

## I. RESUMEN

La tuberculosis constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial y es considerada en el 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).

En el presente estudio se evaluó el método de 3-(4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) contra el Método de Proporciones de Cannetti (estándar de oro) para la detección temprana de resistencia a los antibióticos de primera línea (Rifampicina, Isoniacida y Etambutol) utilizados para el tratamiento de la tuberculosis. Éstos antibióticos fueron evaluados en un estudio doble ciego con 30 cepas previamente aisladas y evaluadas por el Método de Cannetti durante el año 2008 en el Laboratorio del Hospital Roosevelt.

El análisis estadístico fue realizado mediante la utilización de tablas 2 por 2 para facilitar su interpretación, posteriormente se calcularon la sensibilidad, especificidad y el índice Kappa a cada antibiótico analizado. También se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de cada antibiótico.

En relación al índice Kappa, para rifampicina se encontró una concordancia muy buena (1.00), en isoniacida la concordancia fue débil (0.22). En el método en microplaca MTT la sensibilidad alcanzada fue del 100% para rifampicina e isoniacida y para el etambutol no fue posible calcular la sensibilidad, especificidad e índice Kappa ya que no se obtuvieron cepas resistentes por ambos métodos.

La especificidad fue del 30% para la isoniacida y del 100% para rifampicina. En la determinación de la CIM de las diferentes drogas utilizadas, se obtuvo para isoniacida una CIM de 0.25 µg/mL en 19 cepas y para las otras 11 cepas de 0.50 µg/mL, lo que concuerda con la literatura (35). Para la rifampicina se obtuvo que 27 cepas presentaron una CIM mayor de 2 µg/mL y únicamente 3 cepas tuvieron una CIM de 0.5 µg/mL mientras que para el etambutol la CIM obtenida fue mayor a 2 µg/mL. El tiempo establecido para la

obtención de resultados por el método de Proporciones de Cannetti es de 42 días y para el método en estudio de microplaca MTT es de 7 a 8 días.

Con base a los resultados obtenidos, el método en microplaca MTT demostró ser una herramienta útil para la detección temprana de resistencia de *M. tuberculosis*. Además de la reducción de los costos en cuanto a tiempo de obtención de los resultados y al no requerir personal altamente capacitado para la realización de este método.

## II. INTRODUCCIÓN

En la última década, la tuberculosis (TB) se ha convertido en una enfermedad re-emergente y una de las principales causas de muerte (3 millones anualmente alrededor del mundo). Se estima que cada año existen 8.8 millones de nuevos casos, lo que corresponde a 52,000 muertes por semana o más de 7,000 casos por día, que se traduce en más de 1,000 nuevos casos por hora, cada día. La TB es el mayor problema de salud pública alrededor del mundo (1).

En Guatemala la incidencia para el año 2000 fue de 22.57/100,000 habitantes que corresponden a 1,623 casos. La aparición del VIH ha acelerado la propagación de la tuberculosis aumentando hasta 30 veces el factor de riesgo de la población en general. Esta enfermedad se transmite principalmente vía aérea, de una persona a otra al toser, estornudar o hablar (1).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población está infectada con *M. tuberculosis*. Cinco de cada diez personas infectadas con TB se enfermarán o serán infecciosas en algún momento de su vida. Los epidemiólogos estiman que entre los años 2000-2020, aproximadamente un billón de habitantes estarán infectados, 200 millones estarían enfermos y 35 millones morirían por tuberculosis si no se toman las medidas de control y prevención necesarias (1).

Para el tratamiento se utilizan varios medicamentos para evitar la aparición de resistencias por mutaciones naturales en la micobacterias. Las drogas de primera línea son rifampicina, isoniacida, pirazinamida, estreptomycin y/o etambutol, entre las drogas de segunda línea están la ofloxacina, cicloserina y etionamida (2).

El uso inadecuado de estos medicamentos es la principal causa de la tuberculosis multirresistente, lo que ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas drogas así como la necesidad de realizar la evaluación *in vitro* de la sensibilidad especialmente en aquellos casos donde no se observa una respuesta adecuada al tratamiento (2).

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 y el método de la nitrato reductasa 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 (3).

Actualmente en el Laboratorio del Hospital Roosevelt se usa el método de proporciones de Cannetti para la determinación de la susceptibilidad micobacteriana, el cual es costoso, requiere de un personal capacitado y el tiempo de obtención de los resultados es muy prologando (42 días), por lo que se pretendió comparar el método en microplaca MTT como marcador (7-15 días) con este método de referencia (proporciones de Cannetti).

En el presente proyecto se evaluó la técnica en microplaca de MTT como marcador para la determinación de la susceptibilidad micobacteriana en el Laboratorio del Hospital Roosevelt. Esto permitiría que en un futuro cercano se ofrezca a los pacientes con tuberculosis, un tratamiento apropiado a la brevedad posible. El conocer los patrones de susceptibilidad de los aislamientos micobacterianos permitiría establecer un mejor control de la enfermedad (4).

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, transmisible que es causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* o también conocido como bacilo de Koch (por Roberto Koch, el médico que lo identificó por primera vez en el año de 1882) y en menor grado por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum* (5).

Se han reportado lesiones de posible etiología tuberculosa en huesos de momias egipcias que datan de 3700 años antes de nuestra era. Sin embargo, no fue hasta 1882 que el Doctor Robert Koch logró el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de esta entidad clínica. Hace más de 50 años se dispone de la quimioterapia antituberculosa con drogas altamente eficaces como la isoniacida y la rifampicina, desde 1963 fue descrita la prueba de referencia para los estudios de susceptibilidad a las drogas antituberculosas (método de proporciones), sin embargo la TB no puede considerarse una enfermedad del pasado, ya que provoca cada año la muerte de un millón de personas (5).

Es un bacilo alcohol ácido resistente (BAAR): lo que significa que tiene la capacidad de incorporar ciertos colorantes y retenerlos aún después de la acción del ácido en solución alcohólica o acuosa, frecuentemente incoloro, aeróbico estricto. Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Es muy resistente al frío, la congelación y la desecación y por el contrario muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta. Su multiplicación es muy lenta (se divide cada 16 a 20 horas) y ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. El reservorio natural del *M. tuberculosis* es el hombre, tanto el asintomático como el enfermo (6).

Puede causar enfermedad en cualquier órgano del cuerpo, siendo la más frecuente la infección en los pulmones, desde donde se disemina a otros órganos por vía sanguínea o linfática. Los síntomas aparecen cuando las lesiones son ya muy extensas, de forma que el diagnóstico se establece cuando la enfermedad está muy avanzada. Los síntomas

característicos son: fiebre, sudoración, adelgazamiento, expectoración purulenta y tos. Las micobacterias provocan lesiones tisulares (tubérculos), generando una respuesta inmune en donde participan los linfocitos CD4+ y los linfocitos T citotóxicos, por su parte las células NK (natural killer) se encargan de eliminar macrófagos y linfocitos infectados (6).

### **1. Taxonomía 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 Gram-positivo, donde se encuentran además, la familia Corynebacteriaceae y las Nocardioformes (incluye a los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*) (7).

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*, *M. canettii* y *M. pinnipedii*. El otro grupo está formado por el **Complejo Lepra** que incluye *M. leprae* y *M. leprae-murinum*, causantes de 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. La fuente natural de estos microorganismos es el suelo, agua, los alimentos y algunos animales (7).

Las micobacterias son consideradas bacilos ácido alcohol resistente 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 0.4 x 3.0 µm, no esporulan, no tienen flagelos ni cápsulas (7).

Las micobacterias forman más de una clase de colonias. Estas pueden ser de color hueso crema y rugosas, elevadas, convexas, de bordes irregulares, con bacilos densos y compactos 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. xenopiy* 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 pigmento), escotocromógenas (forman pigmento en presencia o ausencia de luz) y no cromógenas (no producen pigmentos) (8).

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos 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. 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 (8).

## **2. Criterios para definir el género *Mycobacterium***

Los criterios utilizados son:

### **a. Ácido alcohol resistencia**

La pared celular de las bacterias, es rica en lípidos lo que le confiere su Alcohól Ácido Resistencia (BARR): lo que significa que tiene la capacidad de incorporar ciertos colorantes y retenerlos aún después de la acción del ácido en solución alcohólica o acuosa. Esta se manifiesta por la coloración de Ziehl-Neelsen, que es el método de coloración usado en microscopía para realzar el diagnóstico directo en las muestras clínicas obtenidas de los pacientes. Las micobacterias se colorean con la fucsina fenolada en caliente y resisten la decoloración, a pesar de la acción combinada del alcohol-ácido. Otros géneros, también pueden presentar ácido-alcohol resistencia, aunque más débil (9).

Estructura de los ácidos micólicos: Estos son sintetizados por los organismos de todos los géneros de la familia *Proactinomycetaceae* (*Mycobacteriaceae*). Las micobacterias se caracterizan por contener micolatos de cadena larga, de 60- 90 átomos de Carbono (9).

Proporción de guanina-citosina del ADN (GC): Para el género *Mycobacterium* los porcentajes en GC están comprendidos entre 61 y 71 %, salvo en la especie *M. leprae* donde el porcentaje en GC es 54-57 % (9).

### **b. Clasificación de las especies de Micobacterias**

A la fecha se han identificado más de 60 especies, algunas de ellas parásitos estrictos del hombre y de los animales: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. paratuberculosis*, *M. microti*. Otras especies más numerosas, son saprofitas o patógenos oportunistas del hombre y los animales. Se clasifican en base a la velocidad de crecimiento, su importancia médica y el riesgo de infección (9).

### **c. Pared celular del género *Mycobacteriaceae***

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 diferente a la que presentan las bacterias Gram-positivo y Gram-negativo. Al igual que en los otros grupos bacterianos está formada por cadenas de polisacáridos y similar a las bacterias Gram-negativo, 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 (9).

Los ácidos micólicos que conforman la pared celular de las micobacterias, 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 (9).

#### **d. Velocidad de crecimiento del género *Mycobacteriaceae*:**

Las micobacterias se dividen en especies de crecimiento rápido o de crecimiento lento. Son de crecimiento rápido cuando la formación de la colonia visible se produce antes de los 7 días de incubación. La división celular de una especie de crecimiento lento varía entre 13 y 20 horas, mientras que las de crecimiento rápido son de 2 a 5 horas (10).

#### **e. Clasificación del riesgo de infección:**

La Sociedad Europea de Micobacteriología (ESM) ha clasificado a las micobacterias en tres grupos, siendo estas especies nombradas según su grupo de riesgo (10).

- i. **Grupo I de riesgo:** El riesgo de infección es bajo o raramente son responsables de enfermedad en el adulto, generalmente son clasificadas entre los patógenos raros.
- ii. **Grupo II de riesgo:** Riesgo moderado, son clasificadas entre los microorganismos patógenos potenciales u oportunistas.
- iii. **Grupo III de riesgo:** Riesgo de transmisión por vía aérea, la infección puede ser severa y aún causa de muerte. Es de riesgo elevado para el individuo, pero moderado para la población. Estas especies son generalmente clasificadas entre los patógenos estrictos (10).

### **3. Transmisión de la tuberculosis**

La TB se transmite principalmente por tres vías: inhalación de partículas suspendidas que contienen *M. tuberculosis* viables, ingestión de material contaminado usualmente leche e inoculación directa que usualmente ocurre en trabajadores de la salud.

Presentar la infección de TB significa que las bacterias están en el organismo, pero en estado inactivo o latente, las micobacterias pueden permanecer vivas dentro del cuerpo durante años. La enfermedad suele manifestarse en personas inmunocomprometidas, por esa razón se considera una de las infecciones oportunistas más comunes en las personas que viven con VIH/SIDA. Se estima que estar infectado con el VIH incrementa 113 veces el factor de riesgo para desarrollar una tuberculosis activa y el SIDA 170 veces más (11).

#### **4. Síntomas**

La TB carece de manifestaciones clínicas propias que permiten diferenciarla de otras enfermedades respiratorias. El comienzo en la mayoría de ocasiones es insidioso y poco alarmante por lo que pueden pasar varios meses hasta que se llegue al diagnóstico con certeza. La mayoría de personas pueden manifestar astenia, fiebre, cansancio, falta de apetito, pérdida de peso, depresión, sudor nocturno y disnea en casos avanzados. Cuando se agregan la expectoración purulenta y tos por más de quince días debe realizarse un análisis de esputo, pues se considera un síntoma respiratorio (11).

De ahí la importancia que el médico ponga en marcha las exploraciones necesarias para lograr determinar la enfermedad de la persona.

#### **5. Diagnóstico**

El diagnóstico clínico de la TB pulmonar está basado en la historia clínica y los rayos X del tórax. Sin embargo, estos datos por sí solos no son fiables por no ser específicos, solamente indican que se debe realizar el estudio microbiológico diferencial (hongos, bacterias, etc) y utilizar otros métodos clínicos y de laboratorio que se presentan a continuación:

##### **a. Prueba de Tuberculina**

La prueba de tuberculina por el método de Mantoux o derivado purificado de proteína (PPD) es un examen selectivo estándar que contiene un antígeno (tuberculina) que se encuentra en la micobacteria y que es usado generalmente para identificar individuos infectados, enfermos con TB o personas que hayan estado en contacto con el microorganismo. La PPD está indicada en todas las situaciones en que interese confirmar o descartar infección tuberculosa. Es la prueba normalizada por la OMS desde 1964, básicamente consiste en la inyección intradérmica de la PPD en la cara anterior del brazo izquierdo y la realización de una lectura a las 48-72 horas de la prueba, en la que se mide la zona de induración que se ha producido (no la zona de eritema) (12).

En Guatemala por ser un país endémico, se considera positiva una zona de induración mayor o igual a 10 mm, que no significa lo mismo que una infección activa. La excepción

la constituyen los sujetos vacunados con BCG en los 10 años previos a la realización de la prueba, en ellos se considera positiva una induración mayor o igual a 14mm (12).

### **b. Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis***

El cultivo sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de la tuberculosis, puesto que la recuperación del microorganismo a través del cultivo es esencial para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad (12).

Dicha técnica es mucho más sensible que los métodos tradicionales de diagnóstico (tinción de Ziehl-Neelsen de la muestra, radioscopia y serología), sin embargo, la sensibilidad del cultivo no es total, puesto que muchas micobacterias pueden no ser liberadas del material proteico por el agente mucolítico y otras pueden morir debido a la acción del agente descontaminante por lo que estos factores no favorecen este método como diagnóstico.

Con el cultivo se puede detectar una cantidad tan pequeña de 10 bacilos/ml de material digerido y concentrado, siendo válido para la evaluación de un enfermo y su respectivo tratamiento (13).

Los métodos de cultivos efectuados en medio sólido utilizan el agar Löwenstein-Jensen, Coletsos o el agares 7H10 y 7H11 de Middlebrook. El agar Löwenstein-Jensen es el más utilizado ya que es muy económico comparado con los demás. Estos cultivos son muy adecuados en especial aquellos que contienen huevo, glicerina, asparagina o medios gelatinosos que contienen suero o albúmina. El medio Löwenstein-Jensen, es sensible, de bajo costo, se conserva a +4°C y el crecimiento de las micobacterias es de corta duración (3-4 semanas). El crecimiento de las colonias de *M. tuberculosis* tienen un crecimiento en forma minúscula, redondeadas, con superficie lisa y tinte blanquecino, tomando un aspecto seco, verrugoso y el color del medio vira de verde a crema-beige, pudiendo alcanzar de 5-10 mm de diámetro (la temperatura de crecimiento óptima es de 37°C). Un buen desarrollo de las colonias no se produce sino hasta que la hidratación y la aireación de los cultivos son satisfactorias. Un cultivo puede considerarse negativo cuando han transcurrido

más de 3 meses en incubación sin observarse el crecimiento característico. El agar Middlebrook 7H9 con glicerol es utilizado para favorecer el crecimiento de las micobacterias ya que el glicerol nutre a todas las micobacterias favoreciendo su viabilidad. La temperatura óptima de crecimiento en este medio es de 37°C, es económico y es más utilizado para determinar susceptibilidades a las drogas (13).

### c. Baciloscopía (BK)

Esta técnica ha sido adoptada por la mayoría de países en desarrollo como el procedimiento diagnóstico de elección en los enfermos sintomáticos respiratorios, porque es indudablemente el método más sencillo, rápido, confiable y económico. Ver tabla I (13).

Su especificidad supera el 99%, ya que la mayoría de los casos en los que se observa BARR en el esputo, es *M. tuberculosis*. Su sensibilidad es menor ya que deben existir por lo menos unos 10,000 bacilos por ml. de expectoración para que puedan ser detectados en el microscopio. Sin embargo, su sensibilidad como método de identificación de los pacientes transmisores de la enfermedad es alta, ya que los pacientes diagnosticados BK (+) presentan hasta 10 veces más probabilidad de transmitir la enfermedad que los pacientes con BK (-) (13).

**Tabla I. Comparación entre la Baciloscopía y el cultivo.**

Características	Baciloscopía	Cultivo
Diagnóstico	Da una probabilidad elevada	Da un diagnóstico con certeza
Técnica	Fácil, sencilla y rápida	Lenta: de 2 semanas a 2 meses (medio Lowenstein-Jensen) Más compleja
Costo	Económico	7-8 veces más caro
Especificidad	Buena (aunque colorea todas las especies de mycobacterias)	Buena (permite hacer la identificación de la especie)
Sensibilidad	Menor: se necesitan de 5,000 a 10,000 bacilos/ml de muestras para ser positiva	Buena: detecta desde 500 a 1,000 bacilos/ml de muestra

**Fuente:** Campollo, E. *et. al.* Manual de técnicas y procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis. 2da. ed. Guatemala. 2001

#### **d. Métodos convencionales**

##### **i. Método de las proporciones**

El MP o Método Proporcional de Canetti (MPC) 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.

Este método consiste en medir la proporción de bacilos resistentes que existe en un aislamiento 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 (14).

##### **ii. Sistema radiométrico BACTEC-460**

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  $^{14}\text{CO}_2$  (14).

#### **e. Métodos rápidos**

##### **i. 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 (14).

## **ii. Secuenciación automática de ADN**

La secuencia del ADN amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido la técnica más utilizada y es actualmente considerada la técnica de oro para estos fines. Entre los procedimientos utilizados para su realización (manuales y automatizados), 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) (15).

## **iii. Sistema de proteínas acarreadoras**

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 del 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 (15).

Hace unos años fue descrito un sistema similar al luciferasa, que utiliza la proteína o de fluorescencia verde (GFP, 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 (15).

## **iv. PCR en tiempo real**

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 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 la 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 PCR en tiempo real proporciona un método ágil y sencillo para la identificación de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a drogas antituberculosas (15).

#### **f. 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 ha desarrollado un grupo de novedosos métodos fenotípicos, los que brindan resultados rápidos mediante la detección de signos tempranos del metabolismo celular (16).

##### **i. Tubo indicador de crecimiento para micobacterias (MGIT)**

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 longitud de onda de 365 nm. Por tanto cuando se emplean drogas antituberculosas capaces de inhibir a *M. tuberculosis* se ve imposibilitada la manifestación de fluorescencia (16).

##### **ii. 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 especialmente *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 (16).

Este método que ha sido utilizado rutinariamente en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” para 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 (16).

### **iii. 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 púrpura insolubles (formazán), que luego de la solubilización pueden medirse por espectrofotometría y de forma visual. 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 (16).

Algunos autores recomiendan solubilizar el formazán con una mezcla duodecil sulfato de sodio (SDS) – ácido clorhídrico, isopropanol o una mezcla de SDS – dimetilformamida (DMF) (16).

## **B. Epidemiología mundial y regional**

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Región de Asia Sudoriental registró el mayor número de nuevos casos de TB, correspondiéndole el 34% de la incidencia mundial. Sin embargo, la tasa de incidencia estimada en el África es casi el doble que en la Región de Asia Sudoriental, con cerca de 2529 casos por 100,000 habitantes (Anexos 1- 3) (17).

Se calcula que 1,6 millones de personas murieron por tuberculosis en 2005, siendo la región africana la que registró el mayor número de muertes y de mortalidad por habitante. La

epidemia de tuberculosis en África avanzó rápidamente en los años 1990, pero el crecimiento se ha frenado poco a poco cada año, y ahora las tasas de incidencia parecen haberse estabilizado o haber comenzado a descender (17).

En 2005, la incidencia estimada de tuberculosis por habitante era estable o decreciente en las seis regiones de la OMS. No obstante, esa lenta disminución está contrarrestada por el crecimiento de la población. Como consecuencia, sigue aumentando el número de nuevos casos por año a escala mundial y en las regiones de la OMS de África, el Mediterráneo Oriental y Asia Sudoriental (Anexo 1) (17).

En los casos sin tratamiento previo, la proporción de resistencia por lo menos a una droga osciló del 0% en dos países de Europa occidental a 56,3% en Azerbaijan. La de multiresistencia osciló entre 0% en 88 países a 19,4% en Moldova y 22,3% en Azerbaijan. Sobre los 20 lugares con mayor proporción de TBMDR (tuberculosis multidrogorresistente: resistente como mínimo a isoniacida y rifampicina) 14 eran países de la antigua Unión Soviética y 4 regiones de China. Las Américas, Europa Central y África notificaron la menor proporción de TBMDR con la excepción de Perú (5,3%), Rwanda (3,9%) y Guatemala (3,0%) (Anexos 4-6)(17).

La incidencia global de TBMDR es de 489,139 casos/100,000 habitantes y la estimación de la proporción de resistencia en todos los casos de TB es de 4,8%.

### **C. Origen de la resistencia en *M. tuberculosis***

*Mycobacterium 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 epidemiológica. 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. 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 (17).

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, solo hasta la introducción de las drogas al tratamiento de la TB, pudo comprobarse que dentro de la enorme población de microorganismos que tienen un enfermo, muchos de ellos presentan mutaciones genéticas que los hacen comportarse como resistentes (17).

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. La cual se manifiesta con la resistencia a las drogas antituberculosas empleadas rutinariamente. Cuando se utiliza solo una droga como tratamiento para la TB, la mayoría de los bacilos sensibles a ésta son inhibidos o muertos, pero esto provoca la proliferación de los bacilos resistentes a la misma, esta resistencia puede ser transferida a otros bacilos ocasionando mutaciones en éstos, favoreciendo así la aparición de mutantes resistentes a la droga empleada. Además como el tratamiento es a largo plazo debido a que la población bacteriana es elevada, los bacilos mutantes resistentes continúan su multiplicación y se tornan en una infección incontrolada (18).

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 aparición de mutantes resistentes a la RIF es menos frecuente ( $10^7$ - $10^9$  bacilos) y de  $1 \times 10^2$ - $10^4$  para la PZA. 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 (18).

Por tanto, toda monoterapia llevará al fracaso y a la selección de resistencia. Es esta forma, la asociación de fármacos nunca usados en el enfermo 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 (18).

Existen tres conceptos completamente diferentes de resistencias. El primero de ellos se denomina “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. Cuando se produce por una mala terapéutica se da lugar a la “resistencia en casos previamente tratados”, denominada hace algunos años como “resistencia adquirida”, que siempre tendrá detrás de sí una mala colaboración por parte del enfermo, ocasionado por un inadecuado seguimiento del tratamiento (18).

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 peligro patógeno (19).

Otros factores pueden influir en la emergencia de la resistencia. La penetración de los antibióticos a los diferentes tejidos varía significativamente, alcanzando concentraciones subóptimas que favorecen la selección de mutantes resistentes en algunos tejidos. 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 (19).

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 Etionamida

(ETH), sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la resistencia cruzada entre la INH y la PZA, drogas análogas de la nicotinamida (19).

#### **D. Relación VIH/SIDA con *M. tuberculosis***

En cuanto a enfermedades oportunistas, la más común es la TB. Estudios de corte transversal han mostrado que entre el 5 y 9.3% de los pacientes tuberculosos son VIH positivos y por lo menos el 20% de los pacientes con SIDA padecen TB (20).

La TB, por su parte ocupa el cuarto lugar dentro de las causas de muerte a nivel mundial. En países en desarrollo se registran el 95% de estos casos, así como el 99% de muertes (20).

En Guatemala el Programa Nacional del SIDA ha reportado oficialmente al 31 de Marzo de 2000, 3553 casos de SIDA. De los cuales se estima que más de un 30% de pacientes con VIH positivo son coinfectados con *Mycobacterium* sp (20).

El departamento de Guatemala reporta más del 50% de los casos, seguido por Izabal y Retalhuleu. Al ubicar geográfica y en forma descendente las tasas registradas, se conforma un corredor que en uno de sus extremos tiene frontera con México, pasando por la costa sur, sube al centro del país y marca su otro extremo en la Costa Atlántica (20).

A pesar de que en el país la TB ha sido un problema que va de moderado a grave, en los últimos años se ha observado un aumento de la prevalencia de dicha enfermedad, ya que Guatemala se ubica dentro de los países donde la prioridad del control de TB es intermedia (Anexo 4) (20).

#### **E. Tratamiento**

Está condicionado al tipo de bacilo que se encuentre. A partir de un bacilo se origina de una colonia en la que unos de ellos estarán multiplicandose rápidamente, otros de modo intermedio, otros lentamente y algunos en estado inerte, sin metabolismo activo. Al

alcanzar cierto número de bacilos se empieza a producir mutaciones naturales y espontáneas. Esta mutación da lugar a la aparición de resistencias de tipo cromosómicas y por ello irreversibles, que están en relación con el número de bacilos presentes y el fármaco considerado. Esta situación ocasiona que no todos los elementos de la colonia tengan el mismo comportamiento frente a las diferentes drogas antituberculosas, por ello el tratamiento administrado debe ser una combinación de estas drogas (21).

#### **F. 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 (22).

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 de *caseum* (bolas blancas de pus en las amígdalas) tienen solo 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 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, 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 (22).

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; por ello, el tratamiento de la TB se realiza con drogas específicas (con

actividad antituberculosa). También se han descrito enzimas modificantes como las betalactamasas (22).

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 (23).

Los fármacos de primera línea incluyen: la isoniacida (INH), la rifampicina (RIF), la pirazinamida (PZA) y el etambutol (EMB) ó Estreptomycin (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) (23).

### **1. Estreptomycin**

El descubrimiento de la estreptomycin (STR) revolucionó el desarrollo de drogas antituberculosas; ésta fue introducida en 1944 para el tratamiento de TB. 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 mensajero. La proteína S12, una subunidad del ribosoma 30S, es el principal blanco de la STR (24).

La resistencia a esta droga está asociada a mutaciones cromosómicas que afectan a los genes *rpsL* o *rrs* que codifican para la subunidad proteica S12 o el ARN<sub>r</sub> 16S, respectivamente. 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 (24).

## 2. Isoniacida

La isoniacida (INH) es una droga sintética introducida en la terapéutica a partir de 1952, tiene un efecto 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 (25).

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 (25).

Se ha demostrado que mutaciones en el gen *katG* ofrecen altos niveles de resistencia a la INH en el 22-64% de los casos. 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 (25).

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 acilénolicos 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 (25).

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 ácido micólicos). Además, como

NADH es sustrato de las enzimas *katG* y *aphC*, niveles altos de NADH pueden competitivamente inhibir la peroxidación de la INH por *katG* (25).

Solo 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 *aphC* (alquil hidroperoxidoreductasa), *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 (25).

### 3. Pirazinamida

La pirazinamida (PZA) fue descubierta en 1952 y constituye una de las drogas de primera línea más importantes en el tratamiento de la TB. Esta droga es un análogo de la nicotinamida y difunde al interior de la célula por transporte pasivo (25).

La PZA es una pre-droga que es convertida en su forma activa (ácido pirazonoico) 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 (25).

El 72-97% de los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a la PZA tienen afectada usualmente, la actividad de la pirazinamidasa, enzima que es codificada por el gen *pncA*; aunque también la resistencia puede deberse a afectaciones durante la incorporación de la droga (26).

Durante el tratamiento la PZA ejerce 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. 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* (26).

En el caso de pirazinamida, se aplica otro método porque este fármaco no es activo contra *M. tuberculosis* bajo condiciones normales de cultivo (cerca a pH neutro), pero si en medios ácidos (pH 5, 5). En este caso, la detección de la enzima pirazinamidasa (enzima del *M. tuberculosis* que hidroliza la pirazinamida a ácido pirazinoico, que es la forma activa de la pirazinamida contra la bacteria; por lo tanto la presencia de la enzima indica que la cepa es sensible y su ausencia, resistencia) o método de Wayne es el estándar de oro. Las colonias de un cultivo fresco en Löwenstein-Jensen (LJ) son sembradas en agar Dubos. Los medios son incubados y posteriormente se añade fosfato de amonio. Si se observa forma una banda rosada luego de añadir el reactivo, esto indicaría que la pirazinamida ha sido hidrolizada a ácido pirazinoico, y se consideraría que la cepa es sensible a pirazinamida(27).

#### **4. Rifampicina**

La rifampicina (RIF) es un derivado semisintético de la rifampicina 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. 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 (27).

La RIF es un potente inhibidor de la síntesis de ARN mensajero, y por tanto de la transcripción genética; su mecanismo de acción primario es el bloqueo del paso de elongación dependiente de ácido desoxirribonucleico (ADN) que es llevado a cabo por la enzima ARN polimerasa de procariontas. 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 (27).

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 (27).

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, así como cambios en la permeabilidad de la membrana que afectan la incorporación de la droga (27).

## 5. Etambutol

El etambutol (EMB) es un derivado de la etilendiamina. Los primeros tratamientos con esta droga datan de 1968. 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 (28).

El EMB bloquea la incorporación de los ácidos micólicos al arabinogalactano o un paso en la biosíntesis de arabinogalactanos y lipoarabinomano 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 (28).

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 de la célula (28).

## **G. 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. Su principal requerimiento es que permitan diferenciar cepas susceptibles y resistentes, siendo la concentración crítica la que permite diferenciar entre ambas. 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 (28).

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, requiriéndose 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 (28).

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

**1. 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.

**2. 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.

**3. Concentración fraccionaria inhibitoria (CIF) y bactericida (CFB):** Es una interacción o relación de coeficientes de inhibición que indica cuándo una combinación de antimicrobianos con actividad inhibitoria es sinérgica ( $CIF < 0.5$ ), aditiva ( $CIF = 0.5-4$ ) o antagónica ( $CIF > 4$ ).

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 (28).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala la tuberculosis se ha convertido en una enfermedad re-emergente debido a varios factores como los problemas socioeconómicos, el descuido de los programas de control, la crisis mundial y por su asociación con la pandemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (24).

El creciente aumento de la resistencia de la *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas, ha provocando la aparición de cepas multidrogorresistentes (MDR). Es así que la mayoría de cepas de *M. tuberculosis* son resistentes al menos a la isoniacida y a la rifampicina, las drogas más importantes del tratamiento (25).

En la actualidad una tercera parte de la población mundial está afectada por *M. tuberculosis* (1722 millones de personas). Se estima que para el año 2020 alrededor de 1000 millones podrían contraer la infección, 200 millones desarrollar la enfermedad y unos 35 millones morir a causa de ésta. En América Latina se producen anualmente entre 250-300 mil nuevos casos y entre 20-25 mil muertes. El tratamiento de las cepas MDR con drogas de segunda línea, las que son menos eficaces, más tóxicas y más caras se encuentra en estos momentos amenazado por la aparición de cepas extremadamente resistentes (XDR) (25).

Es por ello que se propone en el presente trabajo la evaluación de la técnica en microplaca de MTT como marcador de la susceptibilidad micobacteriana en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt, siendo un método económico, fácil de elaborar, que no requiere de sustancias radioactivas y permite obtener los resultados en un menor tiempo (7-15 días). De obtener buenos resultados, este método podrá ser utilizado de rutina en el Laboratorio del Hospital Roosevelt para el beneficio de los pacientes con infecciones por *M. tuberculosis* multirresistente.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Evaluar la técnica en microplaca con MTT (3-(4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) como marcador para determinar la susceptibilidad de las micobacterias que se aíslan en el Hospital Roosevelt contra los agentes antituberculosos.

### B. Específicos

1. Aplicar el método de MTT como marcador en microplaca para la evaluación de la susceptibilidad a los agentes antituberculosos (Etambutol, Isoniacida y Rifampicina) en el laboratorio del Hospital Roosevelt.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los agentes antituberculosos (Etambutol, Isoniacida y Rifampicina) a las 30 cepas evaluadas de *M. tuberculosis*.
3. Comparar el método de MTT con el método de proporciones de Cannetti.
4. Determinar la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, costos y beneficios del método a analizar.

## **VI. HIPÓTESIS**

La técnica en microplaca con MTT (3-(4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) tiene una sensibilidad y especificidad similar al método de Proporciones de Cannetti para determinar la susceptibilidad de las micobacterias que se aíslan en el Hospital Roosevelt contra los agentes antituberculosos.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo de trabajo

Cepas del Laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt.

### B. Muestra

30 cepas previamente aisladas e identificadas *de M. tuberculosis*, con susceptibilidad a las drogas antituberculosas realizada por el método de proporciones de Cannetti.

### C. Recursos

#### 1. Humanos

Investigador:

Br. Hilda María Ruiz Chavarría

Asesores:

MSc. Vivian Matta

Licda. Remmei Gordillo

#### 2. Institucionales

Departamento de Citohistología. Escuela de Química Biológica de la Universidad de San Carlos.

Laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt.

#### 3. Físicos

##### a. Equipo

- Campana de flujo laminar tipo II
- Baño María

- Incubadora (37°C)
- Refrigerador a 4°C
- Refrigerador a -10°C
- Pipetas automáticas (10,100,1000 µL)
- Pipeta multicanal (100 µL)
- Incinerador eléctrico
- Horno
- Turbidímetro McFarland
- Balanza analítica
- Autoclave

#### **b. Cristalería**

- Probetas graduadas (10, 250, 500 mL)
- Beakers (50, 250, 500 mL)
- Frascos con tapón de rosca de 500 mL
- Erlenmeyers (250 y 500 mL)
- Tubos de vidrio con rosca (15 mL)
- Tubos de vidrio claros (10 mL) y
- Pipetas (5 y 10 mL)

#### **c. Reactivos**

- Solución dimetil sulfóxido (DMSO)
- Agua destilada
- Isoniacida
- Etambutol
- Rifampicina
- Tween 80 al 20%
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT)
- Etanol absoluto

- Caldo Middlebrook 7H9
- Glicerol
- Glucosa
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Ácido oleico (10ml 0.05M NaOH más 0.12 de ácido oleico)
- Medio de cultivo Löwenstein-Jensen
- Medio Middlebrook 7H9
- Solución de Ruth

#### **d. Materiales**

- Cinta testigo
- Papel aluminio
- Marcador permanente
- Parafilm
- Macropipeteador
- Asa bacteriológica redonda de 5 mm y en punta
- Gradillas
- Guantes de látex
- Lentes protectores
- Mascarillas N 95
- Bata blanca de manga larga
- Jabón desinfectante
- Papel mayordomo
- Algodón
- Microplacas con fondo plano y tapadera, estériles de 96 pozos
- Cámara húmeda
- Viales eppendorf de plástico con tapón
- Espátulas pequeñas

- Filtros estériles poro 0.25  $\mu\text{m}$ .
- Puntas de pipetas de 100 y 1000  $\mu\text{L}$

#### **e. Cepa de micobacteria**

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294

### **D. Procedimiento de Microensayo MTT**

**1. Selección de las cepas:** 30 cepas elegidas por conveniencia de *M. tuberculosis* previamente aisladas en el laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt, evaluadas por el método de proporciones de Cannetti, elegidas al azar.

**2. Preparación del inóculo:** A partir del cultivo de la cepa en medio Löwenstein-Jensen durante 3-4 semanas a 37°C. Se suspendió la cepa en medio Middlebrook 7H9 enriquecido e incubó por 24 horas. Una vez obtenida una suspensión bacteriana con turbidez similar al estándar McFarland 1, se realizó una dilución 1:20 en medio Middlebrook 7H9 enriquecido, la cual se empleó para la ejecución del ensayo.

#### **3. Preparación de las drogas:**

- Se preparó un stock de Isoniacida y Etambutol a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en caldo Middlebrook 7H9.
- Se preparó un stock de Rifampicina a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en DMSO. Seguidamente se preparó una dilución 1:10 para alcanzar una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio Middlebrook 7H9.

#### **4. Preparación del Medio Middlebrook 7H9:**

- Se pesó 4.7 g de caldo de base Middlebrook 7H9
- Se midieron 900 mL agua desmineralizada estéril y 5 mL de glicerol.
- Se mezclaron los reactivos en el agua, se homogenizó y esterilizó a 121°C a 15 libras de presión, durante 15 minutos.

### 5. Suplemento de Ruth:

- Se pesó 0.42g de NaCl y 2.5g de glucosa
- Se midieron 2.5 mL de ácido oleico (10 mL de 0.05M de NaOH más 0.12 mL de ácido oleico)
- Posteriormente se disolvieron en 50 mL de agua destilada estéril y se filtró con un filtro estéril con un poro de 0.25  $\mu\text{m}$ .
- **Middlebrook enriquecido:** Se mezclaron 44 mL del medio Middlebrook con 6mL de suplemento de Ruth.

**6. Preparación de la solución MTT:** Se preparó una solución madre de MTT a una concentración de 5 mg/ml en 1ml de agua destilada estéril, se filtró con un filtro estéril poro 0.25  $\mu\text{m}$ , se alicuotó y conservó a 4°C protegida de la luz. Para realizar la solubilización del formazán (cristales de MTT reducidos), se utilizó una mezcla 1:1 de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% y dimetilformamida (DMF) al 50%.

**7. Preparación del Tween 80 al 20%:** Se midieron 20mL de reactivo tween 80 concentrado y se disolvió en 80mL de agua estéril. Se mezcló y almacenó en la incubadora (37 °C) hasta disolver totalmente, posteriormente se esterilizó por 15 minutos a 121°C a 15 libras de presión.

- **Solución reveladora:** 1.8 mL de MTT + 2.16 mL de Tween 80 (27).

**8. Montaje de la placa:** Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y tapadera. En este proceso se realizaron 5 repeticiones con las 30 cepas y los 3 antibióticos.

- Se depositaron 200 $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril en todos los pocillos de la periferia de la placa. Seguidamente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de medio Middlebrook 7H9 enriquecido a los 60 pocillos restantes.

- Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo en todos los pocillos con excepción de los pocillos marcados como control de esterilidad del medio, en estos pocillos se colocaron 100  $\mu\text{L}$  más del medio Middlebrook 7H9. De esta forma todos los pocillos alcanzaron un volumen de 200  $\mu\text{L}$ .
- Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de trabajo de cada droga en los pocillos de la fila B. Se realizaron diluciones (1:2) dobles seriadas hasta la fila G descartando los 100  $\mu\text{L}$  finales. De esa forma la droga quedó en un rango de concentración de 2– 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- En el pocillo marcado como D9 se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo, como control de crecimiento.
- Incubación: Se colocaron las placas selladas con parafilm en una cámara húmeda de 7- 15 días a 37°C.

Se utilizó control positivo el medio de cultivo con RIF (medicamento de elección contra la enfermedad de la TB) a concentraciones desde 2 hasta 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el cual presenta un 100% de inhibición del crecimiento de las cepas; como control negativo se empleó medio de cultivo sin ningún aditivo (27).

**9. Revelado de la placa:** Después de los días de incubación se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de MTT 5  $\text{mg}/\text{mL}$  + 12  $\mu\text{L}$  de Tween 80 al 20 % a cada pozo, excepto en los pozos del perímetro y se incubó la placa por 24 horas más a 37°C y se observó el cambio de color en los pozos.

## **10. Lectura e interpretación de los resultados**

Se realizó de manera visual:

Color amarillo: no crecimiento de la bacteria (susceptible).

Color púrpura: crecimiento de la bacteria (resistente). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la menor concentración de la droga en la cual no hay cambio.

### E. Diseño del estudio

Se evaluaron 30 cepas elegidas por conveniencia, por razones de costo y logística, previamente aisladas de *M. tuberculosis* y cuya susceptibilidad a las drogas antituberculosas fue realizada por el método de proporciones de Cannetti. Estas fueron elegidas al azar por las personas encargadas del área del Laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt, por lo que el estudio fue doble ciego.

Se realizó una comparación de métodos, en el cual se evaluó el método en microplaca MTT con el método de proporciones de Cannetti (MPC), que es el método estándar de oro. Con los resultados obtenidos de esta comparación se determinó la sensibilidad, especificidad, índice Kappa (para medir la concordancia) del método en microplaca MTT; se determinó la susceptibilidad o la resistencia de las cepas previamente aisladas a las diversas drogas antituberculosas.

**Tabla de doble entrada empleada para la interpretación de los resultados**

	<b>Método de Referencia, Cannetti (+)</b>	<b>Método de Referencia, Cannetti (-)</b>
<b>Método en estudio, MTT (+)</b>	Verdaderos positivos	Falsos positivos
<b>Método en estudio, MTT (-)</b>	Falsos negativos	Verdaderos negativos
	<b>Total de positivos</b>	<b>Total de negativos</b>

Para la interpretación de los resultados se considera como positivo a una cepa resistente y negativo a una cepa susceptible

La lectura se realizó de manera visual, evidenciando el cambio de color de amarillo a violeta. El color violeta se tomó como resistente y si no hubo cambio de color se consideró que la droga antituberculosa empleada inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis*, lo que indica que la micobacteria es susceptible a la misma. Estos datos obtenidos fueron introducidos en una tabla de dos por dos para facilitar su análisis e interpretación.

Si las 30 cepas son susceptibles o resistentes a los cuatro fármacos empleados, se procedió a evaluar el procedimiento, el medio o la presencia de contaminantes que pudieron alterar los resultados.

También se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la menor concentración de la droga donde no ocurrió cambio de color.

Al final con los datos completos obtenidos se procedió a evaluar la similitud entre los antibióticos evaluados con los dos métodos, y a determinar la eficacia del método en microplaca MTT.

### **1. Tipo de estudio**

Estudio experimental de tipo prospectivo, ya que la investigación se basó únicamente en los resultados obtenidos.

### **2. Análisis estadístico**

Se utilizó una tabla dos por dos con los resultados obtenidos y se procedió a calcular la sensibilidad, la especificidad y el índice Kappa de cada antibiótico analizado (Anexo 7).

El método bioquímico colorimétrico de MTT utiliza indicadores de oxido-reducción con una sensibilidad del 100 % y una especificidad de 95 % y una correlación del 93.7 % (27).

## VIII. RESULTADOS

En este estudio se evaluaron 30 cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de muestras referidas al Laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt, las cuales habían sido previamente aisladas y su susceptibilidad evaluada por el método de referencia (MPC) en el año 2008. Todas ellas fueron evaluadas por el método en microplaca MTT; el cual permitió evaluar la viabilidad celular de las micobacterias ante la exposición a los antibióticos de primera línea (rifampicina, etambutol e isoniacida). Este método se basa en la degradación del reactivo ante la presencia de la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, facilitando la interpretación de los resultados mediante un viraje de color. Para disminuir los errores sistemáticos se realizaron 5 repeticiones de cada cepa por cada tipo de antibiótico.

Los resultados obtenidos en la evaluación por el método en microplaca MTT fueron posteriormente comparados con los obtenidos por el método de proporciones de Cannetti; los cuales hasta ese momento eran desconocidos por el investigador. Esta comparación permitió obtener la sensibilidad, especificidad e índice Kappa para el método en microplaca MTT para cada antibiótico evaluado (Tabla No.1).

El principal inconveniente para la evaluación de la susceptibilidad para micobacterias por MPC, es el tiempo ya que se requiere de 42 días, mientras que el tiempo establecido para el informe de los resultados por el método en microplaca MTT fue de 8 días. Se obtuvo para la INH un total de 10 cepas resistentes y 6 sensibles por ambos métodos y 14 resultados discordantes, los cuales fueron susceptibles por el MPC y resistentes por MTT, indicando que son falsos positivos. Estas 14 cepas discordantes contribuyeron a la obtención de una concordancia débil entre ambos métodos (índice Kappa =0.22). Para RIF, 27 cepas fueron sensibles y 3 cepas fueron resistentes por ambos métodos, no se obtuvo ningún resultado discordante por lo que la concordancia entre ambos métodos fue muy buena (índice Kappa =1.00). En la evaluación del EMB, 30 cepas fueron sensibles por ambos métodos y no se encontró ninguna cepa resistente, por lo que no fue posible la evaluación de la sensibilidad, especificidad e índice Kappa (Tabla No.1).

Para el método en microplaca MTT la sensibilidad alcanzada fue del 100% para INH y RIF. La especificidad fue del 30% para INH y 100% para RIF (Ver tabla No. 1).

**Tabla No. 1.** Resultados obtenidos de las 30 cepas de *M. tuberculosis* mediante la técnica en microplaca MTT contra el método de referencia MPC.

Drogas	MTT	MPC		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice Kappa
		R	S			
INH	R	10	14	100	30	0.22
	S	0	6			
EMB	R	0	0	NA	NA	NA
	S	0	30			
RIF	R	3	0	100	100	1
	S	0	27			
<b>Método en microplaca MTT</b>				100	81.8	0.78

Fuente: Datos experimentales.

Índice Kappa: < 0.20= Pobre, 0.21-0.40= Débil, 0.41-0.60= Moderada, 0.61-0.80= Buena, 0.81-1.00= Muy buena

MPC= Método de Proporciones de Cannetti.

MTT= Técnica en microplaca 3-(4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio

NA: No aplicable

Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) de cada antibiótico evaluado con cada cepa. Obteniéndose para INH 11 cepas en el rango de 1-0.5 µg/mL y 19 cepas en el rango 0.5-0.25 µg/mL. Para RIF 27 cepas mayor de 2 µg/mL y 3 cepas en el rango de 1-0.5 µg/mL y en el EMB las 30 cepas se encontraron mayor de 2 µg/mL (Tabla No.2).

**Tabla No. 2** Resultados de la CIM de cada droga con las 30 cepas evaluadas mediante la técnica en microplaca MTT.

<b>Droga /CIM</b>	<b>2µg/mL</b>	<b>2 - 1 µg/mL</b>	<b>1 – 0.5 µg/mL</b>	<b>0.5 – 0.25 µg/mL</b>
Isoniacida	----	----	11 cepas	19 cepas
Rifampicina	27 cepas	----	3 cepas	----
Etambutol	30 cepas	----	----	----

Fuente: Datos Experimentales

La sensibilidad, especificidad e índice Kappa del método en microplaca MTT fue de 100%, 81.8% y 0.78 respectivamente (Tabla No. 1).

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

La resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas, ha emergido como resultado de tratamientos inapropiados o inconclusos, lo que ha favorecido la multiplicación selectiva de cepas resistentes. 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 en el menor tiempo posible. El tiempo establecido para emitir un informe de susceptibilidad por el método de referencia MPC tarda alrededor de 42 días, por lo que se consideró conveniente evaluar el desempeño del método colorimétrico en microplaca MTT para la detección temprana de resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas de primera línea (isoniacida, rifampicina y etambutol). Los resultados demuestran que este método reduce el tiempo de emisión de los resultados a 7-8 días, y demostró ser una herramienta útil en la determinación rápida de farmacorresistencia frente al método de referencia (29).

La técnica en microplaca MTT presentó una alta sensibilidad y una baja especificidad (100% y 30% respectivamente) para INH, lo que indica que esta técnica es capaz de detectar el total de los verdaderos positivos dentro de una población positiva, en este estudio un verdadero positivo incluyó a las cepas resistentes a la droga evaluada por ambos métodos, pero solo posee la capacidad de detectar a un 30% de verdaderos negativos dentro de una población negativa (se tomó como verdadero negativo a las cepas susceptibles a la droga evaluada por ambos métodos). Esta discrepancia puede deberse a que las cepas evaluadas forman parte del cepario del departamento de Microbiología del Hospital Roosevelt, por lo que debe tomarse en cuenta el tiempo, almacenamiento y las constantes resiembras, factores que aumentan la probabilidad de mutación, y pueden favorecer la selección de cepas mutantes en el gen *ndh*, responsable de la resistencia a INH (30).

Para la RIF los resultados fueron excelentes ya que se obtuvo una alta sensibilidad y especificidad (100%) lo que indica que la técnica fue capaz de detectar el 100% de verdaderos positivos y verdaderos negativos dentro de una población heterogénea (es decir

cepas resistentes y sensibles). Esto demuestra la alta efectividad que tiene la RIF contra *M. tuberculosis* tanto para bacterias metabólicamente activas como para bacterias en estado de latencia. Por tal motivo, esta droga se considera como un buen indicador de cepas multirresistentes. Debido a su alta actividad bactericida RIF junto con INH forman la columna vertebral de quimioterapia de curso corto. Por lo que la resistencia a ambas drogas obliga a elegir drogas de mayor efectividad, mayor toxicidad y mayor costo (30 y 34).

La monorresistencia a la RIF es rara y más del 90% de las cepas resistentes a la RIF presentan además resistencia a INH, esto ha convertido la resistencia a RIF en un marcador de multidrogorresistencia (MDR), especialmente en países con una elevada prevalencia de cepas resistentes. En este estudio, se incluyeron 10 cepas resistentes a INH, de las cuales 7 cepas fueron resistentes únicamente a INH y 3 cepas resistentes a INH y RIF, tanto por el método de referencia (MPC) como con el método en estudio (MTT). Lo que indica que estas cepas pueden considerarse como MDR. Es importante detectar cepas multirresistentes ya que esto determinará en gran medida el éxito del tratamiento, la complejidad y el costo del manejo terapéutico (33).

En el caso del EMB no es posible evaluar la sensibilidad y la especificidad. La selección de las cepas utilizadas en este estudio fue por doble ciego por lo que se desconocía el perfil de resistencia de las cepas seleccionadas y no se incluyeron cepas resistentes por el método de referencia (MPC). Esto condujo que al método en estudio (MTT) no se le evaluara la sensibilidad y especificidad real para esta droga.

En el Laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt durante el año 2008 de las 256 (100%) cepas aisladas, únicamente 2 (0.78%) cepas mostraron resistencia a etambutol por el Método de Proporciones de Cannetti. En estudios anteriores Madison *et al* ha descrito que se tienen diversas dificultades durante la evaluación de la actividad antituberculosa de la STR y EMB. Para el EMB estas dificultades han sido atribuidas al efecto bacteriostático de la droga sobre *M. tuberculosis*, a su poca actividad en los medios de cultivo y al estrecho rango que existe entre la CIM de las cepas sensibles de las resistentes (32 y 33).

El índice Kappa obtenido para INH fue de 0.22 lo que indica que la concordancia entre el método de referencia (MPC) y el método en estudio (MTT) es débil ya que se obtuvieron 14 cepas con resultados falsos positivos, es decir que por el Método de referencia (MPC) eran sensibles y por el método en estudio (MTT) fueron resistentes (Tabla No.1). Por otro lado para la RIF el índice Kappa obtenido fue muy bueno (1.00) ya que no se obtuvo ningún resultado discordante, la concordancia entre el método de referencia y el método en estudio fue del 100%.

Para el EMB el índice Kappa fue no aplicable ya que no se evaluaron cepas resistentes por el método de referencia; por lo que se considera necesario realizar estudios con mayor cantidad de aislamientos de los cuales se conozca su perfil de resistencia con el método de referencia. Con lo anterior se obtendrán resultados más confiables y representativos en cuanto a esta droga y pruebas con diferentes concentraciones críticas del medicamento.

En la determinación de la CIM de las diferentes drogas utilizadas para INH se obtuvo que de las 30 cepas evaluadas, en 19 cepas la CIM obtenida fue de 0.25  $\mu\text{g/mL}$  y para las otras 11 de 0.50  $\mu\text{g/mL}$ , estos datos concuerdan con los reportados en la literatura ya que la INH tiene una CIM baja de 0.02 a 0.06  $\mu\text{g/mL}$ . Para la RIF se obtuvo que 27 cepas mostraron una CIM mayor de 2  $\mu\text{g/mL}$  y únicamente 3 de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Según la literatura para RIF la concentración mínima inhibitoria es de 0.1 a 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , lo que explica que a altas concentraciones se obtiene un mayor número de cepas sensibles a esta droga (35).

La CIM obtenida para EMB fue mayor a 2  $\mu\text{g/mL}$ , este resultado obtenido concuerda con el indicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) la que sugiere que para esta droga la CIM es  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ . Existen trabajos que utilizan diferentes concentraciones de etambutol en las pruebas de resistencia y esto ha hecho que a concentraciones bajas se detecte mayor cantidad de microorganismos resistentes. Estudios realizados por la OMS han considerado al etambutol como un medicamento de difícil evaluación, con resultados poco reproducibles (35).

La desventaja encontrada en este estudio al determinar la CIM se realizó de manera visual, por lo que se recomienda la utilización de un espectrofotómetro o determinar el índice

CIM/CMB (Concentración mínima bactericida), empleado para indicar la potencia de un antimicrobiano (36).

Las desventajas principales de este tipo de metodología es el alto grado de generación de aerosoles, lo que provocó numerosas veces la contaminación de las placas entre corridas y un aumento en el riesgo biológico debido a la baja bioseguridad que se tiene al usar placas con medio líquido (37).

La sensibilidad, especificidad e índice Kappa obtenidos en este estudio para el método en microplaca MTT fue del 100%, 81.8% y 0.78 respectivamente. Lo cual concuerda con lo reportado en estudios anteriores por Urgate quién reporta una sensibilidad del 100 % y una especificidad de 95 % y una correlación del 93.7 % (27). Demostrando que este método puede ser utilizado para la obtención temprana del perfil de resistencia de *M. tuberculosis*.

La comparación de ambos métodos demuestra que el método en microplaca MTT no requiere de mucho tiempo de incubación de las muestras para la obtención de resultados confiables, permite obtener un perfil de resistencia temprana de *M. tuberculosis* y así tomar las medidas epidemiológicas necesarias evitando su diseminación. Además no se necesita personal altamente capacitado para llevar a cabo el método en estudio (MTT) no así para el MPC el cual necesita personal capacitado y con experiencia, donde para conocer el perfil de resistencia de una micobacteria se requiere de muchas diluciones y concentraciones críticas de las drogas, además éste método (MPC) presenta la desventaja de la formación de grumos en los tubos lo que impide realizar el conteo exacto de las colonias (38).

La comparación entre el método en microplaca MTT y el Método de proporciones de Cannetti (MPC) con base a los resultados obtenidos en este estudio, se determinó que el método en microplaca MTT tiene un costo mayor que el MPC (Q15 y Q8 respectivamente), sin embargo, los beneficios que este método presentó fue el tiempo corto de obtención de los resultados (7-8 días, respecto a los 42 días de MPC), no es un método muy laborioso en comparación con MPC y no se requiere de personal capacitado.

## X. CONCLUSIONES

1. Se evaluó el método en microplaca MTT demostrando que es una alternativa rápida y de fácil ejecución para la detección de cepas multidrogorresistentes.
2. El método en microplaca MTT es un buen marcador para la detección temprana de resistencia a rifampicina.
3. Las concentraciones mínimas inhibitorias encontradas en este estudio concuerdan con las reportadas en la literatura para las drogas evaluadas.
4. El método de microplaca MTT al ser comparado con el de Cannetti presenta una buena sensibilidad (100%), moderada especificidad (81.88%) y una buena concordancia respecto al índice kappa de 0.78
5. Para el etambutol no fue posible determinar la sensibilidad, especificidad y el índice Kappa debido a que no se evaluó ninguna cepa resistente.
6. La Rifampicina fue la única droga con la que se obtuvo una buena concordancia entre ambos métodos.
7. El método en microplaca MTT demostró ventajas al disminuir el tiempo de obtención de los resultados y no requerir personal altamente capacitado.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Trabajar una cepa por placa para evitar contaminación del medio de los otros pozos, debido al alto grado de generación de aerosoles.
2. Implementar este tipo de técnicas en los laboratorios que cuenten con la infraestructura y un elevado volumen de muestras.
3. Realizar ensayos con un número mayor de muestras, incluyendo diferentes concentraciones críticas de la droga etambutol para determinar la concordancia entre ambos métodos.
4. Estandarizar y mejorar los protocolos de almacenamiento de las cepas para favorecer su uso en estudios similares al presente.
5. Evaluar estos métodos con cepas que no han sido almacenadas por largos períodos de tiempo y realizar los ensayos simultáneamente para evitar el re-aislamiento y la selección de cepas mutantes.
6. Utilizar el índice CIM/CMB en drogas como EMB, medicamento de difícil evaluación y que presenta resultados poco reproducibles, para indicar su potencia y la concentración efectiva evitando así el uso de concentraciones excesivas que favorezcan el aumento de la toxicidad.

## XII. REFERENCIAS

1. Lickes S. Evaluación de pruebas inmunoenzimáticas para el diagnóstico de tuberculosis en pacientes infectados con el VIH. (Tesis para optar al título de Química Bióloga, Universidad de San Carlos de Guatemala). Guatemala. 2001. Pp.4-8.
2. Jiménez A. Susceptibilidad antibiótica y perfil genético de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002. (Tesis para optar al título de Química Bióloga, Universidad de San Carlos de Guatemala). Guatemala. 2004. Pp.2-6,12-18
3. Lemus D. Métodos rápidos para la detección de resistencia en *M. tuberculosis*. (tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”). Habana, Cuba. 2007. Pp. 43,44, 51-53, 135,136.
4. Samayoa M. actividad inhibitoria de cinco extractos de arbustos contra *M. tuberculosis* y *M. smegmati*. (Tesis para optar al título de Química Bióloga, Universidad de San Carlos de Guatemala). Guatemala. 2008. Pp. 34
5. OMS. Tuberculosis. Fact Sheet No. 104. 2000. Pp. 1-4.
6. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª. Edición. Editorial Pearson Educación,S.A. Madrid. 2004. Pp. 412- 413.
7. Koneman *et al.* Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas color. 5ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2004. Pp. 867-880.
8. Brooks *et al.* Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª. Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V. México. 2002. Pp. 345-352.
9. Grange J. Resistencia a drogas y eliminación de la tuberculosis. (boletín de la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias) vol. 65. Reino Unido. 1990. Pp. 63-66.

10. Caminero J. Tratamiento de la Tuberculosis. (Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias). París. 2002.
11. Gómez J y Mackinney J. *M. tuberculosis* persistence, latency and drug tolerance. *Tuberculosis* 84, 29-44. 2004. Pp. 31-35.
12. Comstock G. Prevención de la Tuberculosis. (boletín Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias). Vol. 65. Estados Unidos. 1991. Pp. 9-11.
13. Daniels M. Epidemiología de la Tuberculosis: ¿vale más prevenir que curar? MRC Biostatistics Unit, Medical Research Council Centre, Hills Road. Gran Bretaña 2000. Pp. 138-140.
14. World Organization. Global DOTS expansión plan. Progress in tuberculosis control in high-burden contries. WHO/CDS/STB/2001. 2001. Pp. 32 y 40.
15. Gómez R *et al.* Determination of MIC's for *Mycobacterium avium- M. intracellulare* complex in liquid medium by Colorimetric Method. *J. Clin. Microbiol.* 1995. Pp. 2236-2239.
16. Caminero J y Fernández F. Manual de Neumología y Cirugía torácica; Tuberculosis y otros micobacteriosis Madrid, España Doc. Tec. 1998. p.1389-1419.
17. Murray J. Investigación económica, social y operacional sobre la tuberculosis (Boletín Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias). Vol. 8. Madrid. 1995. Pp. 168-171.
18. Samayoa E. Caracterización molecular y susceptibilidad a antibióticos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes en un hospital urbano en Guatemala (*Int Conf SIDA*). Guatemala. 2004.

19. Vásquez L *et al.* Frecuencia de Micobacterias en pacientes VIH positivos (Boletín informativo). Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública. Vol. 14. Perú. 1997.
20. OMS. Tuberculosis. Fact sheet. No. 104. 2000. Pp. 30,55
21. Carthirero L. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. Hospital de Gran Canaria, Servicio de Neumología. Gran Canaria. 2001. Pp. 35-38.
22. Orme I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. American Society for Microbiology. Illinois. 2001. Pp. 1943-1945.
23. Yajko D *et al.* Colorimetric Method for Determining MIC's of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. American Society for Microbiology. San Francisco. 1995. Pp. 2324-2327.
24. Aguilar S. Situación de la epidemia VIH/ SIDA en Guatemala. (proyecto de Acción SIDA de Centro América). Documento técnico del Programa Conjunto de la Organización de Naciones Unidas sobre el VIH-SIDA –ONUSIDA-. Guatemala. 2001. Pp. 34-40.
25. Méndez A *et al.* Controlling multidrug-resistant tuberculosis and Access to expensive drug: a rational framework. (Boletín de la OMS) 2002. Pp. 489-490
26. Porras T *et al.* Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de fármaco resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Instituto Nacional de Salud. Colombia. 2005. Pp. 120-137.
27. Urgate C *et al.* Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis* (Boletín informativo del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt Universidad Peruana Cayetano Heredia). Perú. 2008.
28. Trejo S. Determinación de anticuerpos anti-virus de inmunodeficiencia humana en pacientes con tuberculosis pulmonar. Guatemala. 1998. Pp. 56-60.

29. Musa *et al.* Drug Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy positive sputum sample. Journal of Clinical Microbiology. Argentina. 2005. Pp. 3159-3161.
30. Morbidoni *et al.* Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. Revista Argentina de Microbiología. Argentina. 2006. Pp. 97-109.
31. Kim S. Series drug susceptibility testing in tuberculosis: Methods and reliability of results. European Respiratory Journal. 2005. Pp. 564-569.
32. Madison *et al.* Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods, J Clin Microbiol. 2002. Pp. 3976-3979.
33. Mshana *et al.* Use of 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. Ethiopia. 1998. Pp. 3976-3979.
34. Porras *et al.* Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Instituto Nacional de Salud. Colombia. 2005.
35. World Health Organization. International union against tuberculosis and lung disease. Global Project and anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Geneva, Switzerland. 2002.
36. Fernández *et al.* Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. Centro de investigación Biomédica del Noreste. Instituto Mexicano de Seguro Social. Monterrey. 2005. Pp. 13-19.
37. Galí *et al.* Use of a Mycobacteriophage-Based Assay for Rapid Assessment of Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates to Isoniazid and Influence

of Resistance Level on Assay Performance. Journal of Clinical Microbiology. España. 2005. Pp. 201-205.

38. Galindo *et al.* Resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* en el área del Hospital de Sagunto desde 1999 al 2004. Revista Clínica Española. 2006. Pp. 243-248.

### XIII. ANEXOS

#### ANEXO 1

#### INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS Y MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS, 2005 (ESTIMACIONES)

Incidencia, prevalencia y tasas de mortalidad de la tuberculosis, 2005 (estimaciones)								
	Incidencia <sup>a</sup>				Prevalencia <sup>a</sup>		Tasas de mortalidad	
	Todas las formas		Casos bacilíferos <sup>b</sup>					
Región de la OMS	número (miles) (% del total mundial)	por 100000 habitantes	número (miles)	por 100000 habitantes	número (miles)	por 100000 habitantes	número (miles)	por 100000 habitantes
África	2 529 (29)	343	1 088	147	3 773	511	544	74
Las Américas	352 (4)	39	157	18	448	50	49	5.5
Mediterráneo Oriental	565 (5)	104	253	47	881	163	112	21
Europa	445 (5)	50	199	23	525	60	66	7.4
Asia Sudoriental	2 993 (34)	181	1 339	81	4 809	290	512	31
Pacífico Occidental	1 927 (22)	110	866	49	3 616	206	295	17
<b>Mundo</b>	<b>8 811 (100)</b>	<b>136</b>	<b>3 902</b>	<b>60</b>	<b>14 052</b>	<b>217</b>	<b>1 577</b>	<b>24</b>

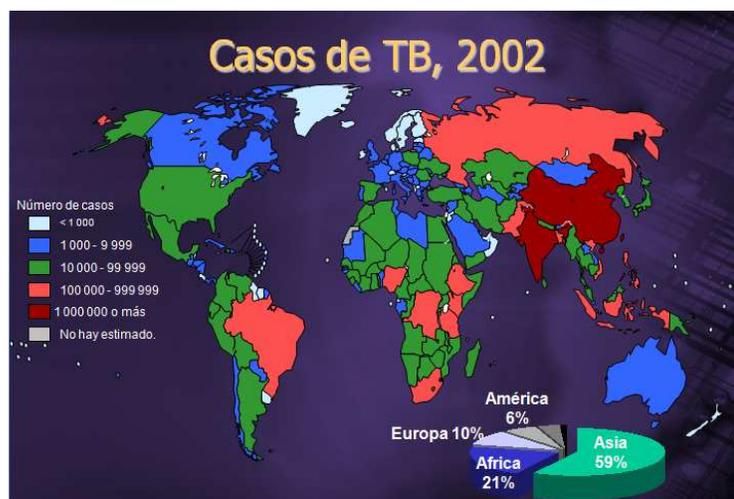
<sup>a</sup>Incidencia - número de nuevos casos registrados en un periodo determinado; prevalencia - número de casos en una población en un momento determinado.

<sup>b</sup>Casos bacilíferos - son los confirmados por estudio microscópico del frotis; son los casos más infecciosos.

Fuente: Daniels M. Epidemiología de la Tuberculosis: ¿vale más prevenir que curar? MRC Biostatistics Unit, Medical Research Council Centre, Hills Road. Gran Bretaña 2000.

## Anexo 2

**Casos de tuberculosis en el mundo.** World Organization. Global DOTS expansión plan. Progress in tuberculosis control in high-burden contries. WHO/CDS/STB/2001. 2001.



Fuente: World Organization. Global DOTS expansión plan. Progress in tuberculosis control in high-burden contries. WHO/CDS/STB/2001. 2001.

## Anexo 3

**Tasa de incidencia estimada de tuberculosis en América Latina (Por 100,000 habitantes, 2003).** OMS. 2000. Fact Sheet No. 104. 2000.

› 85	› 50-84	25- 49	‹ 24
Bolivia	Bahamas	Argentina	Caribe inglés
Ecuador	Brasil	Belice	Costa Rica
Guatemala	Colombia	Chile	Cuba
Guyana	El salvador	México	Canadá
Haití	Panamá	Uruguay	EUA
Honduras	Paraguay	Venezuela	Puerto Rico
Nicaragua	Surinam		Jamaica
Perú			
República Dominicana			

Fuente: OMS. Tuberculosis. Fact Sheet No. 104. 2000

## Anexo 4

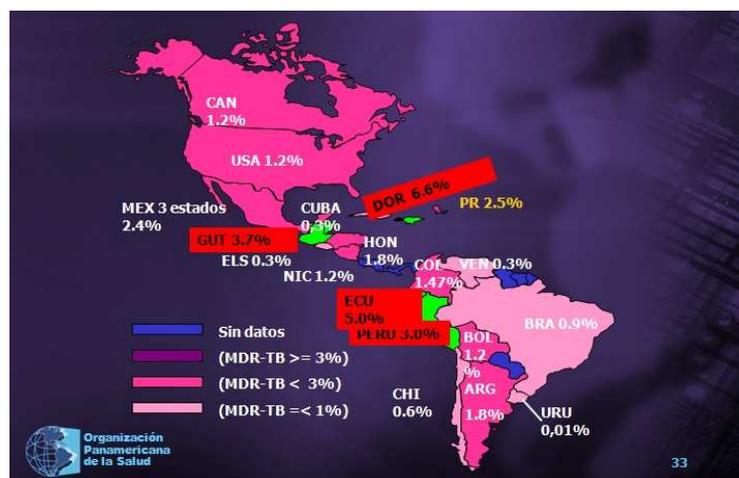
**Prioridades para el control de la TB/ VIH en las Américas.** World Organization. Global DOTS expansión plan. Progress in tuberculosis control in high-burden contries. WHO/CDS/STB/2001. 2001.



Fuente: World Organization. Global DOTS expansión plan. Progress in tuberculosis control in high-burden contries. WHO/CDS/STB/2001. 2001.

## Anexo 5

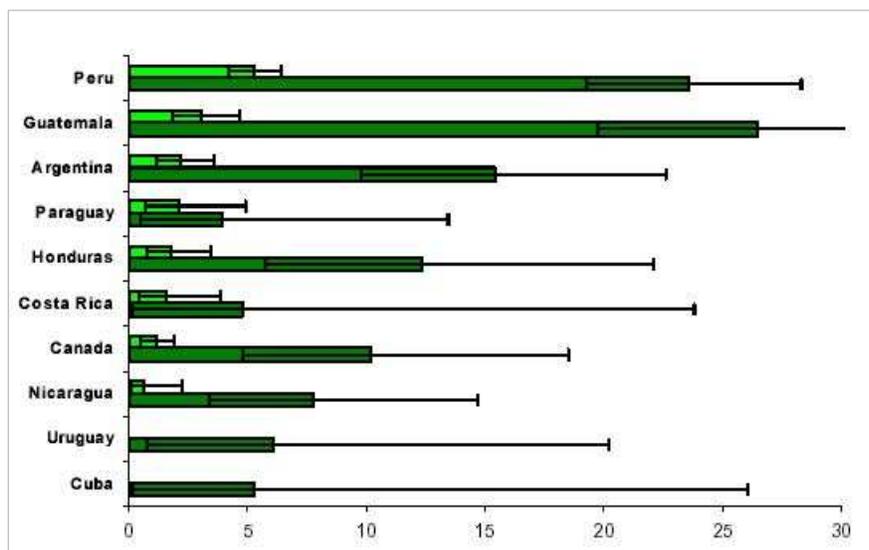
**MDR en la respuesta inicial a fármacos anti- TB (Región de las Américas 2002).** World Organization. Global DOTS expansión plan. Progress in tuberculosis control in high-burden contries. WHO/CDS/STB/2001. 2001.



Fuente: World Organization. Global DOTS expansión plan. Progress in tuberculosis control in high-burden contries. WHO/CDS/STB/2001. 2001.

## Anexo 6

El siguiente gráfico, tomado del informe de OMS, muestra la prevalencia de TBMDR en casos nuevos (verde claro) y casos con tratamiento previo (verde oscuro) en Latinoamérica (WHO/HTM/TB/2008.394).



Fuente: OMS. Tuberculosis. Fact Sheet No. 104. 2000

## Anexo 7

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

**Sensibilidad**= verdaderos positivos x 100 / Total de positivos

**Especificidad**= verdaderos negativos x 100 / Total de negativos

**Concordancia**= (verdaderos positivos + verdaderos negativos) x 100 / (total de positivos + total de negativos).

**Índice Kappa** = Proporción de la concordancia observada (Po) / Proporción de la concordancia esperada (Pe)

Fuente: Lemus D. Métodos rápidos para la detección de resistencia en *M. tuberculosis*. (tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"). Habana, Cuba. 2007