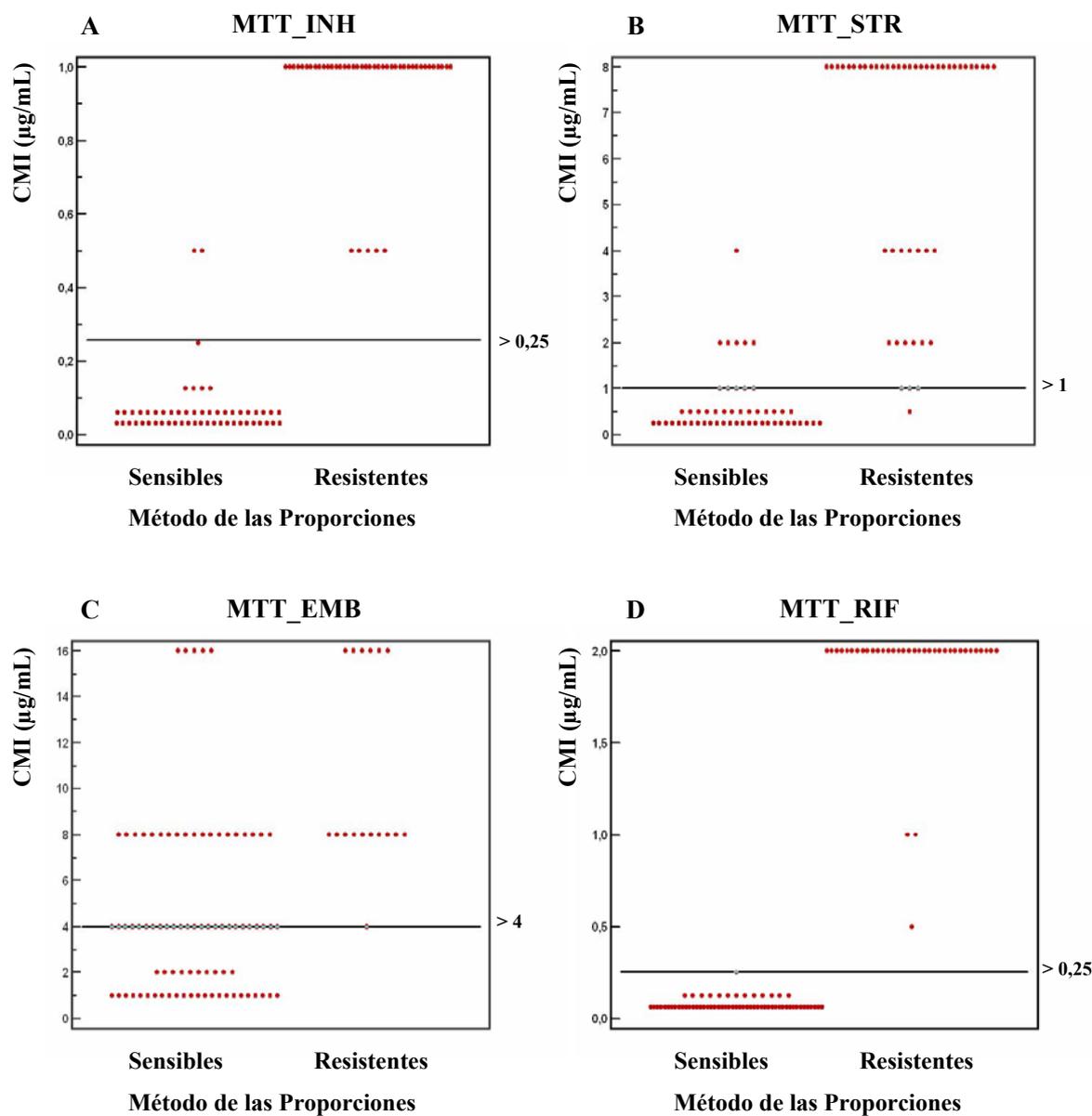
**Figura 8.** Resultados de los ensayos colorimétricos MTT y RES para una cepa sensible a la STR y el EMB y resistente a la INH y la RIF

La figura 9 muestra las curvas ROC para cada una de las drogas evaluadas. Los puntos de corte obtenidos fueron  $> 0,25 \mu\text{g/mL}$ ,  $> 1 \mu\text{g/mL}$ ,  $> 4 \mu\text{g/mL}$  y  $> 0,25 \mu\text{g/mL}$  para la INH, la STR, el EMB y la RIF, respectivamente. Los valores de área bajo la curva (ABC) obtenidos para el microensayo MTT fueron de 0,998, 0,973, 0,68 y 1, mientras que para el microensayo RES fueron 0,991, 0,976, 0,832 y 0,992 para la INH, la STR, el EMB y la RIF, respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos para una  $p > 0,05$ , con un intervalo de confianza del 95,0%.



**Figura 9.** Curvas ROC para los microensayos MTT y RES. (A) INH, (B) STR, (C) EMB, (D) RIF

La figura 10 muestra la correlación entre los valores de CMI obtenidos mediante el microensayo MTT y los resultados obtenidos con el MP. Este diagrama de puntos permite establecer el punto de corte y distinguir los resultados sensibles y resistentes obtenidos mediante el ensayo colorimétrico.



**Figura 10.** Disposición de los resultados de susceptibilidad de las 100 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas mediante el microensayo MTT y el MP. (A) INH, (B) STR, (C) EMB, (D) RIF

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos mediante el microensayo MTT. Para la INH 45 cepas fueron resistentes y 53 sensibles por ambos métodos; se

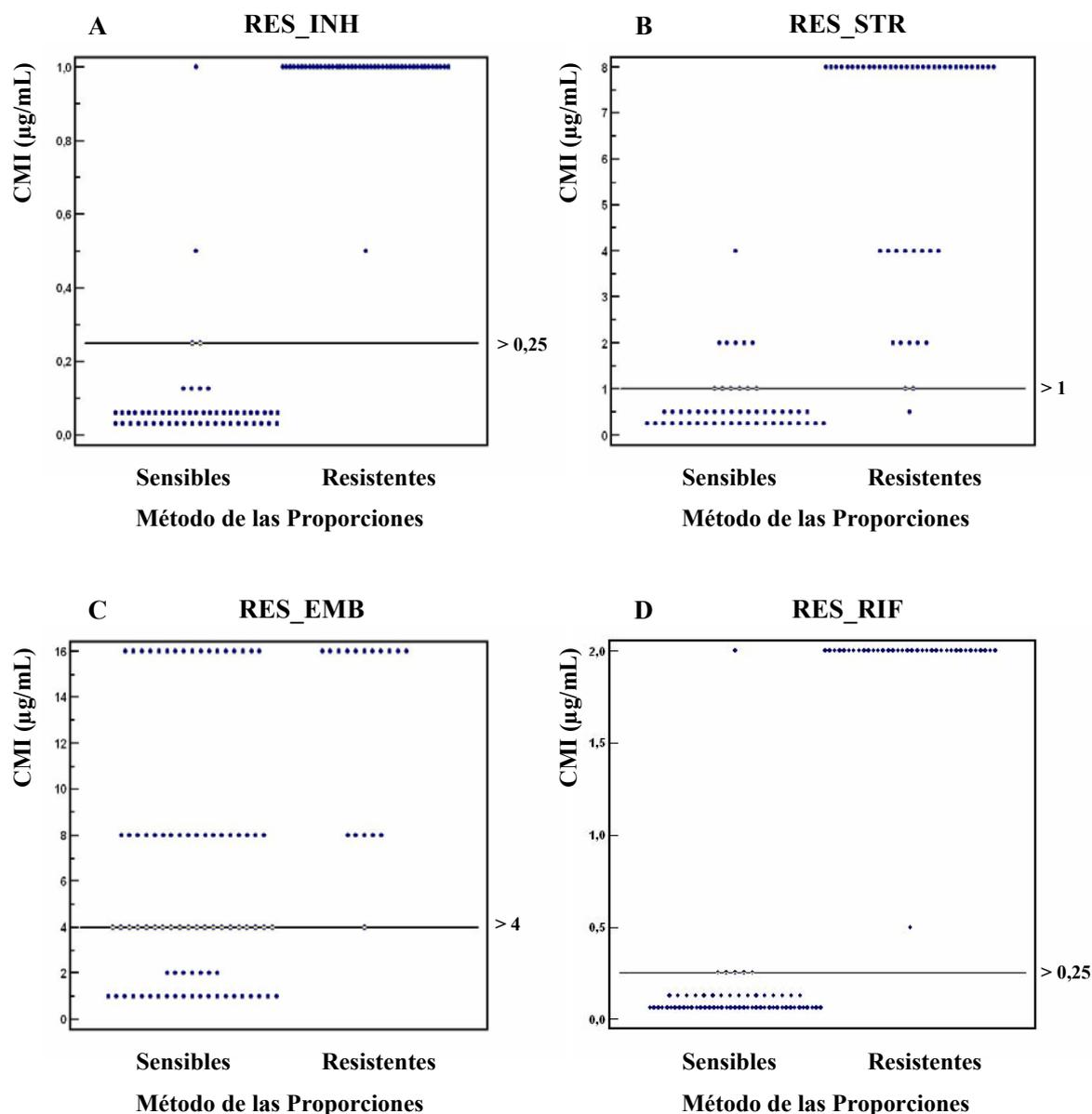
obtuvieron dos resultados falsos positivos. Con la STR se obtuvieron 10 resultados discordantes, 6 de ellos falsos positivos y 4 falsos negativos. Para el EMB 24 cepas fueron resistentes mediante el MTT y sensibles mediante la técnica de referencia, para esta droga se encontró un resultado falso negativo. La RIF fue la única droga para la cual no se encontraron resultados discordantes.

**Tabla 4.** Resultados de la susceptibilidad mediante el microensayo MTT

MTT	Método de las Proporciones							
	INH		STR		EMB		RIF	
	R	S	R	S	R	S	R	S
<b>R</b>	45	2	44	6	16	24	37	0
<b>S</b>	0	53	4	46	1	59	0	63
<b>Total</b>	45	55	48	52	17	83	37	63

Para el microensayo MTT la sensibilidad alcanzada fue del 100% para la INH y la RIF, 91,7% para la STR y 94,1% para el EMB. La especificidad fue del 96,4%, 88,5%, 71,1% y 100% para la INH, la STR, el EMB y la RIF, respectivamente. La concordancia total alcanzada fue del 90,7%.

La figura 11 muestra la correlación entre los valores de CMI obtenidos mediante el microensayo RES y los resultados obtenidos con el MP. Este diagrama de puntos permite establecer el punto de corte y distinguir los resultados sensibles y resistentes obtenidos mediante el ensayo colorimétrico.



**Figura 11.** Disposición de los resultados de susceptibilidad de las 100 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas mediante el microensayo RES y el MP. (A) INH, (B) STR, (C) EMB, (D) RIF

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos mediante el microensayo con RES. Para la INH hubo 45 cepas resistentes y 53 sensibles mediante ambos métodos, 2 cepas fueron definidas como resistentes mediante el microensayo con

RES siendo sensibles por el MP. Para la STR hubo 9 resultados discordantes, 6 falsos positivos y 3 falsos negativos. Con el EMB, 16 y 48 cepas fueron definidas como resistentes y sensibles por ambos métodos, respectivamente; con esta droga hubo 35 resultados falsos positivos y uno falso negativo. Para la RIF, 99 cepas mostraron resultados concordantes entre los dos métodos, sólo una cepa mostró un resultado discordante al ser resistente mediante el microensayo RES.

**Tabla 5.** Resultados de la susceptibilidad mediante el microensayo RES

RES	Método de las Proporciones							
	INH		STR		EMB		RIF	
	R	S	R	S	R	S	R	S
<b>R</b>	45	2	45	6	16	35	37	1
<b>S</b>	0	53	3	46	1	48	0	62
<b>Total</b>	45	55	48	52	17	83	37	63

Para el microensayo RES la sensibilidad fue del 100% para la INH y la RIF, 93,8% para la STR y 94,1% para el EMB. Los valores de especificidad alcanzados fueron 96,4%, 88,5%, 57,8% y 98,4% para la INH, la STR, el EMB y la RIF, respectivamente. La concordancia global alcanzada fue del 88,2%.

#### **IV.4. Utilización del método de la nitrato reductasa para la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*.**

Los resultados de la aplicación del MNR en 320 cepas de *M. tuberculosis* se muestran en la tabla 6. Para la INH, 55 cepas fueron resistentes y 260 sensibles tanto por el MP como por el MNR, 5 cepas mostraron resultados falsos negativos para esta droga. Para la STR, 83 cepas fueron correctamente identificadas como resistentes y 232 como sensibles por ambos métodos, 5 cepas mostraron resultados

discordantes (tres falsos negativos y dos falsos positivos). Para el EMB, 22 cepas fueron resistentes por los dos métodos y 295 fueron correctamente identificadas como susceptibles por el MNR; tres cepas fueron erróneamente identificadas como sensibles para esta droga por el MNR. Para la RIF, 46 de las 49 cepas resistentes y todas las cepas sensibles fueron identificadas correctamente por el MNR.

**Tabla 6.** Resultados obtenidos para las 320 cepas de *M. tuberculosis* evaluadas mediante el MNR

Drogas	MNR	MP		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Concordancia (%)
		R	S			
INH	R	55	0	91,6	100	98,4
	S	5	260			
STR	R	83	2	96,5	99,1	98,4
	S	3	232			
EMB	R	22	0	88,0	100	99,1
	S	3	295			
RIF	R	46	0	93,8	100	99,1
	S	3	271			

La sensibilidad alcanzada mediante el MNR fue 91,6%, 96,5%, 88,0% y 93,8% para la INH, la STR, el EMB y la RIF, respectivamente. La especificidad fue  $\geq 99,1\%$  para todas las drogas. La concordancia total alcanzada con relación al MP fue del 98,8%.

#### **IV.5. Participación en un proceso de garantía de la calidad de los ensayos colorimétricos y el MNR.**

Los resultados obtenidos por el LNR-TB-IPK durante la ejecución de los ensayos colorimétricos y el MNR, como parte del estudio multicéntrico internacional, estuvieron disponibles en período de 7-14 días y se muestran en la tabla 7.

Con el MNR la sensibilidad fue 91,7% para la INH y 83,3% para la STR debido a uno y tres resultados falsos negativos, respectivamente; para el EMB y la RIF se alcanzó una sensibilidad del 100%. La especificidad fue del 100% para la STR, el EMB y la RIF, la INH mostró una especificidad del 94,4% debido a un resultado falso positivo.

Después de analizar los resultados obtenidos mediante los ensayos colorimétricos, la sensibilidad fue del 100% para todas las drogas. Con excepción de la STR, para la cual se obtuvo una especificidad del 83,3% debido a tres resultados falsos positivos, el resto de las drogas mostraron una especificidad del 100%. El LNR-TB-IPK no obtuvo resultados discordantes al aplicar el método de referencia.

**Tabla 7.** Parámetros estadísticos obtenidos en el estudio multicéntrico

	Sensibilidad (%)			Especificidad (%)		
	MNR	MTT	RES	MNR	MTT	RES
<b>INH</b>	91,7	100	100	94,4	100	100
<b>STR</b>	83,3	100	100	100	83,3	83,3
<b>EMB</b>	100	100	100	100	100	100
<b>RIF</b>	100	100	100	100	100	100

Las cepas de referencia utilizadas como controles en cada uno de los objetivos de esta tesis mostraron los patrones de susceptibilidad / resistencia conocidos, de esta forma se garantizó la calidad de los medios de cultivos y procedimientos técnicos empleados.

## V. DISCUSION

La TB constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial y es considerada a las puertas del nuevo milenio la enfermedad infecciosa humana más frecuente y su agente causal, el patógeno que mayor número de muertes produce anualmente (8 millones de nuevos casos y 2 millones de muertes) (Musa *et al.*, 2005; Palomino, 2005; Pai *et al.*, 2006<sup>a</sup>). Desde el descubrimiento de las drogas antituberculosas el pasado siglo, ha ocurrido una significativa reducción de la morbimortalidad asociada a *M. tuberculosis*. No obstante, la aparición y diseminación de cepas resistentes a las drogas antituberculosas de primera línea, hacen que los beneficios obtenidos se encuentren comprometidos actualmente (Aziz y Wright, 2005).

Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y aunque muchos países disponen de programas de control y han adoptado la estrategia *DOTS* como pilar en el control de esta enfermedad, cerca de 50 millones de personas están infectadas con cepas MDR. El incremento de los casos de TB producidos por cepas con estas características se convierte en una situación preocupante, debido a lo complejo, prolongado y costoso que se vuelve el tratamiento (World Health Organization, 2004; Aziz y Wright, 2005).

La resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas, ha emergido como resultado de inapropiados tratamientos que han favorecido la multiplicación selectiva de células resistentes. Tasas elevadas de TB causada por cepas MDR son cada día más frecuentes en diversas regiones del mundo, no solamente entre pacientes previamente tratados, debido a un mal manejo de los casos, sino además entre casos nuevos debido a la transmisión de este fenómeno en la comunidad (World Health Organization, 2004). Esta situación ha generado una urgente demanda de nuevas pruebas de susceptibilidad para llevar a cabo la vigilancia de la resistencia y la orientación de tratamientos adecuados (Kim, 2005).

La frecuencia de mutantes resistentes y sus niveles de resistencia, varían en dependencia de la droga y de los genes mutados, cuya expresión fenotípica incluirá: alteraciones en sitio de acción de la droga, pérdida de las enzimas que producen la activación de la misma y cambios en la permeabilidad de la pared (Coll, 2003; Kim, 2005; De Rossi *et al.*, 2006).

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 y sus resultados ayudarían a seleccionar o modificar la terapéutica e impedir oportunamente la diseminación de cepas resistentes en la comunidad (Mshana *et al.*, 1998; De Logu *et al.*, 2001). Actualmente, se dispone de una gran variedad de métodos para evaluar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas. Sin embargo, ninguno es perfecto y los resultados que ofrecen aún no satisfacen la orientación clínica necesaria para imponer un tratamiento efectivo y evitar la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes (Kim, 2005).

La mayoría de los laboratorios disponen desde hace varios años de las técnicas convencionales basadas en el cultivo. Entre las mismas se destaca el MP descrito por Canetti desde 1963 (Canetti *et al.*, 1963), método que en la actualidad continúa siendo la técnica de referencia, por ser altamente reproducible, de elevada correlación clínica y de bajo costo. El MP, así como el de las concentraciones absolutas y el del cociente de resistencia son muy laboriosos y debido al crecimiento lento de *M. tuberculosis*, tienen el inconveniente de requerir entre 4-6 semanas de incubación para brindar sus resultados (Canetti *et al.*, 1963; Canetti *et al.*, 1969; Heifets, 2000; Piffardi *et al.*, 2004).

El creciente aumento de los casos de TB MDR cada vez más frecuente en diversas regiones del mundo y la repercusión de esta situación en el control de esta enfermedad, así como el tiempo que necesitan las técnicas convencionales basadas

en el cultivo para mostrar los resultados de la susceptibilidad han motivado el desarrollo de técnicas rápidas de detección de resistencia.

El sistema radiométrico BACTEC-460 desarrollado en 1969 por Deland y Wagner y posteriormente adaptado para los estudios con micobacterias a partir de la incorporación del medio Middlebrook 7H12, sentó las bases en el desarrollo de técnicas rápidas para estudios de susceptibilidad en *M. tuberculosis*. Este método, al igual que el MP, emplea la proporción crítica del 1% para la definición de resistencia (Roberts *et al.*, 1983; Ramachandran y Paramasivan, 2003) y proporciona resultados concordantes con el MP. Los resultados que ofrece el método radiométrico lo han convertido en una técnica convencional con la ventaja de una considerable reducción del tiempo en el cual se obtienen los resultados (5-14 días) (Middlebrook *et al.*, 1977; Roberts *et al.*, 1983). Sin embargo, el costo elevado de su implementación, unido al riesgo que implica el empleo de compuestos radioactivos, han hecho del BACTEC-460 un método de uso limitado.

Como una alternativa no radiométrica que permite una reducción del tiempo necesario para obtener los resultados (4-13 días), fue desarrollado el *MGIT* el cual se encuentra disponible comercialmente (Palomino *et al.*, 1999). Los resultados que este método proporciona son perfectamente comparables con los obtenidos mediante el MP (Fegou *et al.*, 2006); El *MGIT* emplea el mismo principio del MP (proporción crítica del 1%) para la definición de resistencia (Ramachandran y Paramasivan, 2003). Sin embargo, el costo elevado de su implementación, limita su uso en los laboratorios de escasos recursos (Palomino *et al.*, 1999). El *MGIT* se encuentra además disponible de forma completamente automatizada (BACTEC/*MGIT*-960) y permite la evaluación de drogas antituberculosas de primera y segunda línea (Tortoli *et al.*, 1999; Idígoras *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 2004; Kruuner *et al.*, 2006; Rusch-Gerdes *et al.*, 2006).

El conocimiento de las bases moleculares de la resistencia en *M. tuberculosis*, junto a la disponibilidad de técnicas moleculares ha permitido desarrollar métodos genotípicos para estudiar la susceptibilidad. Dentro de las principales ventajas de estos métodos se destaca: obtención de los resultados en 24 horas, no requieren del crecimiento de *M. tuberculosis* reduciendo los riesgos asociados a la bioseguridad, pueden ser aplicados directamente a muestras clínicas y se pueden realizar de manera automatizada. No obstante, a pesar de estos beneficios, se describen también desventajas: incluyendo inhibidores cuando se aplican directamente en las muestras clínicas, por otra parte su empleo involucra equipos costosos y técnicas laboriosas, así como un personal altamente calificado. Todo lo anteriormente expuesto hace que estos métodos sean inaccesibles para los países de limitados recursos económicos, los que a su vez tienen el mayor problema de la resistencia. Por otra parte, aún no están dilucidados los mecanismos moleculares de la resistencia de todas las drogas antituberculosas (Eltringham *et al.*, 1999<sup>a</sup>; Takiff, 2000; Palomino, 2005).

La RIF se considera una de las mejores drogas para el tratamiento de la TB. Siempre se ha utilizado asociada a la INH y, en zonas del mundo con buenos PNC, también se combina con otras drogas antituberculosas. Para que aparezca un mutante resistente a la RIF se necesitan entre  $10^7$ - $10^9$  bacilos, convirtiéndola en la droga que mayor tasa de mutación necesita y por tanto se hace más difícil la selección de mutantes resistentes a punto de partida de la administración de una monoterapia real o encubierta. Estos aspectos, unido a que por su precio más elevado no se ha podido emplear en extensas zonas del mundo (las más pobres) hasta hace sólo algún tiempo, han condicionado que la resistencia a esta droga se haya demorado en aparecer más de lo esperado. Sin embargo, en los últimos 15 años, su uso se ha generalizado en la gran mayoría de los países, condición que, unido a que no siempre se ha administrado en el contexto de buenos PNC, ha hecho emerger la resistencia a la RIF como un auténtico problema de salud pública, sobre

todo porque casi siempre aparece asociado con la resistencia a la INH (Becerra *et al.*, 2000; Riska *et al.*, 2000; Caminero, 2001).

El hecho que la monorresistencia a la RIF sea rara y que más del 90% de las cepas resistentes a la RIF presenten además resistencia a la INH, ha convertido la resistencia a esta droga en un marcador de MDR, especialmente en países con una alta prevalencia de cepas resistentes (Drobniewski y Wilson, 1998; Cavusoglu *et al.*, 2002; Palomino, 2006).

Debido a que más del 95% de las cepas resistentes a la RIF presentan mutaciones dentro de la región de 81pb (codón 507-533) del gen *rpoB* (Cavusoglu *et al.*, 2002) se han desarrollado técnicas de secuenciación, hibridación (INNOLiPA\_Rif.TB, *GenoType* MTBDR), polimorfismo conformacional y microarreglos de ADN, entre otras, encaminadas a la detección de resistencia a esta droga (Heifets y Cangelosi, 1999; Palomino, 2005). Sin embargo, para el resto de las drogas antituberculosas se han descubierto varios genes involucrados con la resistencia, dificultándose el desarrollo de métodos moleculares para la detección de resistencia a las mismas (Takiff, 2000).

Todos estos aspectos han condicionado que en los últimos años la comunidad científica se haya visto motivada a desarrollar métodos rápidos que con un mínimo de equipamiento permitan detectar resistencia a las drogas antituberculosas con vistas a evitar oportunamente la diseminación de cepas resistentes. Por este motivo, la evaluación de técnicas rápidas y simples para la detección de resistencia, en respuesta a los términos de referencia del Centro Colaborador, es una de las principales líneas de investigación del LNR-TB-IPK.

El primer objetivo del presente estudio fue evaluar los ensayos colorimétricos (MTT y RES) y el MNR como herramientas alternativas para la detección de resistencia a la RIF. Se alcanzó un 100% de concordancia al comparar los resultados de estas

técnicas con los obtenidos por el MP, sistema radiométrico BACTEC-460 y el *MGIT*. Estos resultados son de gran valor dado lo rápidos que resultan estos métodos y lo importante que se hace diagnosticar la resistencia a la RIF como marcador de MDR. Fue posible verificar la presencia de mutaciones en el gen *rpoB* de las cepas resistentes al aplicar el sistema molecular INNOLiPA\_Rif.TB; al analizar los resultados de los ensayos colorimétricos, las 10 cepas sensibles tuvieron una CMI < 0,062 µg/mL, mientras que, las 10 cepas resistentes tuvieron una CMI > 2 µg/mL.

El INNOLiPA\_Rif.TB es un ensayo muy sensible y específico en el diagnóstico de resistencia a la RIF a partir del cultivo (Morcillo *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2004; Mäkinen *et al.*, 2006) y aunque no hay abundantes datos que corroboren la aplicación de esta técnica a partir de muestras clínicas, parece ser de gran utilidad si se aplica en zonas de elevada incidencia de MDR. Lo costoso de este método limita su aplicación en países con limitados recursos económicos (Morgan *et al.*, 2005; Pai *et al.*, 2006<sup>b</sup>). El INNOLiPA\_Rif.TB detecta las mutaciones más relevantes dentro del gen *rpoB* por lo que mutaciones raras u otros mecanismos de resistencia menos conocidos no pueden ser detectados. Aunque, han sido caracterizadas más de 50 mutaciones dentro de la región de 81pb, la mayoría se encuentran en los codones 516, 526 ó 531 (Ahmad *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2004; Pai *et al.*, 2006<sup>b</sup>).

Recientemente, se desarrolló un nuevo sistema basado en la hibridación (*GenoType* MTBDR) que permite detectar simultáneamente la resistencia a la INH y a la RIF. Con su aplicación se han alcanzado valores de sensibilidad y especificidad superiores al 99,0% para la RIF y aunque algunos resultados discordantes se han obtenido para la INH, constituye una alternativa para la detección rápida de cepas MDR (Hillemann *et al.*, 2005; Mäkinen *et al.*, 2006, Pai *et al.*, 2006<sup>b</sup>).

El EAF es uno de los métodos investigados que muestra resultados alentadores para la detección de resistencia a la RIF (Eltringham *et al.*, 1999<sup>a</sup>; McNerney, 1999;

Galí *et al.*, 2003; Simboli *et al.*, 2005). Este ensayo además, ha sido utilizado para evaluar drogas antituberculosas de primera y segunda línea, mostrando resultados excelentes al ofrecer una medida confiable de la viabilidad de *M. tuberculosis*, después de la exposición a las drogas antituberculosas (Eltringham *et al.*, 1999<sup>b</sup>; McNerney *et al.*, 2000; McNerney y Traore, 2005; Galí *et al.*, 2006, Pai *et al.*, 2006<sup>b</sup>).

La aplicación del EAF en nuestro trabajo mostró una buena concordancia (99,01%) cuando se comparó con los resultados obtenidos con el MP en LJ. Estos resultados son de gran valor ya que en la mayoría de los países la incidencia de resistencia a la RIF es baja y por tanto se necesitan métodos altamente específicos para buscar la resistencia a esta droga. El fracaso del EAF en la detección de resistencia en esta cepa pudo deberse a errores experimentales o problemas técnicos, tomando en consideración que el EAF no procederá en bacterias inactivas o donde el proceso de replicación se ha visto interrumpido.

Se ha descrito que el EAF puede verse afectado por varios mecanismos; una interrupción en la multiplicación o el encontrarse la bacteria en estado de latencia, pueden impedir la replicación del fago, el cual depende de los mecanismos internos de replicación del huésped. También se ha planteado que la disponibilidad de receptores en la bacteria constituye un factor determinante en la infección viral; en este sentido, la microscopía electrónica ha permitido observar que en las poblaciones micobacterianas algunas bacterias adsorben un gran número de fagos en su pared celular; mientras que en otras, el virus no logra la unión y por ende se imposibilita la infección. Se ha visto que una sobreexpresión del gen *mpr* puede causar resistencia a la infección por el fago y se ha vinculado con una inhibición del transporte del fago a través de la pared celular. Hasta el momento, no se han identificado cepas de *M. tuberculosis* y de *M. smegmatis* que no porten en su pared celular el sitio de unión del fago D29 (McNerney y Traore, 2005).

Además, se debe tener en cuenta que a concentraciones muy elevadas del fago, la eficacia de la infección disminuye, probablemente debido a una muerte abortiva de *M. tuberculosis*, previo a la replicación del fago. Algunos autores han señalado que la tasa de infección aumenta cuando este microorganismo crece en la superficie del medio de cultivo (McNerney *et al.*, 2004). Durante la ejecución del EAF se debe tener en cuenta que la naturaleza hidrofóbica de la pared celular de las micobacterias facilita la formación de agregados celulares y da lugar al crecimiento en grumos cuando *M. tuberculosis* se cultiva en medio líquido; sin embargo, no es posible el empleo de Tween 80, comúnmente utilizado para prevenir los agregados, debido a que éste interfiere en la integridad del fago e inhibe la adsorción de los fagos a sus receptores (Park *et al.*, 2003; McNerney *et al.*, 2004; McNerney y Traore, 2005).

Para realizar el informe de los resultados algunos autores han aplicado un análisis proporcional al número de UFP observadas. Sin embargo, al igual que la mayoría de los investigadores, somos partidarios del criterio que la presencia de una placa indica resistencia (McNerney *et al.*, 2000; Galí *et al.*, 2003; Simboli *et al.*, 2005).

Estudios previos, donde este método ha sido utilizado para la detección de resistencia a la RIF, han reportado un 100% de correlación entre el EAF y el sistema radiométrico BACTEC-460 (Galí *et al.*, 2003), así como un 97,7% de sensibilidad y 100% de especificidad al comparar los resultados con el MP en LJ (Simboli *et al.*, 2005). Es importante señalar que el 100% y 96% de las cepas resistentes a la RIF estudiadas por Galí *et al.*, y Simboli *et al.*, respectivamente, mostraban además resistencia a la INH, corroborándose la utilidad de esta técnica como una herramienta útil para la predicción de MDR.

El EAF se encuentra disponible comercialmente mediante el estuche *FASTPlaqueTB*<sup>TM</sup> para el diagnóstico de la TB a partir de muestras de esputo, mientras que el *FASTPlaqueTB*<sup>TM</sup>-*MDRi* fue diseñado para estudios de

susceptibilidad a drogas antituberculosas. Ambas tecnologías utilizan micobacteriófagos específicos capaces de detectar la viabilidad de *M. tuberculosis* (Albert *et al.*, 2004; Kalantri *et al.*, 2005).

En cuanto al tiempo de incubación (90 minutos) empleado para lograr la infección de *M. tuberculosis* por el micobacteriófago D29, al igual que David *et al.*, consideramos que fue suficiente. Se señala que la mayoría de los fagos D29 pueden ser adsorbidos por las micobacterias en los primeros 20 minutos de incubación (David *et al.*, 1980<sup>b</sup>; McNerney *et al.*, 2004). No obstante, está descrito que si hay presencia de agregados bacterianos se dificulta la infección y pudiera ser necesario un período de tiempo mayor para que esta ocurra o quizás se requiera un paso de reinfección (McNerney *et al.*, 2004). Es posible que esto haya sido la causa del resultado falso negativo obtenido en el presente trabajo, después de haber realizado tres repeticiones para verificar dicho resultado.

La cinética de replicación del fago está relacionada con el tiempo de generación del huésped; David *et al.*, en 1984 señalaron que en micobacterias de crecimiento rápido la síntesis del ADN del fago se puede observar en 3-4 minutos mientras que en micobacterias de crecimiento lento se necesitan al menos 20 minutos. Se ha notificado que la liberación de los fagos ocurre antes de producirse la lisis completa y muerte de la bacteria (McNerney y Traore, 2005).

Un paso muy importante durante la realización del EAF es la remoción de los fagos exógenos que se encuentran en el medio de cultivo para garantizar que sólo sean detectados aquellos que provengan de las bacterias viables, evitándose resultados falsos positivos. En este sentido se ha reportado el uso de anticuerpos antifagos (Delbruck, 1945), hidróxido de sodio, ácido sulfúrico (David *et al.*, 1980<sup>b</sup>) y SHA a bajas concentraciones que no afectan a *M. tuberculosis* (McNerney *et al.*, 1998).

Gali *et al.*, en el 2006, emplearon el EAF para la detección de la resistencia a la INH, alcanzando una concordancia del 88,6% con el sistema radiométrico BACTEC-460; el 95,0% de las cepas mostraron un elevado nivel de resistencia (CMI > 2 µg/mL) y presentaron mutaciones en el gen *katG* (gen responsable de la resistencia a la INH en más del 64% de las cepas resistentes a esta droga).

Por su parte Da Silva *et al.* en el 2006, emplearon el EAF para la detección de resistencia a la INH y la RIF y utilizaron el MP en LJ como referencia. De las 8 cepas resistentes a la RIF detectadas por estos autores, siete se identificaron por el EAF (87,5% de sensibilidad y 100% de especificidad). Para la INH, el EAF proporcionó dos resultados discordantes siendo la sensibilidad y especificidad para esta droga del 90,0% y 88,0%, respectivamente.

Además, el EAF ha sido utilizado en estudios de identificación y susceptibilidad con cepas de *M. ulcerans*, constituyendo una herramienta útil para su diagnóstico. Este patógeno representa en muchos países tropicales, la tercera causa más frecuente de micobacteriosis en pacientes inmunocompetentes (Rybniker *et al.*, 2006).

Otra de las técnicas ampliamente utilizadas para los estudios de susceptibilidad a las drogas antituberculosas son los ensayos colorimétricos. Los primeros estudios con dichos métodos fueron reportados por Yajko *et al.*, (1995) y Collins y Franzblau (1997) quienes describieron el microensayo alamar azul (MAA) para determinar la CMI de las drogas antituberculosas; estos autores reportaron valores de concordancia de 87,9% y 97,0% al comparar los resultados con el MP en agar y el sistema radiométrico BACTEC-460, respectivamente. En 1999 Palomino y Portaels, al utilizar el MAA y una concentración crítica de las drogas, alcanzaron una concordancia con el MP en LJ del 100% para la INH y la RIF y > 91,0% para la STR y el EMB.

Hace pocos años fue identificada la RES como el principal componente del AA (Rasmussen, 1999; O'Brien *et al.*, 2000) lo que ha permitido aumentar su empleo en estudios de susceptibilidad en TB, mostrando muy buena correlación con el MP en agar (Palomino *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003). Si se tiene en cuenta que el AA se encuentra bajo patente (Kumar *et al.*, 2005<sup>a</sup>), se hace más económico el empleo de la RES facilitándose la introducción de este ensayo en laboratorios con limitados recursos económicos.

Palomino *et al.*, en el 2002 emplearon la RES para determinar la CMI de la INH y la RIF y encontraron que el 98% de las cepas resistentes a la RIF tenían una CMI elevada ( $> 2 \mu\text{g/mL}$ ), logrando de esta forma una fácil discriminación entre cepas sensibles y resistentes; en dicho estudio la especificidad notificada fue del 96,2% y 100% para la INH y la RIF, respectivamente y la sensibilidad del 100% para ambas drogas.

Abate *et al.*, y Mshana *et al.*, ambos en 1998, utilizaron el ensayo colorimétrico MTT, previamente descrito por Mosmann en 1983 para medir viabilidad en cultivos celulares, para la detección de resistencia a la RIF; estos autores encontraron una perfecta correlación con el sistema radiométrico BACTEC-460. Años más tarde, Foonglada *et al.*, en el 2002, obtuvieron una concordancia del 97% entre el micrométodo MTT y el MP en LJ cuando estudiaron 254 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* frente a la INH y la RIF.

Caviedes *et al.*, (2002), emplearon los MAA y MTT para determinar la CMI a las drogas antituberculosas de primera línea, alcanzando una mayor correlación para la INH y la RIF. Estos autores, al disolver el MTT en una mezcla de etanol y Tween 80, lograron eliminar el paso de solubilización del formazán.

Recientemente, Da Silva *et al.*, (2006), compararon los MAA y MTT con el EAF para la detección de resistencia a la INH y la RIF y obtuvieron una concordancia,

medida a través del estadígrafo kappa, de 0,886 para la INH y 1 para la RIF para los ensayos colorimétricos al comparar los resultados con el MP en LJ.

Otra sal de tetrazolio empleada para detectar resistencia a las drogas antituberculosas es el XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio-5-carboxinilide). En un estudio realizado por De Logu *et al.*, (2001), se comparó los resultados obtenidos con la utilización de dos sales del tetrazolio, MTT y XTT. Al analizar sus resultados encontraron muy buena correlación entre ambas, con la ventaja que el ensayo con XTT no requiere del paso de adición del *buffer* de solubilización, pues el formazán que se obtiene es soluble en agua.

El pasado año, fue propuesto el 2,3-difenil-5-dienil-(2)-cloruro de tetrazolio, para estudios de susceptibilidad con *M. tuberculosis*. Este compuesto con propiedades de oxidación reducción ha sido añadido al medio de cultivo Middlebrook 7H10 y cambia de incoloro a rojo indicando la viabilidad de *M. tuberculosis* (Lee *et al.*, 2006).

Desde hace varios años el LNR-TB-IPK, investiga la implementación de los ensayos colorimétricos y dispone de trabajos previos al nuestro. Estudios realizados por Cabrera y Montoro, evaluaron y estandarizaron el MAA y el ensayo colorimétrico MTT, respectivamente, utilizando un reducido número de cepas de *M. tuberculosis* (Cabrera, 1999; Montoro, 2003).

Los ensayos colorimétricos proporcionan valores de CMI y su aplicación requiere establecer criterios que permitan diferenciar cepas sensibles de resistentes. Para realizar el análisis estadístico de los ensayos cuantitativos, cuyos resultados presentan más de dos categorías ordinales o una escala continua, es imprescindible establecer un punto de corte que permita diferenciar resultados positivos y negativos o sea, resistentes y sensibles, siendo factible la evaluación mediante el análisis de la curva ROC. El valor del ABC indica la concordancia del ensayo, siendo un ensayo

perfecto cuando el  $ABC=1$  (Zweig y Campbell, 1993; Luna-Herrera *et al.*, 2003). El análisis de la curva ROC propone como punto de corte una concentración con la cual se obtienen simultáneamente la mayor sensibilidad y especificidad.

Para dar respuesta al tercer objetivo de nuestro trabajo se evaluaron 100 cepas de *M. tuberculosis* mediante los ensayos colorimétricos y el MNR. Para el análisis de los resultados de los ensayos colorimétricos fueron construidas las curvas ROC, alcanzándose los mismos puntos de corte para cada una de las drogas, siendo estos valores para la INH y la RIF iguales a los reportados con anterioridad por Luna-Herrera *et al.*, (2003), 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para ambas drogas; en el caso de la STR y el EMB nuestros resultados se correspondieron con una concentración menor a la reportada por estos autores. La sensibilidad alcanzada para la INH y la RIF fue del 100% mientras que para la STR y el EMB este parámetro fue  $\geq 91,7\%$  y  $94,1\%$ , respectivamente. Los valores de especificidad fueron del  $96,4\%$ ,  $88,5\%$ ,  $> 57,8\%$  y  $> 98,4\%$  para la INH, la STR, el EMB y la RIF, respectivamente. La concordancia total fue  $90,7\%$  para el microensayo MTT y  $88,2\%$  para el microensayo RES. Como se puede observar para la STR y el EMB la especificidad fue baja, pues se encontró un gran número de resultados falsos positivos, lo cual sugiere un deterioro de dichas drogas al ser utilizadas en medio líquido.

Al comparar los valores del ABC entre los microensayos MTT y RES, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las drogas. Los resultados del ensayo RES, fueron similares a los reportados por Luna-Herrera *et al.*, (2003) al utilizar el MAA; en el caso del EMB, estos autores observaron mejores resultados ( $ABC=0,97$ ) que los nuestros ( $ABC=0,83$ ), los que estuvieron influenciados por un elevado número de resultados falsos positivos. Otros autores, señalaron valores de ABC superiores a 0,9 para las cuatro drogas antituberculosas de primera línea cuando estas fueron evaluadas mediante los MAA y MTT en 21 cepas de *M. tuberculosis* (Porrás *et al.*, 2005).

Con anterioridad se han descrito dificultades durante la evaluación de la actividad antituberculosa de la STR y el EMB. En el EMB estas dificultades han sido atribuidas al efecto bacteriostático de la droga sobre *M. tuberculosis*, a su poca actividad en los medios de cultivos y al estrecho rango que existe entre la CMI de las cepas sensibles y resistentes (Heifets, 1986; Gangadharam *et al.*, 1990; Madison *et al.*, 2002). Es por esto que deben tenerse en cuenta los diferentes parámetros que pueden interferir durante la ejecución de las pruebas de resistencia con estas drogas, más aún, si existen dificultades al estudiarlas con los métodos estandarizados.

En un estudio realizado en 1997 por Laszlo *et al.*, se compararon los resultados obtenidos por varios métodos convencionales como el MP en LJ, el MP en agar y el sistema radiométrico BACTEC-460, obteniéndose valores de concordancia de 99,0% y 94,0% para la INH y la RIF, respectivamente, mientras que para la STR y el EMB estos resultados fueron más bajos, 88,0% y 66,0%, respectivamente. Estas discrepancias se pueden minimizar luego de estudios que definan la concentración crítica y proporción crítica, el tiempo de lectura de los resultados y garantizando la corrección de la potencia de la droga.

Los ensayos colorimétricos también han sido empleados para determinar la CMI a las drogas antituberculosas de segunda línea (Collins y Franzblau, 1997; Bastian *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003; Morcillo *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Umubyeyi *et al.*, 2006), estudios con la PZA (Martin *et al.*, 2006<sup>a</sup>), para el diagnóstico directo de la resistencia (Abate *et al.*, 2004) y para evaluar la respuesta al tratamiento de los pacientes con TB pulmonar (Farnia *et al.*, 2004<sup>a, b</sup>).

Dentro de las principales ventajas de los ensayos colorimétricos se destaca que el empleo del formato de microplacas permite evaluar varios aislamientos y drogas simultáneamente, con pocos volúmenes de reactivos y los resultados se obtienen en un corto período de incubación. No obstante, estos ensayos tienen desventajas, destacándose, la subjetividad durante la realización de la lectura, los riesgos

asociados a la bioseguridad pues al manipular medio líquido se pueden generar aerosoles, por otra parte las micobacterias durante su crecimiento en medio líquido suelen formar grumos dificultando la difusión de la droga y se debe tener en cuenta que en formato de placas pueden producirse contaminaciones.

Para disminuir los riesgos asociados con la bioseguridad se ha propuesto realizar estos ensayos en tubos con tapa de rosca (Abate *et al.*, 1998; Mshana *et al.*, 1998; Foonglada *et al.*, 2002; Coban *et al.*, 2006<sup>a</sup>) y para evitar la formación de agregados bacterianos, adicionarle al medio de cultivo Tween 80 que ayuda a dispersar la biomasa (Coban *et al.* 2006<sup>a</sup>).

Recientemente, Martin *et al.*, 2006<sup>b</sup>, realizaron un meta-análisis para investigar la concordancia de los ensayos colorimétricos en detectar la resistencia de *M. tuberculosis* a la INH y a la RIF. Este trabajo tomó en consideración 18 publicaciones realizadas en los últimos 40 años y puso de manifiesto una vez más, que con el empleo de las técnicas colorimétricas se obtiene una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de resistencia a dichas drogas.

La capacidad de *M. tuberculosis* de reducir el nitrato a nitrito permitió adaptar el MNR para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas, empleándose la presencia de nitrito como un indicador de viabilidad celular. Este método ofrece una elevada especificidad, debido a que la reducción del nitrato es una de las pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de *M. tuberculosis* (Golyshvskaja *et al.*, 1996; Ängeby *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2005<sup>a</sup>; Kumar *et al.*, 2005<sup>b</sup>).

En el 2002 Ängeby *et al.*, emplearon el MNR para estudios de susceptibilidad en TB, utilizando el medio LJ con KNO<sub>3</sub> y las drogas antituberculosas a la misma concentración crítica que emplea el MP en LJ. En mencionado estudio, tomando

como referencia los resultados obtenidos con el sistema radiométrico BACTEC-460, se alcanzó una concordancia del 100% para la RIF y valores de sensibilidad y especificidad > 90% para el resto de las drogas antituberculosas de primera línea.

El LNR-TB-IPK estandarizó y evaluó el MNR en 80 cepas de *M. tuberculosis* en el año 2003, comprobando la utilidad de dicho método para la detección rápida de cepas resistentes, sin requerir cambios en la dinámica de trabajo del laboratorio (Montoro, 2003). Los resultados del MNR también han sido comparados con el MP en agar, reportándose 100% de concordancia para la INH y la RIF (Coban *et al.*, 2004) y con el MP en LJ, alcanzándose valores de concordancia superiores al 99% para las cuatro drogas antituberculosas de primera línea (Sethi *et al.*, 2004).

En la evaluación del MNR para la detección de la resistencia de 100 cepas de *M. tuberculosis* frente a las drogas de primera línea, uno de los objetivos trazados en nuestra tesis, pudimos constatar que se obtuvieron buenos resultados en todas las drogas investigadas. Estos resultados sugieren que el haber empleado el medio LJ y encontrarse las drogas bajo las mismas condiciones que en el MP (técnica de referencia), pudo haber favorecido la obtención de nuestros resultados.

Los resultados obtenidos al investigar 320 cepas de *M. tuberculosis* utilizando el MNR mostraron porcentajes elevados en cuanto a la sensibilidad, especificidad y concordancia. Es importante señalar que una cifra elevada de las cepas estudiadas (235), fueron remitidas al LNR-TB-IPK por parte de los laboratorios que integran la red nacional con el objetivo de realizar la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*. La disponibilidad de este método hizo posible conocer las susceptibilidad de las mismas en un corto período de tiempo (menos de 14 días de realizada la técnica) y resultó el primer trabajo a nivel internacional que incorporó el MNR para la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*.

Otra alternativa de aplicación del MNR fue descrita por Syre *et al.*, (2003) utilizando el medio líquido Middelbrook 7H9; Estos autores emplearon el MNR para detectar cepas resistentes a la INH y a la RIF, obteniendo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 94% para la INH y resultados igualmente satisfactorios para la RIF: sensibilidad del 95% y especificidad del 100%, al comparar los resultados con los obtenidos mediante el sistema radiométrico BACTEC-460.

En otro estudio recientemente realizado por Syre *et al.*, se reportó la aplicación del MNR en medio líquido para detectar resistencia a la STR y el EMB. Estos autores utilizaron como referencia el sistema radiométrico BACTEC-460 y además emplearon otros sistemas comerciales (*MGIT* y *E-Test*). De esta forma alcanzaron una sensibilidad del 73,0% y 64,0% para la STR y el EMB, respectivamente, siendo la especificidad superior al 92,0% para las dos drogas. El *MGIT* mostró una concordancia con el BACTEC-460 del 89,0% y 80,0% para la STR y el EMB, respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto una vez más la baja sensibilidad de los ensayos con medio líquido para evaluar drogas como la STR y el EMB, lo que sugiere una redefinición de la concentración de estas drogas para ser empleadas en este tipo de medio (Syre *et al.*, 2006).

El MNR también ha sido empleado para determinar CMI, reportándose una excelente correlación con el MAA (Kumar *et al.*, 2005<sup>a</sup>). Estos autores al comparar estos microensayos con el MP en agar reportaron una concordancia del 96%,100% y > 98,0% para la INH, la RIF y el EMB, respectivamente.

Kumar *et al.*, (2005<sup>b</sup>) consideran que la desventaja de emplear el medio LJ para la ejecución del MNR es que las drogas, al ser incorporadas antes de la coagulación, están expuestas a altas temperaturas por lo que pueden perder potencia; sin embargo debe tenerse en cuenta que el MP en LJ es la técnica de referencia y durante la elaboración del medio LJ las drogas también son sometidas a 85°C

durante 50 minutos; estas incertidumbres se eliminan evaluando para cada lote de medio cepas controles con patrones de susceptibilidad / resistencia conocidos para cada una de las drogas.

Durante el revelado del MNR debe tenerse presente que la reducción del nitrato puede dar lugar a productos más reducidos como amoniaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso o hidroxilamina, en tal caso, no se aprecia cambio de color en el medio. Para evitar este inconveniente y confirmar que el proceso resultó negativo, es imprescindible añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc, el cual, en el caso que existan nitratos, los reducirá a nitritos inmediatamente, volviendo el medio de color rojo e indicando consecuentemente que antes no se había producido la reducción; si después de la adición del polvo de zinc no hay desarrollo de color rojo esto nos indica que el proceso de reducción ocurrió y que el producto obtenido no fue el nitrito (Virtanen, 1960; Ängeby *et al.*, 2002). En el presente estudio, durante la ejecución del MNR ninguna cepa produjo un compuesto más reducido que el NO<sub>2</sub>, no siendo necesario la realización de mencionado paso para evidenciar el proceso de reducción.

Recientemente se reportó el empleo del MNR para la detección de resistencia a ofloxacina, droga de segunda línea en el tratamiento de la TB. Martin *et al.*, (2005) encontraron una perfecta correlación con el MP en agar, el *MGIT* y el microensayo RES.

El MNR ha sido también utilizado para el diagnóstico directo de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea, lográndose obtener los resultados con una considerable reducción del tiempo (10-28 días). Musa *et al.*, (2005) alcanzaron valores de sensibilidad del 100%, 93%, 76% y 55% para la RIF, la INH, la STR y el EMB, respectivamente con una especificidad superior al 99% para todas las drogas; mientras que, Solis *et al.*, también en el 2005, aplicaron dicho ensayo para

detectar resistencia a la INH y a la RIF, logrando una especificidad del 100% para ambas drogas y valores de sensibilidad del 99,1% para la INH y 93,5% para la RIF.

La principal ventaja de los métodos directos es la disminución del tiempo necesario para obtener los resultados de la susceptibilidad de *M. tuberculosis*. Además existe una mayor representación de la población bacilar original que está afectando al paciente (Ramachandran y Paramasivan, 2003; Parsons *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos autores prefieren las técnicas indirectas pues el inóculo se puede ajustar con mayor uniformidad y las bacterias se encuentran metabólicamente activas (Parsons *et al.*, 2004).

Una posible limitante del MNR para el diagnóstico directo es que algunas micobacterias atípicas (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens* y *M. terrae*), son capaces de reducir el nitrato y por otra parte no es aplicable para todas las especies pertenecientes al complejo TB, pues *M. bovis* no es capaz de reducirlo (Kent y Kubica, 1985). Esta limitación obliga a realizar el aislamiento de la cepa y su posterior identificación con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos con el MNR directo.

Innegablemente, la introducción de métodos genotípicos y fenotípicos abre nuevas posibilidades para los estudios de susceptibilidad a las drogas antituberculosas. Los primeros tienen la ventaja de ser rápidos y específicos, pero muy costosos (Palomino, 2000; Schluger, 2001; Palomino, 2005). Mientras que, los métodos fenotípicos requieren aún de una evaluación y validación minuciosa para obtener niveles aceptables de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad antes de que puedan reemplazar los métodos convencionales. Estas técnicas han sido desarrolladas ante la demanda de dar un resultado de la susceptibilidad rápido y seguro, pero para lograr la validación de las mismas, deben analizarse cepas sensibles y resistentes en varios laboratorios y comparar los resultados con un método convencional.

Recientemente, el LNR-TB-IPK tuvo la posibilidad de participar en dos estudios multicéntricos internacionales, también objetivos de esta tesis. El propósito de estos estudios fue evaluar los ensayos colorimétricos y el MNR como herramientas alternativas para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea, lo cual permitió comparar nuestros resultados con los del resto de los laboratorios participantes y evaluar la reproducibilidad de dichos métodos ante diferentes condiciones de trabajo. Precisamente, estos estudios constituyen un paso inicial en la validación de los ensayos colorimétricos y el MNR pues un mismo panel de cepas de *M. tuberculosis* bien caracterizado fue utilizado para verificar el funcionamiento de dichas técnicas. Para el LNR-TB-IPK la participación en estos estudios valió para demostrar la calidad de nuestro laboratorio en la ejecución de estos métodos.

Al comparar nuestros resultados con los del resto de los laboratorios (seis de Latinoamérica), para los ensayos colorimétricos, se pudo apreciar que la INH y la RIF fueron las drogas para las cuales se obtuvieron los mejores resultados, alcanzándose una concordancia global  $> 98,5\%$  y  $> 97,5\%$  para los microensayos con MTT y RES, respectivamente. A pesar de ser el EMB una droga que con frecuencia presenta dificultades en su evaluación, mostró buenos resultados en nuestro trabajo y una vez más la STR fue la droga con mayor cantidad de resultados discordantes, siendo el rango de sensibilidad y especificidad para esta droga del 75-100% y 72,2-100%, respectivamente.

Con la aplicación del MNR nuestro laboratorio alcanzó una concordancia global del 94,5%. Al comparar nuestros resultados con los otros laboratorios participantes (tres de Latinoamérica y uno de Europa), se pudo apreciar que con excepción de la STR, para todas las drogas los resultados de sensibilidad oscilaron entre el 86,6-100%, mientras que la especificidad fue del 100% en todos los laboratorios para la RIF y  $> 94,4\%$  para la INH y el EMB. Al igual que con los ensayos colorimétricos, la STR fue la droga que mostró mayores dificultades, la

sensibilidad osciló para esta droga entre 41,7-91,6% y la especificidad entre 88,9-100%.

De acuerdo a los criterios establecidos por la red supranacional de laboratorios de la OMS/UICTER, los valores de concordancia que constituyen metas en la ejecución de pruebas de susceptibilidad con drogas antituberculosas de primera línea son: 97% para la INH, 92% para la STR y el EMB y 99% para la RIF (Laszlo *et al.*, 2002); de esta forma la concordancia alcanzada mediante la aplicación del MNR y los ensayos colorimétricos en los estudios multicéntricos fue buena para la INH, la RIF y el EMB, mientras que para la STR se encuentra por debajo de las metas mencionadas.

Una alternativa para la detección de resistencia al EMB, droga que ha mostrado disímiles dificultades al ser evaluada en estudios de susceptibilidad, pudiera ser la aplicación de las técnicas moleculares, teniéndose en cuenta que la resistencia al EMB ocurre con predominio en el codón 306. Johnson *et al.*, (2006) reportaron una técnica basada en la RCP para detectar resistencia a esta droga, alcanzando un 100% de especificidad y un 97% de sensibilidad al comparar los resultados con el sistema radiométrico BACTEC-460. Aunque, este método tiene la limitante de no detectar mutaciones fueran del gen *embB* (menos del 10%).

Otra alternativa para evaluar la susceptibilidad a las drogas antituberculosas de primera línea es el empleo del medio de agar sangre. La utilización de este medio reduce considerablemente el tiempo de incubación de *M. tuberculosis*, obteniéndose resultados de susceptibilidad perfectamente comparables con el MP en agar en un período de 2 semanas de incubación (Coban *et al.*, 2005; Coban *et al.*, 2006<sup>b</sup>).

En los últimos años se han propuesto numerosos métodos para la detección rápida de resistencia en *M. tuberculosis*. Para que estos puedan convertirse en una

alternativa real para el diagnóstico de la resistencia en TB, deben ser adaptados para su empleo en cepas y muestras clínicas. También deben ser evaluados en ensayos clínicos bien diseñados y controlados en áreas endémicas, así como en regiones con limitados recursos económicos, donde la aplicación de estas pruebas se hace necesaria para un mejor manejo de la enfermedad (Palomino, 2006).

Indudablemente, se han realizado numerosos esfuerzos por reducir el tiempo en el cual se obtienen los resultados de las pruebas de resistencia y este trabajo ha permitido demostrar la aplicabilidad de las nuevas técnicas para la detección de resistencia al menos a la INH y la RIF, las dos drogas más importantes del tratamiento y que definen la MDR. Aunque, el EAF se utilizó sólo para la detección de resistencia a la RIF, consideramos que su empleo fue valioso, tomando en consideración que la monorresistencia a la RIF es poco frecuente y en la mayoría de las ocasiones aparece asociada con la resistencia a la INH.

Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de cada uno de los nuevos métodos se ha reportado que los ensayos colorimétricos y el EAF podrían ser apropiados para laboratorios de referencia con los recursos y condiciones de bioseguridad que estas técnicas exigen, mientras que el MNR sería ideal para laboratorios que realizan de rutina estudios de susceptibilidad (Palomino, 2005).

Tomando en consideración los resultados obtenidos en este trabajo y los reportes realizados internacionalmente, así como las posibilidades que brindan estas técnicas en cuanto a rapidez, facilidad de ejecución y confiabilidad de los resultados y que las mismas pueden ser útiles para evaluar drogas de segunda línea, así como para el diagnóstico directo a partir de muestras clínicas. Consideramos que en un futuro, estos métodos pueden convertirse en una herramienta de gran valor para países de limitados recursos económicos debido a que sólo requieren el equipamiento microbiológico mínimo para su ejecución.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los métodos evaluados para la detección de la resistencia de *M. tuberculosis* a la rifampicina mostraron una concordancia total al ser comparadas con las técnicas de referencia.
2. Al aplicar el ensayo de amplificación de fagos se obtuvo una elevada sensibilidad y especificidad, obteniéndose los resultados en 48 horas.
3. Al evaluar los ensayos colorimétricos y el método de la nitrato reductasa para la detección de la resistencia de *M. tuberculosis* a las 4 drogas antituberculosas de primera línea, se obtuvieron los mejores resultados para la isoniacida y la rifampicina.
4. La aplicación del método de la nitrato reductasa mostró sensibilidad y especificidad elevada para las 4 drogas evaluadas, constituyendo el primer trabajo publicado a nivel internacional donde se evalúa este método para la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*.
5. La participación en el estudio multicéntrico demostró la confiabilidad de los resultados alcanzados por el LNR-TB-IPK al evaluar los ensayos colorimétricos y el método de la nitrato reductasa para la detección de resistencia a las 4 drogas antituberculosas de primera línea.
6. Los ensayos colorimétricos, el método de la nitrato reductasa y el ensayo de amplificación de fagos constituyen una alternativa rápida y de fácil ejecución para la detección de cepas multidrogoresistentes en países con limitados recursos económicos.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios que permitan aumentar la especificidad de los ensayos colorimétricos para la detección de la resistencia de *M. tuberculosis* a la estreptomycinina y el etambutol.
2. Estandarizar el ensayo de amplificación de fagos para la detección de resistencia a la isoniacida en *M. tuberculosis*.
3. Incorporar en el LNR-TB-IPK un método rápido para la detección de resistencia a la pirazinamida en *M. tuberculosis*.
4. Evaluar el método de la nitrato reductasa para la detección directa de resistencia a las drogas antituberculosas en muestras de esputo con baciloscopía positiva.
5. Aplicar el método de la nitrato reductasa y los ensayos colorimétricos para la detección de la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas de segunda línea (kanamicina, amikacina, ciprofloxacina, ofloxacina, capreomicina, ácido para-amino salicílico).

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

### VIII.1. Referencias Bibliográficas

- Abate G, Mshana RN, Miorner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3(4,5 - dimethyl thiazol -2 - yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:1011-6.
- Abate G, Aseffa A, Selassie A, Goshu S, Fekade B, Woldemeskal D, *et al.* Direct colorimetric assay for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2004;42:871-3.
- Ahmad S, Mokaddas E, Fares E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. Diagn Microbiol Infect Dis 2002;44:245-52.
- Akcali S, Cicek C, Surucuoglu S, Ozbakkaloglu B. E-test: an alternative method for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Med Princ Pract 2005;14:264-7.
- Albert H, Trollip A, Seaman T, Mole RJ. Simple, phage-based (*FASTPlaque*) technology to determine rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum. Int J Tuberc Lung Dis 2004;8:1114-9.
- Ängeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol 2002;40:553-5.
- Aranaz A, Liebana E, Gómez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol 1999;49:1263-73.
- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53:1785-9.

- Aziz MA, Wright A. The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease global project on surveillance for anti-tuberculosis drug resistance: A Model for Other Infectious Diseases. Clin Infect Dis 2005;41:258-62.
- Barry CE, Mdluli K. Drug sensitivity and environmental adaptation of Mycobacterial cell wall components. Trends Microbiol 1996;4:275-81.
- Bastian I, Portaels F. Multidrug-resistant tuberculosis: past, present and future. En: Bastian I, Portaels F editores. Multidrug-resistant tuberculosis. Boston, London: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 2000.p:1-12.
- Bastian I, Rigouts L, Palomino JC, Portaels F. Kanamycin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using mycobacterium growth indicator tube and a colorimetric method. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1934-6.
- Becerra MC, Bayona J, Freeman J, Farmer PE, Kim JY. Redefining MDR-TB transmission 'hot spot'. Int J Tuberc Lung Dis 2000;4:387-94.
- Besra GS, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bloom BR, editor. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994.p:285-306.
- Blanchar JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Biochem 1996;65:215-65.
- Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of Mycobacteria. Annu Rev Biochem 1995;64:29-63.
- Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2003;83:91-7.
- Brodie D, Schluger NW. The diagnosis of Tuberculosis. Clin Chest Med 2005;26:247-71.
- Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Micobacterias. En: Jawetz, Melnick, Adelberg, editores. Microbiología Médica. 16a ed. México DF: El Manual Moderno; 1999.p:343-50.

- Cabrera A. Microensayo Azul Alamar. Una alternativa para la detección rápida de resistencia a antimicrobianos en *Mycobacterium tuberculosis*. Instituto Pedro Kourí [Tesis de Diploma]. Universidad de La Habana; 1999.
- Caminero JA. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. Arch Bronconeumol 2001;37:35-42.
- Canetti G, Rist N, Grosset JM. Measure de la sensibilité du bacille aux drogues antibacilaire pour la methode des proportions, methodologie, critere de resistanse, results, interpretation. Tuberc Pneumol 1963;27:217-72.
- Canetti G, Fox W, Khomenko AI. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. Bull World Health Organ 1969;41:21-43.
- Casal R. Microbiología Clínica de las enfermedades por micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis). Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba, España; 1990.
- Caviedes L, Delgadoand J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002;40:1873-4.
- Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. J Clin Microbiol 2002;40:4435-8.
- Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs - Worldwide, 2000-2004. MMWR 2006<sup>a</sup>;55:301-8.
- Centers for Disease Control and Prevention. Revised Definition of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. MMWR 2006<sup>b</sup>;55:1169-92.
- Chan ED, Heifets L, Iseman MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. Tuber Lung Dis 2000;80:131-40.

- Chopra I, Brennan P. Molecular action of antimicrobial agents. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;78:89-98.
- Coban AY, Birinci A, Ekinci B, Durupinar B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:106-8.
- Coban AY, Bilgin K, Uzun M, Fisgin NT, Akgunes A, Cihan CC, *et al.* Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and Rifampin on Blood Agar. *J Clin Microbiol* 2005;43:1930-1.
- Coban AY, Cekic CC, Bilgin K, Uzun M, Akgunes A, Cetinkaya E, *et al.* Rapid susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin with resazurin method in screw-cap tubes. *J Chemother* 2006<sup>a</sup>;18:140-3.
- Coban AY, Cihan CC, Bilgin K, Uzun M, Akgunes A, Cetinkaya E, *et al.* Blood agar for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first-line drugs. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006<sup>b</sup>;10:450-3.
- Cockerill FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:199-212.
- Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis* 2003;3:13-21.
- Colangeli R, Helb D, Sridharan S, Sun J, Varma-Basil M, Hazbón MH, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol* 2005;55:1829-40.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
- Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:299-308.

- Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC-460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1004-9.
- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004;22:299-305.
- Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2003;53:1305-14.
- Da Silva PA, Boffo MMS, De Mattos IG, Silva ABS, Palomino JC, Martin A, *et al.* Comparison of redox and D29 phage methods for detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect 2006;12:293-6.
- David HL, Clavel S, Clement F, Moniz J. Effects of antituberculosis and antileprosy drugs on mycobacteriophage D29 growth. Antimicrob Agents Chemother 1980<sup>a</sup>;18:357-9.
- David HL, Clavel S, Clement F. Adsorption and growth of the bacteriophage D29 in selected mycobacteria. Ann Virol 1980<sup>b</sup>;131:167-84.
- David HL, Clavel S, Clement F, Rastogi N. Further observations on the mycobacteriophage D29-mycobacterial interactions. Acta Leprol 1984;2:359-67.
- Deland FH, Wagner HN. Early detection of bacterial growth, with carbon-14-labeled glucose. Radiology 1969;92:154-5.
- Delbruck M. Effect of specific antisera on the growth of bacterial viruses. J Bacteriol 1945;50:137-50.
- De Logu A, Uda P, Pellerano ML, Pusceddu MC, Saddi B, Schivo ML. Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, isoniazid and streptomycin in liquid medium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:33-9.

- De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:36-52.
- Draper P. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. *Res Microbiol* 1991;42:420-2.
- Drobniowski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A molecular story. *J Med Microbiol* 1998;47:189-96.
- Duncan K. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis* 2003;83:201-7.
- Eltringham IJ, Drobniowski FA, Mangan A, Butcher PD, Wilson SM. Evaluation of reverse transcription-PCR and bacteriophage-based assay for rapid phenotypic detection of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999<sup>a</sup>;37:3524-7.
- Eltringham IJ, Wilson SM, Drobniowski FA. Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999<sup>b</sup>;37:3528-32.
- Enarson DA, Rieder HL, Arnadottir T, Trébuq A. Management of TB. A guide for low income country. 5ta ed. IUATLD. Paris; 2000.p:3-10.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microb Reviews* 2006;19:165-256.
- Esteban J, Ortiz A, Jimenez MS. Usefulness of E-test strips for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:856-7.
- Farga V. La conquista de la tuberculosis. *Rev Chil Enf Respir* 2004;20:101-10.
- Farnia P, Mohammadi F, Mirsaedi M, Zarife AZ, Tabatabee J, Bahadori K, *et al.* Application of Oxidation-Reduction Assay for Monitoring Treatment of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004<sup>a</sup>;42:3324-5.

- Farnia P, Mohammadi F, Mirsaedi M, Zarife AZ, Tabatabee J, Bahadori K, *et al.* Bacteriological follow-up of pulmonary tuberculosis treatment: a study with a simple colorimetric assay. *Microbes Infect* 2004<sup>b</sup>;11:972-6.
- Fegou E, Jelastopulu E, Nicolaou S, Sevdali M, Anagnostou S, Kanavaki, *et al.* Comparison of the Manual Mycobacteria Growth Indicator Tube and the E-test with the Method of Proportion for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemother* 2006;52:174-7.
- Foonglada S, Roengsunthia D, Arjratanakool W, Chuschottaworn C, Chaisprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:1118-22.
- Franzblau SG, Wtzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernández A, *et al.* Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue Assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:362-6.
- Galí N, Domínguez J, Prat J, Quesada MD, Matas L, Ausina V. Utility of an in-house mycobacteriophage based assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:2647-9.
- Galí N, Domínguez J, Blanco S, Prat C, Alcaide F, Coll P, *et al.* Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to Isoniazid and Influence of Resistance Level on Assay Performance. *J Clin Microbiol* 2006;44:201-5.
- Gangadharam PR, Pratt FP, Perumal VK, Iseman MD. The effects of exposure time, drug concentration and temperature on the activity of ethambutol versus *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:1478-82.
- García de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:349-59.
- Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:267-74.

- Golyshevskaja VI, Korneev AA, Chernosova IN, Selina IG, Kasarova TA, Grishina TD, *et al.* New microbiological techniques in diagnosis of tuberculosis. *Prob Tuberk* 1996;6:22-5.
- Gómez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta R. Determinations of MICs for *Mycobacterium avium intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric methods. *J Clin Microbiol* 1995;33:1842-6.
- González E, Caraballoso M, Sevy J, Báez AL, Valdivia JA, Jaime A, *et al.* Resultados del seguimiento de casos de tuberculosis en las zonas de verificación. *Bol Hig Epid* 1974;12:229-40.
- González E, Armas L, Machín A. The trends by a province of tuberculosis in Cuba: 1979-1993. *Bol Of Sanit Panam* 1995;19:369-404.
- Grange JM. The biology of the genus *Mycobacterium*. *J Appl Bacteriol Suppl* 1996;81:1-9.
- Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S, Roudinskii N, Donnikov M, Pankov S, *et al.* Evaluation of hybridization on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:531-9.
- Guevara A, Juárez A, Zenteno R. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. *Med Unab* 2003;6:46-51.
- Hatfull G. The molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;215:29-47.
- Hazbon MH, Guarín N, Ferro BE, Rodríguez AL, Labrada LA, Tovar R, *et al.* Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:4865-9.
- Heifets LB. Ethambutol MICs and MBCs for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:927-32.
- Heifets L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility test in mycobacteriology. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1217-22.

- Heifets L, Lindholm-Levy PJ. Is PZA bactericidal against *Mycobacterium tuberculosis*? Am Rev Respir Dis 1990;141:250-2.
- Heifets L, Cangelosi CA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* a neglected problem at the turn of the century. Int J Tuberc Lung Dis 1999;3:564-81.
- Heifets L. Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bastian I, Portaels F, editores. Multidrug-resistant tuberculosis. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2000.p:90-9.
- Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2005;43:3699-703.
- Idigoras P, Beristain X, Iturzaeta A, Vicente D, Perez-Trallero E. Comparison of the automated nonradiometric BACTEC/MGIT-960 system and Löwenstein Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. Eur J Clin Microb Infect Dis 2000;19:350-4.
- Johnson R, Jordaan AM, Pretorius L, Engelke E, Van der Spuy G, Kewley C, et al. Ethambutol resistance testing by mutation detection. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10:68-73.
- Kalantri S, Pai M, Pascopella L, Riley L, Reingolg A. Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2005;5:59.
- Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. Cell Microbiol 2004;6:105-16.
- Kent PT, GP Kubica. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Department of Health and Human Services Atlanta 1985:96-103.
- Kim SJ. Series Drug susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. Eur Respir J 2005;25:564-9.

- Kruuner A, Yates MD, Drobniowski FA. Evaluation of MGIT-960 based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006;44:811-8.
- Kumar M, Khan IA, Verma V, Qazi GN. Microplate nitrate reductase assay versus Alamar Blue assay for MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2005<sup>a</sup>;9:939-41.
- Kumar M, Khan IA, Verma V, Kalyan N, Qazi GN. Rapid, inexpensive MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate nitrate reductase assay. Diag Microb Infect Dis 2005<sup>b</sup>;53:121-4.
- Kwon HH, Tomioka H, Saito H. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. Tuber Lung Dis 1995;76:141-8.
- Laszlo A, Rahman M, Raviglione M, Bustreo F, WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. Int J Tuberc Lung Dis 1997;1:231-8.
- Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M, WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. Int J Tuberc Lung Dis 2002;6:748-6.
- Leão S, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo JC, Telles MA, *et al.* Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden Broele, Brugge, Belgium, 2004.
- Lee AS, Teo ASM, Wong SY. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2157-9.

- Lee S, Kong GH, Yun SH, Lee KR, Lee KP, Franzblau SG, *et al.* Evaluation of a modified antimycobacterial susceptibility test using Middlebrook 7H10 agar containing 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride. *J Microbiol Methods* 2006;66:548-51.
- Leung ETY, Ho PL, Yuen KY, Woo WL, Lam TH, Kao RY, *et al.* Molecular characterization of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a novel mutation in *inhA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1075-8.
- Luna-Herrera J, Martínez-Cabrera G, Parra-Maldonado R, Encino-Moreno JA, Torres-López J, Quesada-Pascual F, *et al.* Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:21-7.
- Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, *et al.* Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol* 2002;40:3976-9.
- Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44:350-2.
- Marín M, García de Viedma D, Ruíz-Serrano MJ, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4293-300.
- Marrero A, Carreras L. El Programa de Control de la Tuberculosis en Cuba. *Rev Cub Med Gen Integr* 1996;12:381-5.
- Marrero A, Carreras L, Valdivia JA, Montoro E, González E, Torres R, *et al.* Dirección Nacional de Epidemiología. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos. La Habana: Ciencias Médicas Cuba, 1999.

- Marrero A, Caminero JA, Rodríguez R, Billo NE. Towards elimination of tuberculosis in a low income country: the experience of Cuba, 1962-1997. *Thorax* 2000;55:39-45.
- Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second line drugs: rapid, simple and inexpensive method. *J Antimicrob Agent Chemother* 2003;47:3616-9.
- Martin A, Palomino JC, Portaels F. Rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low cost methods: Resazurin and Nitrate Reductase Assay. *J Clin Microbiol* 2005;43:1612-6.
- Martin A, Takiff HE, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2006<sup>a</sup>;58:327-31.
- Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2006<sup>b</sup> (En prensa).
- Masjedi MR, Farnia P, Sorooch S, Pooramiri MV, Mansoori SD, Zarifi AZ, *et al.* Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: 2 Years of Surveillance in Iran. *Clin Infect Dis* 2006;43:841-7.
- McNerney R, Wilson SM, Sidhu AM, Harley VS, Suwaidi Z, Nye PM, *et al.* Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1998;149:487-95.
- McNerney R. TB: the return of the phage. A review of fifty years of micobacteriophage research. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:179-84.
- McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, Nye PM, Stoker NG. Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. *J Antimicrob Chemother* 2000;4:69-75.

- McNerney R, Kambashi BS, Kinkese J, Tembwe R, Godfrey-Faussett P. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:2115-20.
- McNerney R, Traore H. Mycobacteriophage and their application to disease control. *J Appl Microbiol* 2005;99:223-33.
- Mejia GI, Castrillon L, Trujillo H, Robledo JA. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:138-42.
- Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, Rossau R, Jannes G, Mijs W, *et al.* Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutation in the *pncA* locus in multidrug resistance clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2317-9.
- Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:1066-9.
- MINSAP. Dirección Nacional de Estadísticas. Cuadro Epidemiológico Nacional. La Habana, Cuba, 2001.
- Mole RJ, Maskell TW. Review phage as a diagnostic - the use of phage in TB diagnosis. *J Chem Technol Biotechnol* 2001;76:683-8.
- Montoro E, Suárez O, Valdivia JA. Micobacterias. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Suazo JL, editores. *Microbiología, Parasitología Médicas*. 1ra ed. Ciudad de La Habana: Ciencias Médicas; 2001.p:363-85.
- Montoro E. Nuevos aportes al conocimiento en Cuba de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antibacilares [Tesis Doctoral]. Ciudad de La Habana: Instituto Pedro Kourí; 2003.
- Montoro E. La resistencia a múltiples fármacos: una amenaza para el control de la tuberculosis. *Rev Panam Salud Pública* 2004;16:68-73.
- Montoro E, Lemus D, Echemendía M, Armas L, González-Ochoa E, Llanes MJ, *et al.* Drug-resistant tuberculosis in Cuba. Results of the three global projects. *Tuberculosis* 2006;86:319-23.

- Morcillo N, Zumarraga M, Alito A, Dolmann A, Schouls L, Cataldi A, *et al.* A low cost, home-made, reverse-line blot hybridization assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2002;6:959-65.
- Morcillo N, Di Giulio B, Testani B, Pontino M, Chirico C, Dolmann A. A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. Int J Tuberc Lung Dis 2004;8:253-9.
- Morgan M, Kalantri A, 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.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and toxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
- Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miorner H. Use of 3(4,5-dimethyl thiazol -2 - yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998;36:1214-9.
- Musa HR, Ambroggi M, Souto A, Ängeby KA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy positive sputum sample. J Clin Microbiol 2005;43:3159-61.
- Nair J, Rouse DA, Bai GH. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 1993;10:521-7.
- Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 1994;264:382-8.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem 2000;267:5421-6.

- Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diag* 2006<sup>a</sup>;6:413-22.
- Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diag* 2006<sup>b</sup>;6:423-32.
- Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:380-3.
- Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:344-8.
- Palomino JC. Novel rapid antimicrobial susceptibility tests for *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bastian I, Portaels F, editores. *Multidrug-resistant tuberculosis*. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2000.p:100-12.
- Palomino JC, Portaels F. Microcolony detection for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:91.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate. *J Antimicrob Agent Chemother* 2002;46:2720-2.
- Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J* 2005;26:1-12.
- Palomino JC. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2006;12:172-8.
- Park DJ, Drobniewski FA, Meyer A, Wilson SM. Use of phage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. *J Clin Microbiol* 2003;41:680-8.
- Parsons LM, Driscoll JR, Taber HW, Salfinger M. Drug resistance in Tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11:905-28.
- Parsons LM, Somoskövi A, Urbanczik R, Salfinger M. Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. *Front Biosci* 2004;1:2086-105.

- Perrot S, Dutertre-Catella H, Rat P, Warnet JM. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicol Sci* 2003;72:122-9.
- Pfyffer GE, Auckenthaler R, van Embden JD, van Soolingen D. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis* 1998;4:631-4.
- Picardeu M, Vincent V. Characterization of large linear plasmids in Mycobacteria. *J Bacteriol* 1997;179:2753-6.
- Piffardi S, Luna A, Sakurada A, Lepe R. Evaluación comparativa del método automatizado BACTEC/MGIT-960 con el método de las proporciones para determinar susceptibilidad a drogas antituberculosas en Chile. *Rev Chil Enf Respir* 2004;20:39-43.
- Porras TB, León CI, Guerrero MI, Martín A, Portaels F, Palomino JC. Phenotypic and genotypic methods for detecting multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica* 2005;25:22-33.
- Ramachandran R, Paramasivan CN. What is new in the diagnosis of Tuberculosis? Part II; Techniques for drug susceptibility testing. *Ind J Tub* 2003;50:197-202.
- Rasmussen EV. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In Vitro Mol Toxicol* 1999;12:47-58.
- Rastogi N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug resistance. *Res Microbiol* 1991;142:464-76.
- Rastogi N, David HL. Mode of action of antituberculosis drugs and mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1993;144:133-43.
- Rastogi N, Legrand E, Sola C. The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2001;20:21-54.

- Reis RS, Neves I, Lourenço SL, Fonseca LS, Lourenço MC. Comparison of flow cytometric and alamar blue test with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid. J Clin Microbiol 2004;42:2247-8.
- Rieder HL, Martin T, Myking H, Ubanczik R, Laszlo A, Jae S, *et al.* The public health service national tuberculosis reference laboratory and the national tuberculosis network. Minimum requirements, role and operation in low-income country. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. 1998. 57-83.
- Rieder HL. Epidemiologic basis of TB control. First Ed. IUATLD. Paris; 1999. p:11-16.
- Rigouts L, Portaels F. The contribution of laboratory testing in the control of tuberculosis. Clin Lab Inter 2001;25:6-8.
- Riska PF, Jacobs WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2000;4:4-10.
- Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, McClatchy JK, *et al.* Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol 1983;18:689-96.
- Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. *Mycobacterium*. En: Balows A, Hansler WJ, Hersmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editores. Manual of Clinical Microbiology. 5a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1991.p:304-39.
- Robledo JA, Mejia GI, Morcillo N, Chacon L, Camacho M, Luna J, *et al.* Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10:613-9.
- Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, *et al.* Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2093-8.

- Ruiz A, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. Direct detection of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol 2004;42:1585-9.
- Rusch-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC/MGIT-960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. J Clin Microbiol 2006;44:688-92.
- Rybniker J, Kramme S, Small PL. Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*. Application for identification and susceptibility testing. J Med Microbiol 2006;55:37-42.
- Sánchez NS, Königsberg M. Using yeast to easily determine mitochondrial functionality with 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Biochem Mol Biol Educ 2006;34:209-12.
- Sanders CA, Nieda RR, Desmond EP. Validation of the use of Middlebrook 7H10 agar, BACTEC/MGIT-960, and BACTEC-460 12B media for testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin. J Clin Microbiol 2004;42:5225-8.
- Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol 2003;48:77-84.
- Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, Dalessandro M, Chichero P, Gori A, *et al.* Detection of rifampin resistance by single strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. J Clin Microbiol 1997;35:2802-6.
- Schluger NW. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. Am Respir Crit Care Med 2001;164:2020-4.
- Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculosis drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 1996;2:662-7.

- Sethi S, Sharma S, Sharma SK, Meharwal SK, Jindal SK, Sharma M. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to primary antitubercular drugs by nitrate reductase assay. Indian J Med Res 2004;120:468-71.
- Simboli N, Takiff HE, McNerney R, López B, Martin A, Palomino JC, *et al.* In house-phage amplification assay is a sound alternative for detecting rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low-resource settings. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:425-7.
- Skerman VB, McGowan V, Sneath PH. Approved list of bacterial names. Intern J Systematic Bacteriol 1980;30:225-420.
- Solis LA, Shin SS, Han LL, Lanos F, Stowell M, Sloutsky A. Validation of a rapid method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. Int J Tuberc Lung Dis 2005;9:760-4.
- Somoskövi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res 2001;2:164-8.
- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, *et al.* Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1677-81.
- Srivastava K, Das R, Jakhmola P, Gupta P, Chauhan DS, Sharma VD, *et al.* Correlation of mutations detected by INNO\_LiPA with levels of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Indian J Med Res 2004;120:100-5.
- Syre H, Phyu S, Sandven P, Bjorvatn B, Grewal HMS. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. J Clin Microbiol 2003;41:5173-7.
- Syre H, Valvatne H, Sandven P, Grewal HMS. Evaluation of the nitrate-based colorimetric method for testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to streptomycin and ethambutol in liquid cultures. J Antimicrob Chemother 2006;57:987-9.

- Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, *et al.* Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:773-80.
- Takiff HE. The molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bastian I, Portaels F, editores. *Multidrug-resistant tuberculosis*. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2000.p:77-114.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, *et al.* Detection of rifampin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, *et al.* The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* 1997;3:567-70.
- Telenti A. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* 1998;53:793-7.
- Tortoli E, Cichero P, Piercimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of the BACTEC/MGIT-960 for recovery of mycobacteria in clinical specimens: multicentre study. *J Clin Microbiol* 1999;37:3578-82.
- Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, *et al.* *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999;37:49-55.
- Umubyeyi AN, Martin A, Zisis G, Struelens M, Karita E, Portaels F. Evaluation of the resazurin microtiter assay for rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:808-11.
- Valdivia JA, Suárez-Méndez R. Incidencia y prevalencia de cepas drogorresistentes en el Hospital Antituberculoso “Julio Trigo” de La Habana. *Bol Hig Epid* 1968;6:247-51.

- Valdivia JA, Jiménez C, Rodríguez R, Mederos L, Echemendía M, Valdés L, *et al.* Estudio cooperativo de la resistencia a las drogas antibacilares en cepas de *M. tuberculosis* aisladas en pacientes tuberculosos. (Informe preliminar). Rev Cubana Med Trop 1982;34:119-25.
- Vilcheze C, Morbidoni HR, Weisbrod TR, Iwamoto H, Kuo M, Sacchetti JC, *et al.* Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol 2000;182:4059-67.
- Virtanen S. A study of nitrate reduction by mycobacteria. Acta Tuberc Scand 1960;48:78-82.
- Vistica DT, Skenhan P, Scudeiro D, Monks A, Pittman A, Boyd MP. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. Cancer Research 1991;51:2515-20.
- Viveiros M, Leandro C, Amaral L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. Int J Antimicrob Agents 2003;22:274-8.
- Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Front Biosci 2004;9:975-94.
- Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:908-14.
- Williams DL, Waguespack C, Eisenach K. Characterization of rifampin resistance in pathogenic Mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:2380-6.
- Williams DL, Spring L, Gillis TP, Salfinger M, Persing DH. Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. Clin Infect Dis 1998<sup>a</sup>;26:446-50.
- Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PRJ, *et al.* Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1998<sup>b</sup>;42:1853-7.

- Wilson TM, Collins DM. *aphC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Mol Microbiol 1996;19:1025-34.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2000. World Health Organization, Ginebra, 2000. WHO/CDS/TB/2000.275. p:87-102.
- World Health Organization. StopTB Annual Report 2000. Forging new partnerships to stop TB. World Health Organization. Ginebra, 2001<sup>a</sup>. WHO/CDS/STB/2001.12. p:1-3.
- World Health Organization. Global DOTS expansion plan. Progress in TB control in high-burden countries, 2001. World Health Organization. Ginebra, 2001<sup>b</sup>. WHO/CDS/STB/2001.11. p:35-39.
- World Health Organization. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Global Project and Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 1999-2002. Third Global Project, 2004. Antituberculosis drug resistance in the world. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva: WHO; 2005. Report WHO/HTM/TB/2005.349.
- Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Babst A, *et al.* Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1995;33:2324-7.
- Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2005;45:529-64.
- Zhao X, Yu H, Yu S, Wang F, Sacchettini JC, Magliozzo RS. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. Biochem 2006;45:4131-40.
- Zweig MH, Campbell G. Receive-Operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicin. Clin Chem 1993;39:561-77.

**VIII.2. Producción científica de la autora relacionada con el tema de la tesis**

- **Lemus D**, Martin A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2004;54:130-3.
- Montoro E, **Lemus D**, Echemendía M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2005;55:500-5.
- Martin A, Morcillo N, **Lemus D**, Montoro E, Da Silva M A, Simboli N, *et al.* Multicenter evaluation of colorimetric assays using MTT and resazurin for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. Int J Tuber Lung Dis 2005;9:901-6.
- Martin A, Montoro E, **Lemus D**, Simboli N, Morcillo N, Velasco M, *et al.* Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods 2005;63:145-50.
- **Lemus D**, Montoro E, Echemendía M, Yzquierdo SL, Martin A, Portaels F, *et al.* Nuevos métodos para la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. Biotecnología Aplicada 2005;22:306-8.
- Yzquierdo SL, **Lemus D**, Echemendia M, Montoro E, McNerney R, Martin A, *et al.* Evaluation of phage assay for rapid phenotypic detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006;5:11.
- **Lemus D**, Montoro E, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low resources laboratories. J Med Microbiol 2006;55:861-3.

**VIII.3. Producción científica de la autora no relacionada con el tema de la tesis**

- Montoro E, Echemendía M, **Lemus D**, Valdivia JA. Estudio de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba. 1997-98. Avances en Biotecnología Moderna 1999;5:D10.
- Mederos LM, Ruiz A, **Lemus D**, Valdivia JA, Valero-Guillén PL. Diagnóstico alternativo de micobacteriosis en paciente seropositivo al Virus de Inmunodeficiencia Humana. Avances en Biotecnología Moderna 1999;5:D9.
- Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Epidemiología. Editorial de Ciencias Médicas, 1999.
- Mederos LM, Montoro E, Poidevín L, **Lemus D**, Echemendía M, Martínez Y. Aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes seropositivos al VIH. Rev Latinoam Microb 2000;42. Suplemento.
- Mederos LM, Poidevín L, Echemendía M, **Lemus D**, Montoro E. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis en pacientes seropositivos al VIH durante el período 1998-1999. Revista del Hospital Nacional Baldomero Sommer 2000;3:80-5.
- Montoro E, Echemendía M, **Lemus D**, Valdivia JA. Contribución del Laboratorio Nacional de Referencia en la vigilancia de la resistencia *Mycobacterium tuberculosis*. Hallazgos de baja circulación de cepas multidrogoresistentes en Cuba. Rev Latinoam Microb 2002;44. Suplemento.
- Echemendía E, **Lemus D**, Valdivia JA, Montoro E. Estudio de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK. Rev Latinoam Microb 2002;44. Suplemento.
- Montoro E, Echemendía M, **Lemus D**, Marrero A, Llanes MJ, Valdivia JA. Surveillance of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Cuba 1997-2000. Int J Tuberc Lung Dis 2003; 7:S199.

- Montoro E, Echemendía M, **Lemus D**, Llanes MJ, Valdivia JA. Drug resistance tuberculosis in Cuba. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; S49.
- World Health Organization. International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Global Project and Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 1999-2002. Third Global Project, 2004. Antituberculosis drug resistance in the world. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Montoro E, Echemendía M, **Lemus D**, Marrero A, Llanes MJ, Valdivia JA. Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas en Cuba, 1995-1998. *Biomédica* 2004;24:80-4.
- Montoro E, Echemendía M, **Lemus D**, Llanes MJ. Comportamiento de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antibacilares en Cuba 1997-2002. *Bioquímica* 2005;30:107.
- Montoro E, **Lemus D**, Echemendía M, Valdivia JA, Llanes MJ. Baja circulación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes en Cuba. *Biotecnología Aplicada* 2005;22:302-3.
- Montoro E, **Lemus D**, Echemendía M, Armas L, González-Ochoa E, Llanes MJ, Valdivia JA. Drug-resistant tuberculosis in Cuba. Results of the three global projects. *Tuberculosis* 2006;86:319-23.
- Aziz MA, Wright A, Laszlo A, De Muynck A, Portaels F, Van Deun, A *et al.* Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance): an updated analysis. *Lancet* 2006;368:2142-54.

#### VIII.4. Presentación en eventos científicos

- **Simposium “DOTS/TAES para el Control y eliminación de la tuberculosis”**  
(IPK, Marzo/2000)
  - Nuevas técnicas para pruebas de resistencia a las drogas antituberculosas.

- **XV Jornada Científica del sanatorio de Santiago de las Vegas.** (SSV, Abril/2001)
  - Implementación del MAA como una herramienta útil en la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.
- **Joven Ciencia 2001.** (CIMEQ, Abril/2001)
  - Determinación de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el método colorimétrico Alamar Azul.
- **X Exposición de Base Forjadores del Futuro.** (IPK, Marzo/2002)
  - Detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* mediante un nuevo método colorimétrico.
- **X Exposición Municipal Forjadores del Futuro.** (La Lisa, Abril/2002)
  - Detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* mediante un nuevo método colorimétrico.
- **XXXIII Congreso Nacional de Microbiología.** (Monterrey, México, Abril/2002)
  - Determinación rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio (MTT). (autor) (Tercer Lugar en la Comisión de Microbiología y Parasitología Médica)
- **Convención Internacional “Salud Pública 2002”.** (Cuba, Junio/2002)
  - Evaluación del ensayo colorimétrico MTT para la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.
- **XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM). VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Nacional de Medicina Tropical.** (IPK, Cuba, Noviembre/2002)
  - Aplicación del Microensayo MTT para la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.
  - Determinación rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* empleando la técnica de la Nitrataasa.

- **Taller Nacional de Vigilancia e Investigaciones de Tuberculosis.** (Cuba, Enero/2003)
  - Evaluación del ensayo colorimétrico MTT para la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.
  - Determinación rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* empleando la técnica de la Nitratasa.
- **XV Forum Municipal de Ciencia y Técnica.** (La Lisa, Julio/2003)
  - Nuevo método para la detección rápida de resistencia a las principales drogas antituberculosas. (Trabajo Relevante)
- **34 IUATLD World Conference on Lung Health.** (Paris, Noviembre/2003)
  - Application of the MTT colorimetric assay for rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
  - Use of Nitrate Reductase Assay for rapid determination of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*.
- **2nd General Meeting of the INCO Project “Improved Diagnosis, Drug Resistance Detection and Control of Tuberculosis in Latin America”.** (Florianópolis, Brasil, Noviembre/2003)
  - Rapid alternatives to susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*.
  - New techniques for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* and their relevance for low-income countries.
- **XV Forum Provincial de Ciencia y Técnica.** (Ciudad de la Habana, Noviembre/2003)
  - Nuevo método para la detección rápida de resistencia a las principales drogas antituberculosas. (Trabajo Relevante)
- **XI Exposición de Base Forjadores del Futuro.** (IPK, Cuba, Enero 2004)
  - Aplicación de la técnica de reducción de nitratos para la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.

- **XI International Congress of Infectious Diseases.** (Cancún, México, Marzo/2004)
  - Rapid alternative to rifampicin susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*.
  - MTT colorimetric assay for rapid detection of resistance to the first line antituberculous drugs.
- **35 IUATLD World Conference on Lung Health.** (Paris, Francia, Octubre- Noviembre / 2004)
  - Rapid susceptibility tests for rifampicin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*.
  - New techniques for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*.
- **XXVIII Congreso Nacional de Química Clínica. Expolab XXVIII.** (México, Marzo / 2005).
  - Aplicación de la técnica de amplificación de fagos para la detección de resistencia a la rifampicina.
  - Métodos rápidos para detección de resistencia a rifampicina en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.
  - Nuevos métodos para estudios de susceptibilidad en *Mycobacterium tuberculosis*.
- **24 International Congress of Chemotherapy.** (Manila, Filipinas, Junio / 2005)
  - Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
  - Evaluation of three low cost methods for rapid detection of drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*.
- **Primer Encuentro de Técnicos de las Ciencias Biológicas.** (Facultad de Biología-UH / Junio /2005)
  - Aplicación de la técnica de reducción de nitratos para la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* (Mención)

- **3rd General Meeting of the INCO Project** “Improved Diagnosis, Drug Resistance Detection and Control of Tuberculosis in Latin America”. (Buenos Aires, Argentina, Septiembre / 2005)
  - Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtiter assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.
- **36 IUATLD World Conference on Lung Health.** (Paris, Francia, Octubre / 2005)
  - Application of the colorimetric assay MTT and resazurin for drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*.
  - Phage amplification assay for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*
  - Rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay.
  - Rapid low cost colorimetric methods, MTT and resazurin assay, for drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first line drugs.
- **XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. XXVIII Congreso Chileno de Microbiología. III Congreso Chileno de Microbiología e Higiene de los Alimentos** (Pucón, Chile, Octubre / 2006)
  - Experiencia en el uso de nuevos métodos para la detección de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.

**Anexo 1.****Elaboración del medio de cultivo Löwenstein-Jensen (Marrero *et al.*, 1999)**

El medio de cultivo LJ necesario para la realización del MP y el MNR se elabora siguiendo la misma metodología, siendo sólo necesario añadir KNO<sub>3</sub> hasta alcanzar una concentración de 1 000 µg/mL en el medio que se va a utilizar para la realización del MNR.

En un erlenmeyer de 2 000 mL se prepara la solución salina la cual se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. En otro erlenmeyer, se cascan asépticamente los huevos, se homogenizan y se filtran a través de un irrigador estéril, hasta obtener un volumen de 1 000 mL.

<b>Reactivos de la solución salina</b>	<b>Cantidad</b>
Fosfato monopotásico	2,4 g
Sulfato de magnesio	0,24 g
Citrato de magnesio	0,6 g
Asparagina	3,6 g
Glicerina bidestilada	12,0 mL
Verde malaquita	0,4 g
Agua destilada	600 mL

Posteriormente se mezclan los 600 mL de la solución salina con los 1 000 mL de huevos homogenizados y se ajusta el pH entre 6,8 y 7,2. Seguidamente se deposita 300 mL de medio en 4 erlenmeyers para adicionar los volúmenes de cada una de las drogas antituberculosas para alcanzar la concentración crítica correspondiente a cada una de ellas, el resto del medio se emplea para la preparación de los tubos controles.

---

<b>Drogas antituberculosas</b>	<b>Concentración crítica (µg/mL)</b>
INH	0,2
STR	4
EMB	2
RIF	40

---

Para la distribución del medio se emplean tubos de 150 x 20 cm con tapa de rosca en los que se depositan 7 mL de medio LJ.

Posteriormente se procede a coagular el medio de cultivo en un horno de tiro de aire forzado durante 50 minutos a 85°C, los tubos se colocaran en posición inclinada hasta formar una cuña de 7 cm. Los tubos se dejan enfriar en el mismo coagulador y luego se ajustan las tapas.

Antes de guardar los tubos en refrigeración (4°C), se realizará el control de esterilidad incubándolos a 37°C durante 72 horas. Además se realizará un control del lote sembrando la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294).

## **Anexo 2.**

### **Preparación del medio Middlebrook 7H9**

Se pesan 4,7 g de medio Middlebrook 7H9 deshidratado (*DIFCO Laboratories*) y se disuelven en 900 mL de agua destilada estéril, seguidamente se añaden 2 mL de glicerina. La esterilización se realiza a 121°C durante 10 minutos.

Una vez que se enfría el medio de cultivo se adiciona el OADC (*DIFCO Laboratories*) hasta lograr una concentración final del 10% y se realiza el control de esterilidad a 37°C por 72 horas. El medio se conserva en refrigeración (4°C).

**Anexo 3.****Preparación de la solución salina fosfato (PBS)**

<b>Producto</b>	<b>Cantidad</b>
Fosfato disódico anhidro	1,15 g
Fosfato monopotásico	0,2 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Cloruro de potasio	0,2 g
Agua destilada	1 000 mL

Mezclar los reactivos, ajustar el pH a 6,8 y esterilizar durante 15 minutos a 121°C.

Conservar a 4°C hasta el momento de su utilización.

**Anexo 4.**

Cantidad y procedencia de las cepas utilizadas para dar respuesta a cada uno de los objetivos de la tesis así como las drogas evaluadas y los métodos utilizados.

<b>Materiales y Métodos</b>	<b>Número de cepas</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Drogas evaluadas</b>	<b>Métodos utilizados</b>
III.1.	20	Unidad de Micobacterias Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.	RIF	MTT RES MNR <i>MGIT</i> INNOLipa_Rif.TB * BACTEC-460 * MP
III.2.	102	Colección del LNR-TB-IPK	RIF	EAF * MP
III.3.	100	Colección del LNR-TB-IPK	INH STR EMB RIF	MTT RES MNR * MP
III.4.	320	85: Colección del LNR-TB-IPK 235: Red Nacional de Laboratorios	INH STR EMB RIF	MNR * MP
III.5.	30	Unidad de Micobacterias Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.	INH STR EMB RIF	MTT RES MNR * MP
<b>Total</b>	<b>572</b>			

\* Método de referencia.

**Anexo 5.**

***Buffer*** TE pH 7,4

10 mM Tris .Cl (pH 7,4)

1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (pH 8)

**Anexo 6.****Producción del fago D29**

- Preparar una suspensión del fago D29 de aproximadamente 4 000 UFP/mL en medio (Middlebrook 7H9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub>).
- Dispersar 100 µL del fago sobre la superficie de una placa indicadora de 90 mm (Anexo 6).
- Incubar a 37°C durante 24 h.
- Añadir 10 mL de medio 7H9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub> e incubar durante toda la noche.
- Recuperar el medio y filtrar empleando una membrana de 0,45 µm.
- Conservar a 4°C en volúmenes de 100 µL.
- Realizar diluciones decimales seriadas en medio Middlebrook 7H9 + 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Debe emplearse una punta nueva para cada dilución.
- Cuantificar el número de fagos colocando 10 µL de las diluciones en una placa indicadora.
- Para calcular el título del fago se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UFP/mL)} = \# \text{ placas} \times \text{dilución} \times 100$$

**Anexo 7.****Producción de las placas indicadoras**

- Tener cultivadas colonias de *M. smegmatis* en 1,5% agar Middlebrook 7H9 + 10% OADC durante 3 días. Una vez obtenido el crecimiento las placas se pueden sellar y almacenar por 3 semanas a 4°C.
- Colocar una colonia aislada en 300 mL de medio (Middlebrook 7H9 + 10% OADC) en una botella de 500 mL.
- Incubar a 37°C en agitación durante 2 días. Este cultivo se puede almacenar a 4°C durante 30 días. Si aparecen acúmulos de bacterias se dejará reposar unos minutos para que sedimenten los grumos.
- Preparar 1,5% agar Middlebrook 7H9 y refrescar a 45°C para añadir 10% OADC y 10% de cultivo de *M. smegmatis*, mezclar y colocar en placas petri de 90 mm de diámetro.
- Las placas pueden conservarse selladas en bolsas plásticas durante dos semanas a 4°C. Es necesario secar las placas colocándolas en la incubadora durante 30 minutos, para eliminar el líquido de la superficie antes de ser utilizadas.

**Anexo 8.****Tabla de doble entrada empleada para la interpretación de los resultados:**

	<b>Método de Referencia (+)</b>	<b>Método de Referencia (-)</b>
<b>Método en Estudio (+)</b>	Verdaderos (+)	Falsos (+)
<b>Método en Estudio (-)</b>	Falsos (-)	Verdaderos (-)
	<b>Total (+)</b>	<b>Total (-)</b>

\* Para la interpretación de los resultados se consideró positivo a los resultados resistentes y negativos a los resultados sensibles.

- Verdaderos (+): cepa resistente por ambos métodos
- Verdaderos (-): cepa sensible por ambos métodos
- Falsos (+): cepa resistente por el método en estudio y sensible por el método de referencia
- Falsos (-): cepa sensible por el método en estudio y resistente por el método de referencia

**Fórmulas utilizadas para el cálculo de la sensibilidad, la especificidad y la concordancia:**

**Sensibilidad** = Verdaderos (+) x 100 / Total (+)

**Especificidad** = Verdaderos (-) x 100 / Total (-)

**Concordancia** = [Verdaderos (+) + Verdaderos (-)] x 100 / [Total (+) + Total (-)]