

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNOSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



EVALUACIÓN DEL ENSAYO MODS (Susceptibilidad a fármacos
mediante observación microscópica) PARA EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE EN PACIENTES
CON TUBERCULOSIS PULMONAR

TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EN SALUD - MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

POSTULANTE: VLADIMIR DANIEL FERAUDY TORRICO

TUTORES: ANETH VASQUEZ MICHEL *M.Sc.*

RAQUEL CALDERON MORALES *M.Sc.*

LA PAZ-BOLIVIA

2016

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNOSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



EVALUACIÓN DEL ENSAYO MODS (Susceptibilidad a fármacos
mediante observación microscópica) PARA EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE EN PACIENTES
CON TUBERCULOSIS PULMONAR

TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EN SALUD - MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

POSTULANTE: VLADIMIR DANIEL FERAUDY TORRICO

TUTORES: ANETH VASQUEZ MICHEL *M.Sc.*

RAQUEL CALDERON MORALES *M.Sc.*

LA PAZ-BOLIVIA

2016

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD

Tesis de posgrado:

EVALUACIÓN DEL ENSAYO MODS (Susceptibilidad a fármacos mediante
observación microscópica) PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS
MULTIDROGORRESISTENTE EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS
PULMONAR

Postulante: Vladimir Daniel Feraudy Torrico

Para optar el grado académico de: Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en
Salud – Mención Microbiología

Nota numeral:.....

Nota literal:.....

Ha sido

Asesora: Aneth Vasquez Michel *M.Sc.*

Asesora: Raquel Calderón Morales *M.Sc.*

Tribunal: Ximena Taborga Manrique *M.Sc.*

Tribunal: David Gutiérrez *M.Sc.*

DEDICATORIA

Dedicada principalmente a Dios quien ilumina mi camino, me da fuerzas y deseo de superación. A mis padres, Vladimir y Luth, mis grandes ejemplos a seguir quienes me aconsejan, me alientan y empujan a seguir adelante en cada momento de mi vida.

A toda mi familia quienes con su amor incondicional me apoyan constantemente en el camino que elijo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Dra. Aneth Vasquez, por guiarme en el desarrollo de este trabajo, por su tiempo, consejos y dedicación.

Al personal de cada centro de salud perteneciente a la red nacional de control de la tuberculosis, por su ayuda en la recolección de muestras e información.

A la Dra. Mirtha Camacho Jefa del Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, por su colaboración en la recolección de datos obtenidos mediante el método de las proporciones.

A la Universidad de Barcelona, por el financiamiento del proyecto A1/-036316/11 TB - UBA -UMSA.

RESUMEN

La tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR), causada por *Mycobacterium tuberculosis* simultáneamente resistente a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF), está propagándose mundialmente y convirtiéndose en un problema de salud muy serio. La aparición de la tuberculosis multidrogorresistente reactivó la necesidad de contar con métodos rápidos para detectar resistencia a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF).

El ensayo MODS (Susceptibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica) es una técnica de cultivo líquido que utiliza un microscopio de luz invertida para detectar el crecimiento de *M. tuberculosis* en medio de cultivo contenido en placas con pozos. El crecimiento característico en cordón se utiliza para su identificación. Las muestras de esputo previamente digeridas, decontaminadas, y concentradas son inoculadas en medio con y sin droga. Esto permite el acceso directo a las pruebas de susceptibilidad de INH y RIF para la detección simultánea de TB-MDR.

Por tal motivo, el presente estudio pretende evaluar el método MODS para la detección de resistencia a INH y RIF en muestras de esputo de pacientes sintomáticos respiratorios recolectadas en los diferentes Centros de Salud del departamento de La Paz incluidas en la Red del Programa Nacional de Control de la Tuberculosis.

En este estudio se incluyeron 100 muestras de esputo, se excluyeron 4 muestras por contaminación y el análisis estadístico se realizó en 96 muestras que fueron procesadas por el ensayo MODS y el método de las proporciones como "gold estándar". Según los perfiles de susceptibilidad por el método de las proporciones, se observó una relación estrecha entre la resistencia a RIF y MDR. Comparando los resultados de ambos métodos se obtuvo una fuerza de concordancia casi perfecta, altos porcentajes de sensibilidad y especificidad tanto para la susceptibilidad a INH con 84.6% y 99.6% respectivamente, como para RIF y MDR con un 100% de especificidad y sensibilidad para la detección de cepas MDR.

El tiempo promedio transcurrido para la disponibilidad de los resultados de susceptibilidad mediante el método MODS fue de 12 días, tiempo corto comparado al tiempo promedio transcurrido para la disponibilidad de los resultados de susceptibilidad mediante el método de las proporciones que es de 142 días.

En conclusión el ensayo MODS puede ser considerado como un método válido y aplicable, que permite la detección de casos de tuberculosis multidrogorresistente de manera equivalente a los métodos microbiológicos de referencia, disminuyendo el costo y sobre todo el tiempo del diagnóstico, que es clave para el tratamiento del paciente y cortar la cadena de transmisión de la enfermedad.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, MODS, TB-MDR, método de las proporciones, Isoniacida, Rifampicina.

ABSTRACT

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), *Mycobacterium tuberculosis* simultaneously resistant to isoniazid (INH) and rifampin (RIF), is spreading worldwide and becoming a serious health problem. The emergence of drug-resistant TB revived the need for rapid methods to detect resistance to isoniazid (INH) and rifampin (RIF).

MODS (Drug Susceptibility by Microscopic Observation) is a liquid culture technique using an inverted light microscope to detect the growth of *M. tuberculosis* in culture medium containing wells plates. The characteristic growth cord is used for identification. The previously digested sputum samples, decontaminated, and concentrated are inoculated in medium with and without drug. This allows direct access to the susceptibility testing of INH and RIF for the simultaneous detection of MDR-TB.

Therefore, this study aims to assess the MODS method for detecting resistance to INH and RIF in sputum samples collected from patients with respiratory symptoms in different health centers of the department of La Paz included in the National Network Control Program Tuberculosis.

In this study 100 sputum samples were included, 4 samples were excluded by pollution and statistical analysis was performed on 96 samples that were processed by the MODS assay and the method of proportions as the gold standard. According susceptibility profiles by the method of proportions a close relationship between resistance to RIF and MDR was observed. Comparing the results of both methods force keeping almost perfect, high rates of sensitivity and specificity for both susceptibility to INH with 84.6% and 99.6% respectively, and for RIF and MDR was obtained with 100% specificity and sensitivity for detection of MDR strains.

The average time for the availability of the results of susceptibility by MODS method was 12 days short compared to the average time for the availability of the results of susceptibility by proportion method that is 142 days.

In conclusion the MODS assay can be considered a valid and applicable method that allows detection of cases of *M. tuberculosis* multidrug-resistant equivalently microbiological reference methods, reducing the cost and especially the time of diagnosis, which is key to cut the chain of transmission of the disease.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, MODS, MDR-TB, proportion method, Isoniazid, Rifampicin.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|------|---|----|
| 1. | INTRODUCCION | 1 |
| 2. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 2 |
| 3. | JUSTIFICACION | 3 |
| 4. | HIPOTESIS | 5 |
| 5. | OBJETIVOS | 5 |
| a. | OBJETIVO GENERAL | 5 |
| b. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 5 |
| 6. | ANTECEDENTES | 6 |
| 7. | MARCO TEORICO | 9 |
| a. | ASPECTOS GENERALES DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 9 |
| b. | ESTRUCTURA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 9 |
| c. | PATOGENIA E INMUNIDAD | 11 |
| i. | TRANSMISION | 11 |
| ii. | MECANISMO DE INFECCION | 12 |
| iii. | TUBERCULOSIS PRIMARIA O PRIMO-INFECCION | 14 |
| iv. | TUBERCULOSIS POSTPRIMARIA O REACTIVACION DE LA TB | 15 |
| d. | ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE | 16 |
| i. | A NIVEL MUNDIAL | 16 |
| ii. | A NIVEL DE LAS AMERICAS | 16 |
| iii. | A NIVEL DE BOLIVIA | 17 |
| e. | TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS | 18 |
| i. | TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ACTIVA | 19 |
| ii. | DEFINICION DE DOT | 20 |
| iii. | SEGUIMIENTO DE LA TERAPIA | 21 |
| f. | FARMACOS ANTITUBERCULOSOS Y SU INTERACCION | 22 |
| i. | ESTRUCTURA, FARMACOCINETICA Y TOXICIDAD DE LAS PRINCIPALES DROGAS ANTITUBERCULOSAS | 23 |
| 1. | ISONIAZIDA | 23 |
| 2. | RIFAMPICINA | 25 |
| 3. | PIRAZINAMIDA | 26 |

| | | |
|------|--|----|
| 4. | ETAMBUTOL | 27 |
| 5. | ESTREPTOMICINA | 29 |
| ii. | MECANISMOS DE ACCION Y RESISTENCIA DE LAS PRINCIPALES DROGAS ANTITUBERCULOSAS | 31 |
| 1. | ISONIAZIDA | 31 |
| 2. | RIFAMPICINA | 32 |
| 3. | PIRAZINAMIDA | 33 |
| 4. | ETAMBUTOL | 33 |
| 5. | ESTREPTOMICINA | 34 |
| g. | DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA | 35 |
| i. | DIAGNÓSTICO CLÍNICO | 35 |
| ii. | DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO | 36 |
| 1. | BACILOSCOPIA | 36 |
| 2. | CULTIVO | 37 |
| h. | DETECCION DE LA RESISTENCIA A DROGAS | 38 |
| i. | METODOS PARA LA DETECCION DE LA RESISTENCIA A LOS FARMACOS | 39 |
| ii. | METODOS FENOTIPICOS CONVENCIONALES | 39 |
| 1. | METODO DE LAS PROPORCIONES | 40 |
| 2. | METODO DE LA RELACION DE RESISTENCIA | 42 |
| 3. | METODO DE CONCENTRACION ABSOLUTA | 42 |
| iii. | METODOS GENOTÍPICOS | 43 |
| iv. | NUEVOS METODOS FENOTIPICOS | 43 |
| 1. | EL ENSAYO DE NITRATO REDUCTASA | 43 |
| 2. | EL ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS EN CALDO MEDIANTE OBSERVACION MICROSCOPICA (MODS) | 45 |
| 8. | DISEÑO METODOLOGICO | 46 |
| a. | TIPO O DISEÑO DEL ESTUDIO | 46 |
| b. | SITIO O CONTEXTO DEL ESTUDIO | 46 |
| c. | UNIVERSO Y POBLACIÓN O MUESTRA | 46 |
| i. | CRITERIOS DE INCLUSION | 47 |
| ii. | CRITERIOS DE EXCLUSION | 47 |
| iii. | CRITERIOS DE ELIMINACION | 47 |

| | | |
|------|---|----|
| d. | TAMAÑO DE MUESTRA | 47 |
| e. | RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN | 48 |
| f. | RECOLECCION DE MUESTRAS | 48 |
| g. | DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS | 49 |
| h. | CULTIVO EN MEDIO SOLIDO Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A FÁRMACOS | 49 |
| i. | MÉTODO MODS | 50 |
| i. | DECONTAMINACION DE LAS MUESTRAS | 50 |
| ii. | PROCEDIMIENTO MODS | 50 |
| iii. | PREPARACION DE CONTROLES POSITIVOS | 50 |
| iv. | PREPACION DE LAS SOLUCIONES ANTIBIOTICAS | 51 |
| v. | LECTURA DIARIA DE PLACAS | 51 |
| j. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 51 |
| k. | ASPECTOS BIOÉTICOS | 52 |
| 9. | RESULTADOS | 52 |
| a. | PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD OBTENIDOS MEDIANTE EL METODO DE LAS PROPORCIONES | 53 |
| b. | CONCORDANCIA DEL MODS CON EL METODO DE LAS PROPORCIONES | 55 |
| c. | VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE AL METODO DE LAS PROPORCIONES | 58 |
| d. | TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA OBTENCION DE LOS RESULTADOS POR AMBOS METODOS | 61 |
| e. | PORCENTAJE DE MUESTRAS EN RELACION A LOS DIAS DE LA OBTENCION DE RESULTADOS | 61 |
| 10. | DISCUSION | 63 |
| 11. | CONCLUSION | 76 |
| 12. | BIBLIOGRAFIA | 77 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Número de casos estimados y reportados de TB-MDR en ciudades de las Américas 2012. | 17 |
| Tabla 2. Clasificación de los fármacos antituberculosos. | 22 |
| Tabla 3. Drogas de primera línea y mecanismos moleculares de resistencia en <i>M. tuberculosis</i> | 34 |
| Tabla 4. Concentraciones críticas de los principales fármacos en el método de las proporciones | 41 |
| Tabla 5. Perfiles de susceptibilidad obtenidos mediante el método de las proporciones..... | 53 |
| Tabla 6. Comparación de los resultados de las PSF a INH y RIF mediante MODS y el método de las proporciones..... | 54 |
| Tabla 7. Resultados del rendimiento de las PSF de MODS en referencia al método de las proporciones para la detección de <i>M. tuberculosis</i> drogorresistente | 55 |
| Tabla 8. Tabla de contingencia entre los resultados de sensibilidad y resistencia a INH entre MODS y el método de las proporciones | 56 |
| Tabla 9. Tabla de contingencia entre los resultados de sensibilidad y resistencia a RIF entre MODS y el método de las proporciones | 56 |
| Tabla 10. Concordancia entre MODS y el método de las proporciones respecto a la Isoniacida y Rifampicina..... | 57 |
| Tabla 11. Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del ensayo MODS ante el método de las proporciones respecto a la INH y RIF | 58 |

INDICE DE GRAFICAS

| | |
|---|----|
| G r á f i c a 1. Curva ROC del ensayo M O D S para Isoniacida | 60 |
| G r á f i c a 2. Curva ROC del ensayo M O D S para Rifampicina y M D R | 60 |
| G r á f i c a 3. Relación entre el porcentaje de resultados obtenidos con respecto al día de reporte de resultados, mediante el ensayo M O D S | 62 |
| G r á f i c a 4. Relación entre el porcentaje de resultados obtenidos con respecto al día de reporte de resultados, mediante el método de las proporciones | 62 |
| G r á f i c a 5. Relación entre el porcentaje de resultados obtenidos con respecto al día de reporte de resultados, comparando el ensayo M O D S con el método de las proporciones | 63 |

INDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|--|----|
| Ilustración 1. Estructura de la pared celular micobacteriana | 11 |
| Ilustración 2. Ensayo de Nitrato Reductasa mostrando una cepa susceptible y otra resistente | 44 |

1. INTRODUCCION

La presencia mundial de la tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) ha sido documentada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), con estimaciones de casi medio millón de casos al año, y 150.000 muertes. (World Health Organization, 2010) La TB-MDR es causada por el *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) que es resistente al menos a los dos fármacos antituberculosos más potentes isoniazida (INH) y rifampicina (RIF). Además de los altos costos, la larga duración del tratamiento y la falta de ensayos controlados aleatorios de regímenes óptimos, una barrera importante para el control de la TB-MDR es la falta de capacidad de diagnóstico de laboratorio en los entornos con alta carga de TB. (Gandhi, y otros, 2010)

Se están tomando diferentes acciones para ampliar las capacidades tanto para el cultivo de *M. tuberculosis* como para las pruebas de sensibilidad a fármacos (PSF) (Gandhi, y otros, 2010). Según la OMS, de 27 países con alta carga de TB-MDR, sólo 22 países entre ellos Bolivia, contaban con un laboratorio de referencia nacional en el año 2008. De 572 laboratorios que realizan PSF, sólo la mitad participó en el control de calidad externo (World Health Organization, 2010).

Bolivia es un país con alta carga de TB con tasa creciente de co-infección VIH-TB; Se calcula que un 7% de los pacientes con TB recién diagnosticados en 2010 estaban infectados por el VIH. Desde 2004 a 2010 se diagnosticaron 257 pacientes con TB-MDR, de los cuales 102 iniciaron tratamiento y el resto no fueron captados por los centros de salud. Estos casos de TB-MDR son los más urgentemente necesitados de diagnóstico, ya que tienen la mayor morbilidad y mortalidad aún con diagnóstico eficaz. (Organización Panamericana de la Salud, 2012)

La PSF clásica para *M. tuberculosis* en medios sólidos requiere de 12-15 semanas ya que la muestra de esputo primero debe ser cultivada y luego sembrada en un medio que contiene el fármaco. En el año 2007, la OMS recomendó el uso de medios líquidos para el cultivo y las PSF en países de bajos y medianos ingresos como una

alternativa para aumentar la escala del diagnóstico y tratamiento de la TB y TB-MDR. (World Health Organization, 2007; World Health Organization, 2008)

El Ensayo de Susceptibilidad a Drogas mediante Observación Microscópica (MODS), es una PSF rápida y directa que ha sido evaluado para el cribado de la TB-MDR a partir de muestras clínicas. El método se basa en la observación de cordones característicos de *M. tuberculosis* cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio de luz invertida. El método, ha sido diseñado para la detección del crecimiento de *M. tuberculosis* y la susceptibilidad a INH y RIF. La simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad, la especificidad y el bajo costo son las mayores ventajas para su uso en países en vías de desarrollo.

El método puede ser aplicado en los laboratorios que realicen la validación, como un método rápido de tamizaje para la detección de resistencia a INH y RIF en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar que aún no hayan iniciado tratamiento antituberculosis, pacientes nunca tratados, recaídas o abandonos recuperados con frotis positivo o negativo. (Asencios Solis, Acurio Usca, & Quispe Torres, 2012)

El presente trabajo evaluó la exactitud del ensayo MODS en el diagnóstico precoz de la TB-MDR en casos sospechosos y nuevos de tuberculosis pulmonar.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, las tasas de TB fármaco resistente han aumentado. Durante los años 2009, 2010 y 2011 se diagnosticaron un total de 86, 106 y 62 casos de TB-MDR en Bolivia respectivamente, observando un marcado incremento en comparación a los casos diagnosticados en años anteriores 2006, 2007 y 2008 con un total de 34, 16 y 25 casos de TB-MDR respectivamente.

La falta de detección de la resistencia a antibióticos genera un retraso en el diagnóstico, aumento de la morbi-mortalidad y diseminación de la enfermedad por cepas

resistentes. Se estima que el tratamiento de la enfermedad por TB-MDR multiplica el costo hasta por 500 veces el tratamiento. Se establece que un enfermo tiene tuberculosis fármaco resistente solo mediante la confirmación de la resistencia en cultivo y pruebas de fármaco-sensibilidad in Vitro. La falta de detección del perfil de resistencias del *M. tuberculosis* potencia este hecho y multiplica el costo del tratamiento. (Minion, Leung, Menzies, & Pai, 2010) (World Health Organization, 2011)

El cultivo de *M. tuberculosis* en medios sólidos, seguido por una prueba de susceptibilidad por el método de proporciones en medio Löwenstein-Jensen (LJ), toma alrededor de 90 días. Este tiempo es ampliado por trámites administrativos por lo que este proceso no permite un tratamiento oportuno y se impide el proceso de interrupción de la cadena de transmisión.

Por otro lado, existen en la actualidad sistemas automatizados o técnicas moleculares disponibles, más rápidos, pero lamentablemente más costosas, por lo tanto no viables en entornos de recursos económicos limitados como Bolivia.

La OMS recomienda trabajar en el desarrollo y posterior aplicación de pruebas de diagnóstico rápido especialmente para la determinación de la susceptibilidad a RIF e INH ya que estos constituyen el eje del tratamiento antituberculosis, en regiones con alto riesgo de TB-MDR, sobre todo en las regiones con alta carga de VIH.

3. JUSTIFICACION

El diagnóstico de la tuberculosis resistente es eminentemente de laboratorio. Un diagnóstico definitivo de TB-MDR actualmente, requiere que el *M. tuberculosis* sea aislado en un cultivo (sólido o líquido), identificado y sometido a una prueba de susceptibilidad indirecta.

Es crucial que un paciente con TB-MDR cuente con un diagnóstico rápido y apropiado ya que estos pacientes en comparación de los casos de TB sensible requieren de un régimen terapéutico más prolongado hasta 18-24 meses, con fármacos

antituberculosos de segunda línea que son menos eficaces y con efectos secundarios más graves. La curación de TB-MDR solo se consigue en el 50-60% de los casos. (Martín, 2009)

Es importante una pronta identificación laboratorial de TB-MDR para dar al paciente el esquema de tratamiento más apropiado, minimizar los efectos secundarios de los medicamentos y minimizar o romper la cadena de transmisión. La ampliación de la capacidad para diagnosticar la TB y especialmente la TB-MDR es prioridad mundial para el control de esta infección.

Debido a que existen muchos factores que ocasionan un gran retraso en la obtención de los resultados, generando una pérdida tanto de tiempo como de recursos, surge la necesidad de incorporar métodos accesibles tanto técnicamente como de bajo costo para el diagnóstico preciso y rápido de la TB-MDR.

El ensayo MODS nos proporciona una alternativa para el diagnóstico de TB-MDR, ya que el mismo constituye una prueba accesible, que nos permite diagnosticar, en un tiempo promedio de diez a trece días, la presencia del bacilo tuberculoso en muestras de esputo y simultáneamente determinar la susceptibilidad a RIF e INH en cultivo líquido convencional adecuado.

En los países con alta prevalencia de Tuberculosis con baciloscopia negativa, la alta sensibilidad de MODS y la disponibilidad rápida y simultánea de los resultados de sensibilidad a los medicamentos pueden ayudar a aumentar la proporción de pacientes confirmados microbiológicamente y con ello reducir el número de casos tratados empíricamente.

Al obtener resultados positivos en este estudio, este método podría ser incorporado como uno de los métodos diagnósticos de rutina para la detección de *M. tuberculosis* drogo resistente y así favorecer a los pacientes que presentan esta enfermedad, otorgándoles el tratamiento adecuado en un menor tiempo de espera

diagnóstica, minimizando de esta manera la transmisión de TB y TB-MDR, teniendo como resultado la disminución de la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país.

Por las consideraciones anteriores, una de las premisas a nivel mundial es buscar nuevos procedimientos que nos ayuden a acortar el tiempo de obtención de un diagnóstico y pruebas de susceptibilidad certeras al alcance de los pacientes.

4. HIPOTESIS

El ensayo MODS es un método válido y aplicable, que permite la detección de casos de *M. tuberculosis* multidrogorresistente de manera equivalente a los métodos microbiológicos de referencia, disminuyendo el tiempo y el costo del diagnóstico.

5. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el Método de Susceptibilidad a Fármacos por Observación Microscópica (MODS) para la detección de tuberculosis multidrogorresistente en pacientes con tuberculosis pulmonar en la ciudad de La Paz.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar las características de los perfiles de resistencia antibióticas de *M. tuberculosis* obtenidos por métodos diagnósticos de referencia.
- Evaluar la concordancia del método MODS con el método de las proporciones.
- Estimar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del MODS frente al método de las proporciones.
- *Comparar el tiempo transcurrido hasta la obtención de los resultados por ambos métodos.*

6. ANTECEDENTES

M. tuberculosis se ha visto involucrado en la expresión de resistencias a diferentes fármacos, su resistencia es conocida desde los inicios del tratamiento con estreptomina (SM) que fue el primer fármaco utilizado en la década de 1940s. Este fenómeno fue el que originó la necesidad de diseñar regímenes combinados de drogas. (Iseman, 2007)

En 1952 fue sintetizada la INH a partir de la nicotinamida y de la tiosemicarbazona, mostrando ser más potente que la SM. También se demostró la actividad sinérgica esterilizante de pirazinamida (PZA), y más tarde se introdujo la RIF a partir de la rifamicina B aislada del *Streptomyces mediterranei*, para mejorar los regímenes de tratamiento. (Cardoso Leão & Portaels, 2007)

A medida que se buscaban los mejores regímenes para el tratamiento de la TB se reportaba un creciente número de casos resistentes a drogas, principalmente como resultado de esquemas de tratamiento inadecuados y la no adherencia a los esquemas de tratamiento. (Gandhi, y otros, 2010)

A partir de 1985 aparecen en algunos países, incluso desarrollados, pacientes que no responden de forma adecuada al tratamiento convencional de la TB y brotes epidémicos en Nueva York, Miami y Buenos Aires en los primeros años de la década de 1990s. Se descubre que estos pacientes presentan formas de la enfermedad debidas a cepas de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes, definiéndolas como aquellas cepas que son resistentes tanto a INH como a RIF. La curación de la TB-MDR solo se consigue en el 50% -60% de los casos. (Centers for Disease Control and Prevention, 2006)

En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara a la TB como una emergencia de salud pública mundial para frenar la extensión de la TB-MDR. Se ponen en marcha medidas de control de esta enfermedad por parte de diversos organismos nacionales e internacionales, uno de ellos Socios en Salud, sucursal Perú en 1996, en convenio con el Programa Nacional de Control de la TB del Ministerio de Salud, inició

el tratamiento integral de los casos de TB-MDR en Lima-Perú bajo el modelo basado en la comunidad que posteriormente fue adoptado y aplicado por otros países. La incidencia de TB disminuye en todo el mundo desde el año 2003, sin embargo aparecen formas de tuberculosis altamente resistentes. (World Health Organization, 2007)

En el año 2006, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, la OMS y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades del Pulmón (IUATLD) publican los resultados obtenidos por 25 laboratorios de referencia distribuidos por todo el mundo que indican que el 20% de *M. tuberculosis* aislados eran MDR y que el 2% eran también resistentes a fármacos de segunda línea: estas formas se denominaron TB de resistencia expandida o extremadamente resistentes (XDR-TB). (World Health Organization, 2008)

La detección de la resistencia a los fármacos se ha realizado en el pasado por los llamados "métodos convencionales", basados en la detección del crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de antibióticos: el método de las proporciones, el método de la relación de resistencia y el método de la concentración absoluta.

El Método de las Proporciones o Método Proporcional de Canetti fue descrito en 1963 por Canetti et al., sigue siendo en la actualidad la prueba de referencia (método de oro) recomendado por la OMS para monitorear la quimioterapia de la TB. (Canetti, Rist, & Grosset, 1963)

Los métodos de cultivo en medio líquido semiautomatizados fueron desarrollados en los 1980's, dentro de éstos, el BACTEC TB-460, método radiométrico de alta confiabilidad, fue considerado durante dos décadas como el estándar de oro en los países de altos ingresos. (Deland & Wagner, 1969)

En la última década tratando de mejorar el diagnóstico de TB drogo resistente se han desarrollado diferentes métodos de susceptibilidad a drogas para *M. tuberculosis*, que ya se han probado en aislamientos de cultivo y directamente en muestras de esputo

clínicas: Métodos basados en fagos, métodos colorimétricos, método de agar en capa fina y el ensayo de la susceptibilidad a las drogas en caldo mediante observación microscópica (MODS).

El método MODS fue desarrollado y estandarizado en Perú, se creó en la Universidad Peruana Cayetano Heredia por Luz Caviedes y Robert Gilman (Caviedes, y otros, 2000). **Desde su creación, se han publicado en el mundo estudios acerca de su desempeño y aplicabilidad; en un estudio realizado por David Moore y col.** se utilizaron dos métodos de referencia para evaluar MODS. En comparación con el método de las proporciones y el sistema MBacT, MODS obtuvo una concordancia del 100% para RIF, 97% para INH, 99% para INH y RIF (MDR), 95% para etambutol (EMB) y 92% para SM. El tiempo medio de los resultados de las pruebas de susceptibilidad fue de 68 días, 22 días y 7 días, respectivamente. (David A.J. Moore, 2006)

En el meta-análisis de Minion y col. de nueve estudios sobre la eficacia de MODS, en el diagnóstico de resistencia a RIF, se estimó una sensibilidad agrupada de 98,0% y una especificidad agrupada de 99,4%, y con la INH fue 97,7% de sensibilidad y 95,8% en especificidad, asimismo estimó el tiempo promedio de respuesta en 9,9 días. (Minion, Leung, Menzies, & Pai, 2010)

El meta-análisis de pruebas directas y combinadas (directa e indirecta) de MODS realizado por la OMS indica que el método es 98% sensible y 99% específico para la detección de la resistencia a RIF y 91% sensible para la resistencia a INH (World Health Organization, 2010). La capacidad de realizar las PSF en MODS, directamente en muestras de esputo en un corto plazo de tiempo y el bajo costo de los reactivos son ventajas de esta técnica (Coronel, Roper, & Caviedes, 2010).

Actualmente, se observa su creciente utilización a nivel mundial, debido a que es una técnica innovadora y llama la atención el hecho de que está libre de patente, por lo que su reproducción es libre, además cuenta con el respaldo de la OMS, que ha

designado a MODS el estándar de oro para el diagnóstico rápido de TB/TB MDR (World Health Organization, 2010). Algunos países del hemisferio ya la tienen dentro de sus guías clínicas y otros van generando la evidencia necesaria para ello.

7. MARCO TEORICO

a. ASPECTOS GENERALES DE *Mycobacterium tuberculosis*

El *M. tuberculosis* pertenece a la familia Mycobacteriaceae, junto con *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum* constituyen el “complejo *M. tuberculosis*”. Este patógeno bacteriano fue descrito por primera vez en 1882 por Robert Koch, razón por la cual también se conoce como “bacilo de Koch”. Tiene forma bacilar, de longitud de 2 a 4 micras y diámetro 0,2 a 0,5 micras. Su pared celular está compuesta por lípidos (más del 60,0%), glicolípidos y proteínas. La presencia de ácidos micólicos son típicos de este bacilo ácido alcohol resistente (BAAR). Estos gérmenes son no esporulados, no móviles, aerobios estrictos y de replicación binaria cada 18 a 20 horas. (Koneman & Winn, 2008)

El *M. tuberculosis* es causante de la tuberculosis que es una enfermedad infecciosa, transmisible, curable, usualmente crónica, de presentación clínica variable, y con amplia distribución mundial. Puede comprometer prácticamente todos los órganos, pero los pulmones son generalmente los más comúnmente afectados. (Torres & Varón, 2010)

b. ESTRUCTURA DE *Mycobacterium tuberculosis*

Las bacterias se clasifican en el género *Mycobacterium* en función de: 1) su capacidad de acidoresistencia; 2) la presencia de ácidos micólicos con 60 a 90 átomos de carbono que se escinden por pirrólisis en esteres metilo de ácidos grasos de C22 y C26, y 3) un elevado contenido (61% -71%) de guanina + citosina (G+C) en su ácido desoxirribonucleico (ADN). (Murray & Rosenthal, 2007)

Las micobacterias poseen una pared celular compleja y rica en lípidos (figura 1). Esta pared celular es la responsable de muchas de las propiedades características de las

bacterias, como su acidorresistencia, crecimiento lento, resistencia a detergentes, resistencia a los antibióticos antibacterianos frecuentes, antigenicidad y formación de agregados. (Murray & Rosenthal, 2007)

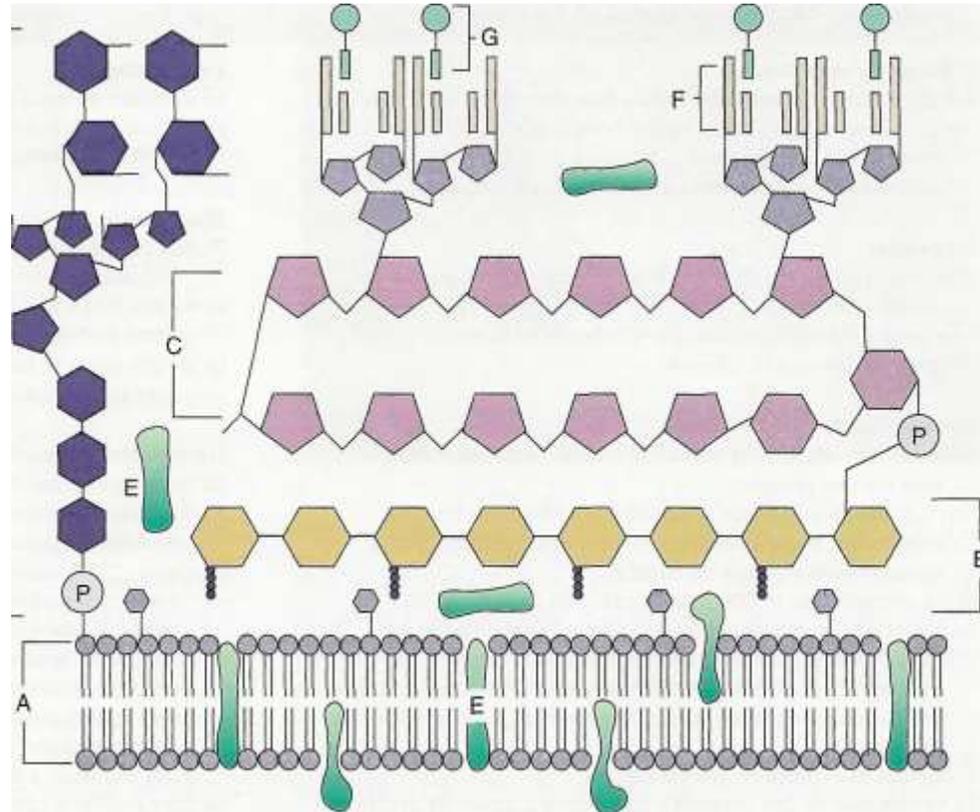
Las micobacterias cuentan con abundantes lípidos; incluyen ácidos micólicos, ceras y fosfátidos. En la célula, los lípidos en gran medida están unidos a proteínas y polisacáridos. El dipéptidomuramilo (procedente de peptidoglicanos) forma complejos con el ácido micólico y puede generar la formación de granulomas; los fosfolípidos inducen necrosis caseosa. (Brooks, Carroll, & Butel, 2011)

En la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomano (LAM), que presenta una relación funcional con los liposacáridos O antigénicos presentes en otras bacterias. La capa de peptidoglucano forma el esqueleto básico al que se unen los arabinogalactanos, unos polisacáridos ramificados formados por D-arabinosa y D-galactosa. El residuo terminal de D-arabinosa se esterifica para dar lugar a ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular a los que se anclan moléculas de glucolípidos de superficie.

A lo largo de las capas de la pared celular se intercalan proteínas transportadoras y porinas, las cuales constituyen el 15% del peso de la misma. Las proteínas constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente frente a la infección. Se usan preparaciones parcialmente purificadas de estos derivados proteicos (derivados proteicos purificados o PPD) como pruebas de reactividad cutánea para determinar la exposición a *M. tuberculosis*. (Murray & Rosenthal, 2007)

Ilustración

Estructura de la pared celular micobacteriana



Consta de (A) membrana plásmica, (B) peptidoglucano, (C) arabinogalactano, (D) lipoarabinomano con cabeza de manosa, (E) proteínas asociadas a la membrana plasmática y a la pared celular, (F) ácidos micólicos y (G) moléculas de glucolípidos de superficie asociados a los ácidos micólicos.

Fuente: Modificado de Karakousis et al: *Cell Microbiol* 6:105-116, 2004.

c. PATOGENIA E INMUNIDAD

i. TRANSMISIÓN

El contagio se produce habitualmente por vía aerógena a partir de pacientes bacilíferos con lesiones pulmonares «abiertas», es decir, conectadas con el exterior por un bronquio de drenaje. Al toser se generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas

(gotas de Flügge), en cuyo interior se encierran uno o dos bacilos; al evaporarse queda tan sólo el núcleo de bacilos que permanece flotando en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire pudiendo ser aspirado por otras personas. (Murillo Godínez, 2009)

Las partículas de tamaño superior a 10 μm quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y 5 μm) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenan la primoinfección (Lozano, 2002).

En la mayoría de las ocasiones, los escasos bacilos que llegan hasta los alvéolos son fagocitados y destruidos por los macrófagos. Sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas (aproximadamente, el 10%) llegará a desarrollar la enfermedad; la mitad de ellos tempranamente, a los pocos meses de la infección, mientras que el otro 5% necesitará de un largo intervalo (a veces, de varias décadas) para que se produzca la reactivación endógena de lesiones aparentemente curadas que albergan en su interior micobacterias en condiciones metabólicas adversas pero potencialmente viables.

ii. MECANISMO DE INFECCION

La patogenicidad de *M. tuberculosis* está en relación con su capacidad para escapar a la destrucción inducida por los macrófagos y para provocar hipersensibilidad de tipo retardado.

El *M. tuberculosis* reside en fagosomas, que no son acidificados en lisosomas. La inhibición de la acidificación se ha asociado a la ureasa secretada por las micobacterias y a la captación de éstas por receptores del complemento o de manosa más que por receptores Fc.

Estudios clásicos en animales sugieren que hay cuatro etapas de la infección. La primera fase es el contacto con los macrófagos en la que algunos de los organismos son destruidos y algunos son capaces de continuar multiplicándose. Las micobacterias

patógenas son capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos, ya que inhiben la acidificación del fagolisosoma estabilizando a un pH de 6.2 a 6.3 y se retienen dentro de la vía de reciclado endosomal, dado el acceso del organismo a los nutrientes esenciales tales como el hierro. (Kaufmann, 2001)

El factor cordón se cree que desempeña un papel importante en la prevención de la acidificación, es un glucolípidido de superficie que hace que este agente crezca in vitro en cordones con configuración de serpentina, las cepas virulentas presentan el factor cordón en su superficie. Los fagosomas tampoco logran fusionarse con los lisosomas, aunque sí adquieren algunas proteínas lisosomales. (Russell, 2001)

Durante la segunda etapa, los monocitos de sangre y otras células inmunes son atraídos al sitio de la infección. Los monocitos se diferencian en macrófagos, que son incapaces de matar a las micobacterias. Está a sólo un par de semanas más tarde, la tercera etapa, cuando la afluencia de células T antígeno específicas, controla la multiplicación de micobacterias. Esto sucede debido a la secreción de IFN- γ que activa los macrófagos y libera el bloque de maduración fagosomal (Russell, 2001). La manera eficiente de matar a las micobacterias depende del óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintasa y por otros radicales relacionados (Kaufmann, 2001). Este proceso se ve favorecido por la acidificación de la vacuola que contiene micobacterias, la cual ahora puede darse debido a que el bloque está ahora levantado. La última etapa de infección puede permanecer latente o, alternativamente, si las células inmunes no logran controlar la multiplicación de las bacterias se produce difusión y se desarrolla la enfermedad activa. (Gillespie & Hawkey, 2006)

Los macrófagos infectados producen grandes cantidades de mediadores proinflamatorios tales como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β e IL-12. Una gama de citocinas antiinflamatorias se producen incluyendo IL-4, el TGF- β e IL-10. El equilibrio entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias define la expresión de la tuberculosis. La liberación incontrolada de citoquinas es responsable de muchos de los

síntomas y signos de la tuberculosis, como la fiebre y la emaciación. (Gillespie & Hawkey, 2006)

iii. TUBERCULOSIS PRIMARIA O PRIMO-INFECCION

La fase primaria de infección se inicia con la inhalación de las micobacterias y termina con la aparición de una respuesta inmunitaria de células T, que induce una hipersensibilidad frente a los microorganismos (Cotran, Kumar, & Collins, 2000).

Los bacilos incluidos en los núcleos de las gotitas de Pflügge superan los mecanismos de defensa bronco-pulmonares, llegan a los alvéolos y se depositan generalmente en los lóbulos inferiores, en general en aquellos ubicados inmediatamente por debajo de la pleura. Esta invasión desencadena una reacción inespecífica de tipo exudativo; los macrófagos eliminan un determinado número de micobacterias y si la invasión no ha sido masiva, muchas veces no se pasa esta fase local. Por otro lado, la progresión a su vez puede hacerse hacia la necrosis del tejido invadido, o, más comúnmente, a la formación de una lesión histológica producida por activación de células T, estimulación y transformación de un gran número de macrófagos en células que están altamente especializadas en la lucha contra las micobacterias (células epiteliales y gigantes de Langhans) que se sitúan concéntricamente para rodear e intentar destruir a los bacilos intrusos dando lugar al característico *granuloma tuberculoso: tubérculo* que da nombre a la enfermedad. Este granuloma tiene a su vez dos posibilidades evolutivas: la cicatrización o la progresión. (Lozano, 2002)

La cicatrización puede hacerse por formación de tejido fibroso a la cual puede agregarse la calcificación. Durante esta primera etapa, la multiplicación de los bacilos tuberculosos se efectúa sin mayor interferencia de los mecanismos defensivos del organismo del huésped. Es así que desde el foco inicial sub-pleural son transportados por los vasos linfáticos pulmonares a los ganglios ubicados en el hilio pulmonar y el mediastino; estos ganglios se agrandan produciendo adenomegalias hiliares y mediastinales. (Rodríguez De Marco, 2004)

El foco inicial que comprende una lesión parenquimatosa sub-pleural, ganglios linfáticos aumentados de tamaño (adenitis hiliares y/o mediastinales) y necrosis caseosa que han servido de drenaje al foco parenquimatoso, conforman el llamado *complejo primario o complejo de Ghon*. (Cotran, Kumar, & Collins, 2000)

Al alcanzar los ganglios regionales, es habitual que se produzcan pequeñas diseminaciones bacilares por vía hematogena a los segmentos apicales pulmonares, riñones, hígado y huesos, que por lo general suelen controlarse localmente (Lozano, 2002).

La evolución y el destino de esta primoinfección son variables pero en la mayoría de los casos los pacientes no presentan síntomas y las lesiones evolucionan hacia la fibrosis y calcificación (Cotran, Kumar, & Collins, 2000).

El 5% de los individuos infectados por TB tienen inmunocompromiso y la enfermedad activa se desarrolla clínicamente un año después de la infección, lo que se denomina como infección progresiva primaria (Juárez Beltrán, Zaragoza Velasco, & Criales Cortés, 2009).

iv. TUBERCULOSIS POSTPRIMARIA O REACTIVACION DE LA TB

La tuberculosis posprimaria, también denominada secundaria o tuberculosis de tipo adulto, es la forma clinicorradiográfica más frecuente, aunque en general el individuo no tiene constancia de la primoinfección previa por haber sido ésta asintomática o poco aparente.

En algunos casos, sobre todo en los países con alta prevalencia de tuberculosis, la tuberculosis posprimaria se debe a una reinfección exógena pese al relativo grado de inmunidad del sujeto infectado. No obstante, lo más común es la reinfección endógena por micobacterias latentes capaces de resistir ocultas en el interior de algunas células, o en pequeños focos caseosos en condiciones metabólicas adversas en un continuo

equilibrio con las defensas orgánicas, que se rompe tras muchos años por alteraciones, transitorias o persistentes, de la inmunidad.

La TB primaria se autolimita, mientras que la reactivación es progresiva y se caracteriza por la presencia caseosa y cavitación en 20 a 45% de los pacientes, lo que resulta en diseminación hematógena de la enfermedad por todo el organismo, y a las vías respiratorias liberando micobacterias infecciosas en aerosoles. (Juárez Beltrán, Zaragoza Velasco, & Criales Cortés, 2009)

d. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE

i. A NIVEL MUNDIAL

En el reporte de la resistencia global a fármacos antituberculosos de la OMS en el 2012 se estimó 450.000 casos de TB-MDR, de los cuales el número estimado de muertes es de 170.000 y se estima 310.000 casos de TB-MDR entre los casos de tuberculosis pulmonar notificados. (World Health Organization, 2014)

ii. A NIVEL DE LAS AMERICAS

De acuerdo a estimaciones de la OMS, en la Región de las Américas hubo 7.000 casos de TB-MDR en 2012, es decir 2.2% del total de casos de todo el mundo. 90% de los casos estimados y notificados se encontraban en 12 países de precedencia. 2.967 casos fueron notificados, menos que el año 2011 debido a dificultades en la vigilancia y/o el reporte. 98 casos de TB-XDR fueron notificados en 11 países con laboratorios que desarrollan PSF. Las PSF están incrementándose en su desempeño pero para el 2012 está todavía lejos de las metas de desempeño en 100% de los casos con retratamiento y 20% en los casos nuevos.

Según estimaciones acerca del tratamiento de TB-MDR, el 92% de los casos comenzaron tratamiento con fármacos de segunda línea. Más del 92% de los casos estaban en 12 países de precedencia. La tasa de éxito en el tratamiento se ha incrementado debido a la reducción de los casos no evaluados.

T a b l a

Número de casos estimados y reportados de TB-MDR en ciudades de las Américas 2012.

| Nº | COUNTRY | estimated 2012 | reported 2012 | % * |
|----|--------------------|----------------|---------------|-----|
| 1 | PERU | 2200 | 1225 | 56 |
| 2 | BRAZIL | 1700 | 684 | 40 |
| 3 | MEXICO | 480 | 114 | 24 |
| 4 | HAITI | 390 | 81 | 21 |
| 5 | ECUADOR | 380 | 223 | 59 |
| 6 | ARGENTINA | 340 | 63 | 19 |
| 7 | DOMINICAN REPUBLIC | 330 | 92 | 28 |
| 8 | COLOMBIA | 310 | 105 | 34 |
| 9 | BOLIVIA | 150 | 117 | 78 |
| 10 | GUATEMALA | 140 | 69 | 49 |
| 11 | VENEZUELA | 100 | 21 | 21 |
| 12 | HONDURAS | 71 | 6 | 8 |

(*)% de casos diagnosticados sobre el total de casos estimados

Fuente: TB Regional Report, 2013

iii. A NIVEL DE BOLIVIA

En base al diagnóstico desarrollado en el laboratorio de referencia de Tuberculosis (INLASA) durante las gestiones 2012, 2013 y 2014 se diagnosticaron en Bolivia un total de 72, 52 y 62 casos de TB-MDR respectivamente.

De los 62 casos de TB-MDR en el año 2014 el mayor número de casos (48 casos) diagnosticados se concentran en dos departamentos: Santa Cruz y La Paz con 40 (64%), y 8 (13%) casos respectivamente.

e. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

La historia de la tuberculosis (TB) cambió dramáticamente después de la introducción de agentes antimicobacterianos. El tratamiento antituberculoso se inició en 1944, cuando la estreptomina (SM) y el ácido paraaminosalicílico (PAS) fueron descubiertos. En 1950, se realizó el primer ensayo que comparó la eficacia de SM y de PAS tanto monoterapia como combinados. El estudio demostró que la terapia combinada fue más eficaz y resultó en el primer tratamiento antituberculoso a múltiples fármacos, que consistía en un transcurso largo de ambos fármacos. En 1952, un tercer fármaco, la isoniazida (INH), fue añadido a la combinación anterior, lo que mejoró la eficacia del tratamiento, pero que todavía tenía que ser administrado durante 18-24 meses. En 1960, el etambutol (EMB) sustituyó al PAS, y el transcurso del tratamiento se redujo a 18 meses. En los años 70, con la introducción de la rifampicina (RIF) en la combinación, el tratamiento se redujo a tan sólo nueve meses. Finalmente, en 1980, la pirazinamida (PZA) se introdujo en el tratamiento antituberculoso, el cual pudo reducirse aún más hasta sólo seis meses.

Dos características biológicas explican por qué la terapia farmacológica combinada es más eficaz en la curación de la tuberculosis que la monoterapia. Una de ellas es que el tratamiento de la tuberculosis activa con un solo tipo de fármaco resulta en la selección de bacilos resistentes a los medicamentos y el fracaso para eliminar la enfermedad. La otra es que las diferentes poblaciones de bacilos tuberculosos - cada una de ellas con un patrón distinto de susceptibilidad a fármacos antituberculosos - puede coexistir en un paciente con tuberculosis. (Shamputa, y otros, 2006)

Poco después de la introducción de los primeros fármacos antituberculosos, los bacilos resistentes a los medicamentos comenzaron a surgir, pero el lanzamiento tanto de la terapia combinada como de los medicamentos nuevos y más eficaces parecía ser suficiente para controlar la enfermedad. De hecho, se pensaba que la tuberculosis podría ser erradicada a finales del siglo XX. Sin embargo, la tuberculosis inesperadamente volvió a surgir en los años 80, y en los años siguientes se produjo un aumento importante en la incidencia de las cepas poli-, multi-, y extensivamente drogo resistente.

Desde 1970, ningún nuevo fármaco ha sido descubierto para el tratamiento antituberculoso, el cual parece insuficiente para hacer frente a la enfermedad. Afortunadamente, los esfuerzos de investigación han logrado el desarrollo de una amplia gama de nuevas moléculas con actividad antituberculosa prometedora.

En nuestros días, debido a la reaparición de la tuberculosis en todo el mundo y el aumento de la incidencia de cepas multidrogorresistentes (MDR) y extensivamente resistentes (XDR) de *M. tuberculosis*, se están investigando nuevos agentes antimicobacterianos, nuevos sistemas de liberación de fármacos y nuevos regímenes de tratamiento.

i. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ACTIVA

La tuberculosis es una enfermedad curable si el tratamiento se realiza durante el tiempo necesario con la toma de los fármacos en número adecuado, de forma regular y a las dosis correctas. (Centro Cochrane Iberoamericano, 2009)

Con los esquemas de terapia actualmente disponibles se obtienen tasas de curación superiores al 95% con tasas de recaída a dos años inferiores al 5%. Los esquemas del Programa Nacional de Prevención y Control de Tuberculosis son los mejores disponibles para la mayoría de los casos y deben seguirse para facilitar el funcionamiento operativo del Programa.

La evidencia científica fundamenta el tratamiento de la tuberculosis en bases bacteriológicas, farmacológicas y operacionales, debiendo ser:

1. **Asociado**, utilizando mínimo cuatro medicamentos antituberculosos para evitar la selección de resistencias. En casos de fracaso o mala respuesta, los nuevos esquemas deben tener un mínimo de 3 fármacos nuevos.
2. **Prolongado**, durante un mínimo de 6 meses para lograr matar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento metabólico. Se debe asegurar que el

paciente reciba al menos el 80% de las dosis. En la segunda fase se recomienda suministrar los fármacos tres veces por semana por 4 meses (18 semanas).

3. **Supervisado**, para garantizar la toma y cumplimiento del tratamiento hasta la finalización y su condición de curado (estrategia “DOTS”: Directly Observed Therapy Strategy o “TAES”: Tratamiento Antituberculoso Estrictamente Observado).
4. **Controlado**, con baciloscopías mensuales a partir del 2º mes de tratamiento.
5. **En dosis kilogramo peso**, para evitar sobre o sub dosificación de los medicamentos antituberculosos. (Tapia Sainz, Vidal Aranda, & Zaiduni Salazar, 2009) (Torres & Varón, 2010)

El tratamiento oportuno tiene como objetivos:

- Curar al paciente con tuberculosis.
- Prevenir las muertes por tuberculosis o sus secuelas graves.
- Prevenir la selección de bacilos resistentes a las drogas antituberculosas (mediante DOT).
- Cortar la cadena de transmisión de la enfermedad. (Tapia Sainz, Vidal Aranda, & Zaiduni Salazar, 2009)

ii. DEFINICION DE DOT

El tratamiento directamente observado (DOT) consiste en la observación del paciente al deglutir el medicamento, por un trabajador de salud. El supervisor de la terapia de la salud puede ser un profesional de la salud o un miembro de la comunidad supervisado. La OMS recomienda que todos los casos con esputos positivos deben recibir tratamiento DOT. No se considera como DOT si un miembro de la familia sin entrenamiento administra el medicamento al paciente. Es muy importante que cualquiera que supervise el DOT este muy bien entrenado. La estrategia DOT es promovida activamente por la OMS como un esfuerzo en controlar la incidencia global de Tuberculosis. La estrategia puede producir un superior cumplimiento de la terapia en comparación con la terapia no supervisada y disminuir la recurrencia y la resistencia. (Salazar Quirós & Sáenz Campos, 2005)

El tratamiento farmacológico de la Tuberculosis sensible a las drogas considera dos fases, ambas supervisadas:

- a. PRIMERA FASE de inducción o bactericida: de administración diaria, sirve para reducir rápidamente la población bacilar de crecimiento y multiplicación rápida (lográndose destruir al 90% de la población bacteriana en los primeros 10 días) y para prevenir la resistencia y con ello el fracaso al tratamiento.
- b. SEGUNDA FASE de mantenimiento o esterilizante: de administración intermitente. En este momento la población bacteriana se multiplica 1 vez por semana o menos frecuentemente, de manera que ya no requiere tratamiento diario. Incluye menor número de medicamentos, suficientes para conseguir la eliminación de los bacilos persistentes y evitar así las recaídas.

iii. SEGUIMIENTO DE LA TERAPIA

Se debe hacer con baciloscopia cada dos meses y se debe contar con baciloscopia negativa al sexto mes para declarar una curación. Se deben solicitar pruebas de susceptibilidad a fármacos antituberculosos de primera línea si la baciloscopia es positiva al segundo mes. Usando el esquema convencional de 6 meses se habla de curación cuando existe baciloscopia de esputo negativa al cuarto y al sexto mes.

Cuando la baciloscopia es positiva al segundo mes se deben solicitar pruebas de susceptibilidad y ajustar la terapia una vez se cuente con el resultado. Si la baciloscopia es positiva al cuarto mes se deben solicitar pruebas de susceptibilidad y modificar la terapia con las sospechas de TB-MDR (esquema categoría IV). Cuando la baciloscopia persiste positiva al sexto mes se trata de un fracaso. Se habla de recaída cuando un paciente que cumplió criterios de curación bacteriológica en cualquier esquema reaparece sintomático y con bacteriología positiva (recaída o reactivación). Este paciente requiere pruebas de sensibilidad pero puede iniciar un esquema convencional mientras

se tienen los resultados de estas pruebas. (Organización Panamericana de la Salud , 2010)

f. FARMACOS ANTITUBERCULOSOS Y SU INTERACCION

Los fármacos para el tratamiento de la tuberculosis suelen clasificarse como fármacos de primera y segunda línea. Tradicionalmente, hay cinco fármacos de primera línea: INH, RIF, PZA, EMB, y SM. La segunda línea de fármacos incluye los aminoglucósidos kanamicina y amikacina, el polipéptido capreomicina, PAS, cicloserina, las etionamida tioamidas y protionamida y varias fluoroquinolonas tales como la moxifloxacina, levofloxacina y gatifloxacina.

Algunos reportes, incluyen a SM como fármaco de segunda línea, ya que su uso ha disminuido en los últimos años, debido a las altas tasas de resistencia, y también, debido a que otros fármacos más efectivos se han incorporado en el tratamiento contra la tuberculosis. Del mismo modo, los nuevos fármacos como la rifapentina derivados de la rifamicina y rifabutina pueden considerarse entre los fármacos de primera línea.

Tabla

Clasificación de los fármacos antituberculosos.

| Grupo | Descripción | Droga | Abreviatura |
|-------|---|--|-------------------------|
| 1 | Orales de primera línea | Isoniazida Rifampicina Etambutol Pirazinamida Rifabutina | H R E Z Rfb |
| 2 | Inyectables (Agentes inyectables AI) | Amikacina Kanamicina Capreomicina Estreptomina | Amk Km Cm S |
| 3 | Fluoroquinolonas (FQ) | Levofloxacina Moxifloxacina Ofloxacina | Lfx Mfx Ofx |
| 4 | Orales de segunda línea (Bacteriostáticos) | Etionamida Protionamida Cicloserina Acido p-aminosalicilico | Eto Pto Cs PAS |
| 5 | Drogas de eficacia incierta | Clofazimine | Cfz |

| | | | |
|--|--|-------------------------|---------|
| | | Linezolid | Lzd |
| | | Amoxicilina/clavulanato | Amx/Clv |
| | | Tioacetazona | Thz |
| | | Clarithromicina | Clr |
| | | Imipenem | Ipm |

Fuente: Organization World Health, 2003

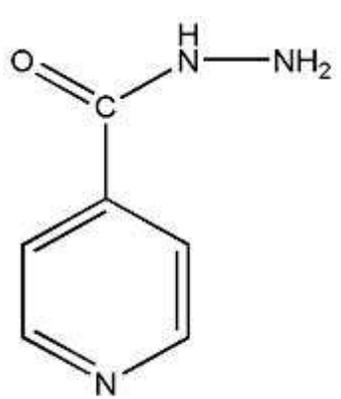
La mayoría de los programas de tuberculosis emplea cinco fármacos básicos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina.

i. ESTRUCTURA, FARMACOCINETICA Y TOXICIDAD DE LAS PRINCIPALES DROGAS ANTITUBERCULOSAS

1. ISONIAZIDA

a. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES GENERALES

La INH es una droga sintética introducida en la terapéutica a partir de 1952, tiene efecto bactericida contra los bacilos metabólicamente activos y bacteriostáticos contra los bacilos en reposo. La INH es activa contra *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. kansasii*. Las cepas de *M. tuberculosis* susceptibles muestran concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de entre 0,02 y 0,2 mg/L.

| | |
|--|--|
| <p>Isoniazida (hidrazida del ácido isonicotínico; C₈H₇N₃O, MW : 137.1) es una de las drogas más potentes contra la TB. Es un polvo blanco cristalino soluble en agua. Las soluciones pueden ser esterilizadas mediante autoclave.</p> |  |
|--|--|

b. FARMACOCINETICA

INH se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal (aunque la absorción se reduce por comida) o después de las inyecciones intramusculares. Las concentraciones máximas de 3 - 8 mg/L aparecen en la sangre entre 1-2 horas después de la ingestión de 300 mg de INH. Se difunde en todos los tejidos corporales, incluyendo líquido cefalorraquídeo. La vida media en plasma varía de 1 a 6 horas. La INH se metaboliza en el hígado y en el intestino delgado: primero, un N-acetiltransferasa acetila a INH produciendo acetilisoniazida; este producto se hidroliza a ácido isonicotínico y monoacetil-hidrazida, y el último compuesto se acetila a diacetilhidrazina. Ninguno de estos metabolitos derivado de INH tiene actividad antituberculosa. Dentro de la población, hay dos grupos de pacientes, en función de si INH se acetila lenta o rápidamente, una característica que está determinada genéticamente. Las concentraciones de plasma de INH son más bajas en acetiladores rápidos que en acetiladores lentos, aunque esta diferencia no afecta a la eficacia del tratamiento. INH y sus metabolitos se excretan en la orina.

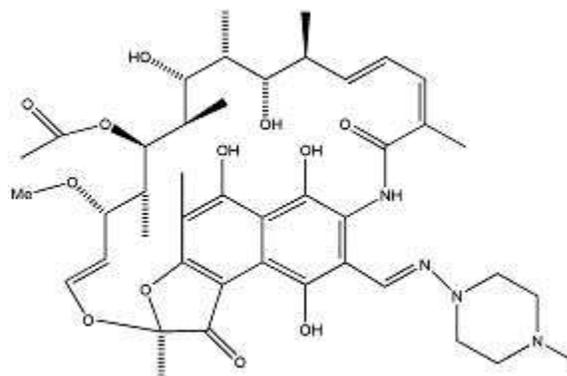
c. TOXICIDAD

INH es bien tolerado a las dosis recomendadas, aunque acetiladores lentos pueden acumular concentraciones más altas de INH y luego tener un mayor riesgo de desarrollar efectos adversos. Entre el 10 % y el 20 % de los pacientes pueden desarrollar aumentos transitorios de las enzimas hepáticas al principio del tratamiento, y en ocasiones desarrollar daño hepático. En estos casos, la administración de INH debe ser detenido. La función hepática debe monitorearse antes y durante el tratamiento, especialmente en aquellos pacientes con antecedentes de disfunción hepática o renal, en los que las dosis de INH deben reducirse para evitar daños mayores. Son menos frecuentes los efectos adversos neurológicos o hematológicos y reacciones de hipersensibilidad. Se recomienda una dosis diaria de 10 mg de clorhidrato de piridoxina para reducir la neurotoxicidad y para tratar los efectos adversos causados. (Palomino, Cardoso Leao, & Ritacco, 2007)

2. RIFAMPICINA

a. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES GENERALES

La rifampicina, a menudo llamada rifampin, (5,6,9,17,19,21-hexahidroxi-23-metoxi-2,4,12,16,18,20,22-heptametil-8-[N-(4-metil-1-piperazinil)formimidol]-2,7-(epoxypentadeca[1,11,13]trienimino)-nafto[2,1-b]furan-1,11(2H)-dione-21-etilo; C₄₃H₅₈N₄O₁₂; MW 822.9) es un polvo cristalino de color marrón rojizo poco soluble en agua; se disuelve en alcohol metílico y se puede almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.



La RIF es un derivado semisintético de la rifamicina B, es una droga de amplio espectro que fue introducida en el año 1967. Es bactericida contra micobacterias en división y también tiene alguna actividad contra los bacilos que no se dividen. Las cepas de *M. tuberculosis* son normalmente susceptibles a 0,1-2 mg/L. La introducción de RIF, permite la reducción de la duración de los tratamientos antituberculosos estándar de un año a nueve meses. Esto fue más tarde reducido a seis meses después de la incorporación de PZA.

b. FARMACOCINETICA

Este fármaco se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal (la comida puede retardar o disminuir la absorción de RIF); dentro de 2 a 4 horas después de la ingestión de una dosis de 600 mg, las concentraciones plasmáticas máximas pueden llegar a 7-10 mg/L. También se puede administrar por vía intravenosa. En la sangre, RIF se une a

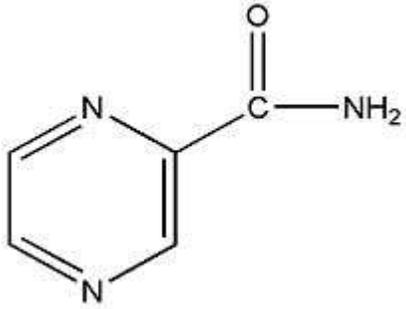
proteínas plasmáticas y se distribuye en los tejidos y fluidos corporales, incluyendo líquido cefalorraquídeo y la leche materna, y atraviesa la placenta. La vida media de RIF varía de 2 a 5 horas. La RIF se metaboliza en el hígado y se excreta en la bilis, heces y orina.

c. TOXICIDAD

La RIF es bien tolerada, aunque pueden presentarse efectos adversos durante la terapia intermitente o al reiniciar un tratamiento interrumpido. Los efectos adversos incluyen diversas alteraciones en el tracto gastrointestinal, la piel, los riñones y el sistema nervioso. También puede producir trombocitopenia. La RIF causará una coloración rojo - naranja de fluidos corporales tales como orina, lágrimas, saliva, sudor, esputo y heces; podría dar lugar a la coloración de lentes de contacto blandas. Ya que se metaboliza en el hígado, las funciones hepáticas deben ser controladas antes de iniciar el tratamiento y un seguimiento regular hasta que termine el tratamiento. Se debe tener especial cuidado en pacientes con enfermedades hepáticas preexistentes. Un aumento moderado de la fosfatasa alcalina puede observarse. (Palomino, Cardoso Leao, & Ritacco, 2007)

3. PIRAZINAMIDA

a. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES GENERALES

| | |
|--|---|
| <p>Pirazinamida (amida de ácido pirazinoico, $C_5H_5N_3O$; MW: 123.1) es un polvo blanco cristalino, soluble en agua.</p> |  <p>The image shows the chemical structure of Pirazinamide (PZA). It consists of a six-membered pyrazine ring with nitrogen atoms at the 1 and 3 positions. Attached to the 4-position of the ring is an amide group, represented as -C(=O)-NH₂.</p> |
|--|---|

La PZA es un fármaco bactericida activa solo contra *M. tuberculosis*, que no tiene actividad in vitro frente a otras micobacterias o cualquier otro microorganismo. Las cepas sensibles tienen CIMs de 20 mg/L a pH 5,6. Es activo frente a bacilos persistentes y no en división, incluso en contra de los que residen de forma intracelular, siendo casi

inactiva a pH neutro. La Introducción de la PZA en los regímenes de tratamiento de la tuberculosis permite la reducción de la duración de dichos regímenes a seis meses.

b. FARMACOCINETICA

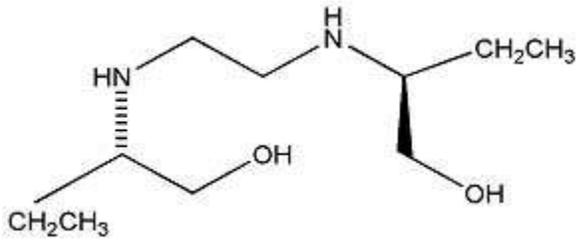
La PZA se administra por vía oral, y se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal. Las concentraciones séricas alcanzan un nivel pico de alrededor de 66 mg/L dos horas después de la administración de una dosis de 3g. Se distribuye en todos los tejidos y fluidos corporales, incluyendo el líquido cefalorraquídeo y la leche materna. La vida media de la PZA es de aproximadamente 9-10 horas. La PZA se hidroliza en el hígado, se convierte en ácido pirazinoico, que es luego hidroxilado y finalmente se excreta en la orina.

c. TOXICIDAD

La PZA es hepatotóxica de una manera dependiente de la dosis. Después de una dosis diaria de 3 g de PZA, el 15 % de los pacientes pueden desarrollar alteraciones del hígado, como ser aumentos transitorios de las enzimas hepáticas, hepatomegalia, esplenomegalia e ictericia. La hepatitis se ha reportado en menos del 3% de los casos. Puede producir hiperuricemia, que conduce a los ataques de gota. Además, está contraindicada en pacientes con daño hepático y es aconsejable realizar pruebas de función hepática antes y periódicamente durante el tratamiento. Tampoco debe administrarse a pacientes que tienen antecedentes de gota o hiperuricemia. (Palomino, Cardoso Leao, & Ritacco, 2007)

4. ETAMBUTOL

a. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES GENERALES

| | |
|--|--|
| <p>Etambutol (N, N' - etilenbis (2 - aminobutan -1-ol) dihidrocloruro; $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$; MW : 277.2) Es un polvo blanco cristalino soluble en agua y alcohol que deben ser almacenado preservado del aire.</p> |  |
|--|--|

| | |
|--|--|
| | |
|--|--|

El EMB es un derivado de la etilendiamina, activo solamente contra micobacterias en división, siendo bacteriostática. Desde que el EMB afecta a la biosíntesis de la pared celular, se ha sugerido que contribuye a aumentar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a otras drogas.

b. FARMACOCINETICA

El EMB se administra por vía oral, ya que se absorbe bien en el tracto gastrointestinal (y no es afectado significativamente por los alimentos), aunque una parte es excretada en las heces. Después de la absorción, se distribuye en la mayoría de los tejidos y se difunde en la leche materna y líquido cefalorraquídeo; también atraviesa la placenta. Después de una dosis de 25 mg/kg de peso corporal se alcanza una concentración máxima de 5 mg/L en suero después de 4 horas. La vida media es de aproximadamente 3 a 4 horas. Solo una fracción de EMB se metaboliza en el hígado; el fármaco inalterado y sus metabolitos se excretan en la orina.

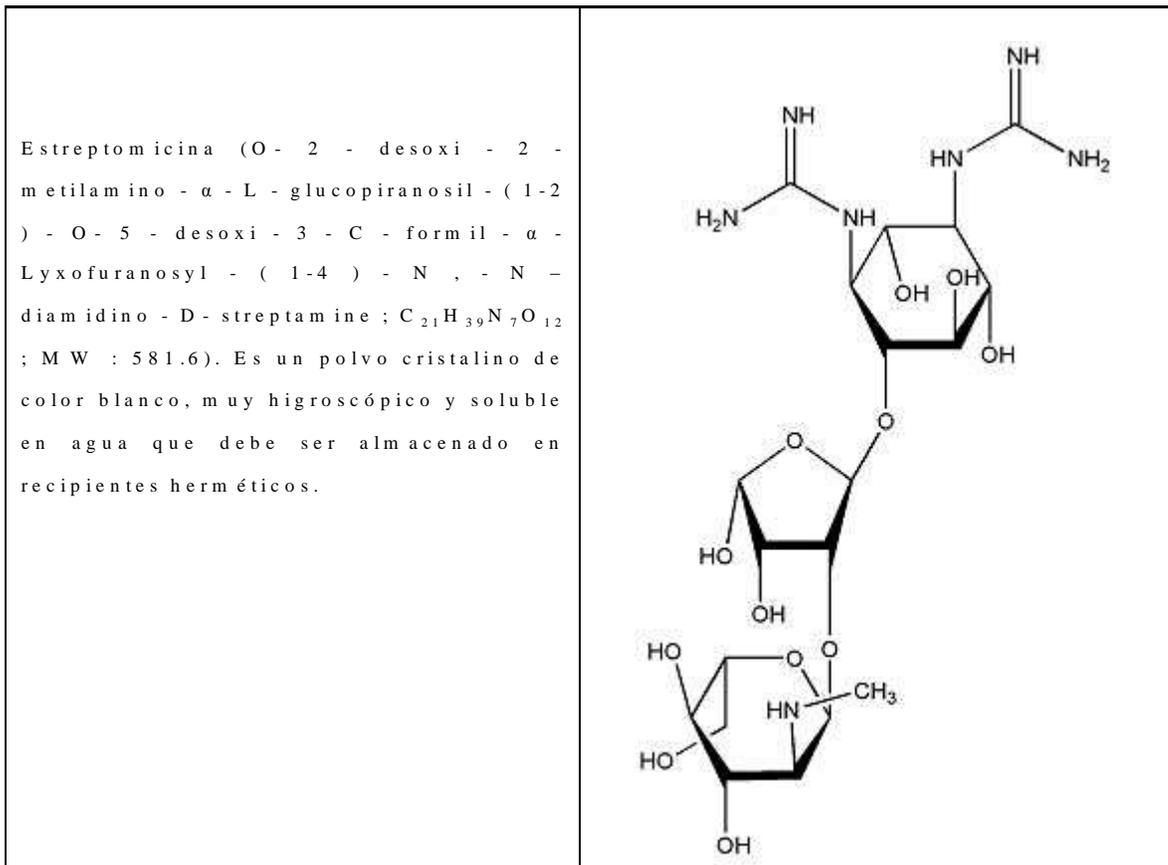
c. TOXICIDAD

El EMB produce la neuritis retrobulbar con una reducción de la agudeza visual, la constricción del campo visual, escotoma central o periférico, y la ceguera de color rojo - verde (Fraunfelder, 2006). Esto puede afectar a uno o ambos ojos. La gravedad de estos efectos depende de la dosis y la duración del tratamiento. En general, la visión normal se recupera un par de semanas después del final del tratamiento, aunque en algunos casos, esta recuperación puede no ocurrir hasta algunos meses después de la finalización del tratamiento. En consecuencia, el EMB está contraindicado en pacientes con neuritis óptica, y se debe utilizar con precaución en pacientes con trastornos visuales. Son recomendables los exámenes ópticos antes y durante el tratamiento. El EMB no se suele administrar a niños menores de seis años de edad debido a la dificultad en el control de la agudeza visual, a menos que se sospeche alta resistencia a INH o RIF.

Otros efectos adversos incluyen una reducción de la excreción de urato (que produce gota), trastornos gastrointestinales y reacciones cutáneas de hipersensibilidad. (Palomino, Cardoso Leao, & Ritacco, 2007)

5. ESTREPTOMICINA

a. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES GENERALES



La SM, un antibiótico producido por algunas cepas de *Streptomyces griseus*, fue el primer fármaco con actividad antituberculosa descubierto. Fue introducida en 1944 para el tratamiento de la TB. La mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* son susceptibles a 1-8 mg/L de estreptomina.

b. FARMACOCINETICA

La SM, como la mayoría de los aminoglucósidos, no se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, y por lo tanto debe ser administrada por inyección intramuscular. Debido a la toxicidad de la SM y la introducción de otros fármacos que pueden ser administrados por vía oral para el tratamiento de la tuberculosis, el uso de SM ha disminuido, descendido al tratamiento de infecciones causadas por cepas resistentes a los fármacos. Dos horas después de una inyección de 1g de SM, los niveles del fármaco en sangre pueden alcanzar hasta 50 mg/L, donde un tercio de la misma circula unida a proteínas plasmáticas. La vida media para la SM es de aproximadamente 2,5 horas.

La SM y otros aminoglucósidos se difunden bien en la mayoría de los fluidos extracelulares, tal vez con la excepción del líquido cefalorraquídeo. Se difunde bastante fácil en la perilinfa del oído interno, causando efectos ototóxicos. Los aminoglucósidos también tienden a acumularse en tejidos específicos del cuerpo, como los riñones. La estreptomycinina no parece ser metabolizado y se excreta sin cambios por la orina.

La concurrencia de otras enfermedades pueden afectar la farmacocinética de SM y esto puede llegar a ser relevante, ya que hay una diferencia relativamente pequeña entre las concentraciones terapéuticas y tóxicas de los aminoglucósidos. Por ejemplo, los pacientes con insuficiencia renal van a tener un aumentado de las concentraciones plasmáticas de SM, mientras que en los pacientes que tienen enfermedades que causan el volumen de líquido extracelular expandido o aclaramiento renal aumentado (como ascitis, cirrosis, insuficiencia cardiaca, la desnutrición o quemaduras), se reducirán las concentraciones de SM.

c. TOXICIDAD

Como la mayoría de los aminoglucósidos, la SM tiene efectos ototóxicos que afectan la función vestibular en lugar de la función auditiva (coclear), que se manifiestan como mareos y vértigo. Es menos nefrotóxica que otros aminoglucósidos, aunque puede producir insuficiencia renal cuando se administra con otros agentes nefrotóxicos. Se recomienda una evaluación regular tanto de la función auditiva y renal. En caso de efectos adversos graves, la SM puede ser eliminada por hemodiálisis. La parestesia,

síntomas neurológicos tales como neuropatías periféricas, neuritis óptica y escotoma, y reacciones de hipersensibilidad de la piel también se han observado después de las inyecciones de SM. (Palomino, Cardoso Leao, & Ritacco, 2007)

ii. MECANISMOS DE ACCIÓN Y RESISTENCIA DE LAS PRINCIPALES DROGAS ANTITUBERCULOSAS

1. ISONIAZIDA

La INH es una pre-droga que requiere para su activación del complejo micobacteriano catalasa-peroxidasa, siendo la susceptibilidad de la INH dependiente de la presencia de esta enzima, codificada por el gen *katG* (Cohen, Sommers, & Murray, 2003).

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. (Zhang, 2005)

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

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 ($NADH/NAD^+$). Estos altos niveles de NADH inhiben

competitivamente la unión de INH-NAD al sitio activo de la enzima InhA (proteína que adiciona el NADH necesario para la elongación de los ácidos grasos y biosíntesis de ácidos micólicos). Además, como NADH es sustrato de las enzimas KatG y AhpC, altos niveles de NADH pueden competitivamente inhibir la peroxidación de la INH por KatG. (Lee, Teo, & Wong, 2001)

Sólo el 10-20% de las cepas resistentes a la INH no presentan alteraciones en los genes *katG* o *inhA*. Se han encontrado otros genes involucrados en la resistencia a esta droga como el *ahpC* (alquilhidroperoxidoreductasa), *kasA* (cetoácidosintasa), *ceoA* (UDP galactopiranosareductasa), *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. (Lee, Teo, & Wong, 2001)

2. RIFAMPICINA

La RIF es altamente efectiva contra *M. tuberculosis* y difunde fácilmente a través de la envoltura celular. 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. (Parsons, Somoskövi, Urbanczik, & Salfinger, 2004)

La RIF ejerce su acción al fijarse a la subunidad β de la enzima ARN polimerasa, codificada por el gen *rpoB*; mutaciones en este gen generan altos niveles de resistencia a la RIF.

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. Los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a la RIF que no contiene 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. (Zhang, 2005)

3. PIRAZINAMIDA

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

El 72-97% de los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a la PZA tiene 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 (Somoskovi, Parsons, & Salfinger, 2001).

Durante el tratamiento la PZA ejerce, junto a la RIF, un efecto esterilizante. Esta droga actúa sobre los bacilos en estado de latencia que persisten en el ambiente ácido de los macrófagos. Los estudios de susceptibilidad *in vitro* con esta droga se han visto limitados debido a que el ambiente ácido que ella necesita para ejercer su efecto bactericida dificulta el crecimiento de *M. tuberculosis*. (Martin, Francoise, & Palomino, 2006)

4. ETAMBUTOL

El EMB bloquea la incorporación de los ácidos micólicos al arabinogalactano o a un paso en la biosíntesis de arabinogalactanos y lipoarabinomano lo que provoca una inhibición de la biosíntesis de la pared micobacteriana. Las alteraciones génicas identificadas hasta ahora se concentran en una región designada como *embCAB*, que incluye genes codificantes para arabinosiltransferasas, enzimas que participan en la síntesis de componentes únicos de la pared celular de micobacterias. Las mutaciones en

la región *emb* se asocian a altos niveles de resistencia y se han identificado en aproximadamente el 65% de los aislados clínicos resistentes a etambutol. (Wade & Zhang, 2004)

5. ESTREPTOMICINA

La SM al igual que otros aminoglucósidos, interfiere en la síntesis de proteínas procarióticas, produce errores de lectura en el código genético como son la inhibición de la iniciación y la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica durante la transcripción del ARN (ácido ribonucleico) mensajero. La proteína S12, una subunidad del ribosoma 30S, es el principal blanco de la SM. (Wade & Zhang, 2004)

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 y el ARNr 16S, respectivamente. Aislamientos con bajos niveles de resistencia a la SM pueden no mostrar mutaciones en estos marcadores y presentar mutaciones en la permeabilidad celular que afecta la incorporación de la SM al interior de la célula. (Parsons, Somoskövi, Urbanczik, & Salfinger, 2004)

Tabla

Drogas de primera línea y mecanismos moleculares de resistencia en *M. tuberculosis*

Drogas de primera línea y mecanismos moleculares de resistencia en *M. tuberculosis*

| Agente antimicrobiano | Mecanismo de acción de la droga | Genes afectados (producto génico) y mecanismo de resistencia | Frecuencia de mutaciones |
|-----------------------|--|--|--------------------------|
| Isoniazida | Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos | <i>katG</i> (catalasa-peroxidasa): mutaciones en este gen impiden la activación de isoniazida <i>inhA</i> (enoil ACP reductasa): mutaciones en <i>inhA</i> inducen sobreexpresión del gen y niveles elevados de la enzima enoil reductasa en cantidades que superan el poder inhibitorio de INH | 50-68% 21-34% |
| Rifampicina | Inhibición de la transcripción de genes por interacción con la ARN polimerasa | <i>rpoB</i> (subunidad b de la ARN polimerasa): mutaciones en este gen impiden la interacción de la rifampicina con la ARN polimerasa | 96-98% |
| Pirazinamida | No dilucidado | <i>pncA</i> (enzima pirazinamidasa): mutaciones <i>pncA</i> determinan una disminución en la producción del ácido pirazinoico, el metabolito activo | 72-97% |
| Estreptomina | Inhibición de la síntesis de proteínas | <i>rpsL</i> (subunidad ribosomal S12) <i>rrs</i> (ARN ribosomal 16S) Mutaciones en estos genes impiden la interacción con estreptomina | 64-67% 8-21% |
| Etambutol | Inhibición de la síntesis de componentes de la pared celular de micobacterias (arabino galactanos) | <i>embCAB</i> (enzimas arabinosiltransferasas): mutaciones en este gen o su sobreexpresión permiten la síntesis continua de arabinogalactanos | 47-65% |

Fuente: Arráiz, Bermúdez, & Urdaneta, 2005

g. DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA

La historia clínica y la radiología son la base para sospechar la tuberculosis, pero nunca deben considerarse confirmatorios del diagnóstico o suficientes para iniciar un tratamiento. Los pilares del diagnóstico son la comprobación bacteriológica de la existencia del *M. tuberculosis* en cualquier material proveniente del sospechoso de tener la enfermedad y/o el hallazgo histológico de las lesiones características (granulomas con necrosis de caseificación).

El diagnóstico tiene dos fases: la búsqueda de sospechosos y el diagnóstico propiamente dicho. Como sospechoso se entiende toda persona con alta probabilidad de tener la enfermedad. Como caso, toda persona con tuberculosis confirmada bacteriológica y/o histopatológicamente. Dentro del grupo de sospechosos, sin duda, el de los sintomáticos respiratorios es el más importante. Son todas las personas que tosen

durante más de 15 días. El criterio de expectoración puede estar ausente, aunque no sea lo común. (Torres & Varón, 2010)

i. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La localización pulmonar de la TB es la más frecuente pero puede observarse en cualquier órgano. El cuadro clínico es de comienzo insidioso y naturaleza crónica. Esto dificulta el diagnóstico precoz. El síndrome de impregnación bacilar está constituido por síntomas generales como astenia, adinamia, hiporexia, pérdida de peso, febrícula vespertina y sudoración nocturna asociada a signo sintomatología respiratoria (tos, expectoración, disnea). En aproximadamente 20 % de los casos los síntomas constitucionales son el único hallazgo de enfermedad. (Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, 2008) (Hoepfner, Marciniuk, & McNab, 1999)

Si bien el paciente puede presentar disnea, dolor torácico, hemoptisis, la tos es por mucho el síntoma pulmonar más frecuente; al inicio puede ser seca y a medida que avanza la enfermedad se transforma en productiva, con expectoración mucosa, mucopurulenta o hemoptoica (Aidar, Ambroggi, Arévalo Jave, & Brian, 2010).

Es importante evaluar con baciloscopía de esputo a todos los pacientes con tos y expectoración de más de 2 semanas de evolución (sintomático respiratorio), especialmente si se asocia a fiebre y pérdida de peso (Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, 2008).

ii. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico microbiológico de enfermedad tuberculosa se establece en tres etapas sucesivas: 1) Demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes mediante baciloscopía, 2) El aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo puro y posterior identificación de especie, 3) En determinados casos, estudio de sensibilidad in vitro a fármacos antituberculosos (MDR-TB y XDR-TB). (Calvo Bonachera & Rosique, 2010)

1. BACILOSCOPIA

A pesar de los múltiples avances efectuados en los últimos años en el diagnóstico de la TB, la baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen continúa siendo la base del diagnóstico y seguimiento de la TB por su sencillez, rapidez, reproducibilidad en todos los ámbitos y bajo coste, y porque detecta los casos contagiosos de la comunidad, lo que constituye la base del diagnóstico y seguimiento de la TB (Camínero Luna, 2003) (Palomino, Cardoso Leão, & Ritacco, Tuberculosis 2007. From basic science to patient care, 2007).

Su principal inconveniente es su moderada sensibilidad de 50 a 60%, señalando que un resultado negativo no descarta la enfermedad (falsos negativos). Sin embargo, su especificidad es muy elevada, superior al 95%, si bien una baciloscopia negativa no descarta la TB, una baciloscopia positiva prácticamente la confirma en más del 95% de los casos y es indicación de iniciar tratamiento (Camínero Luna, 2003) (Palomino, Cardoso Leão, & Ritacco, Tuberculosis 2007. From basic science to patient care, 2007).

Se ha demostrado que debe haber 5.000 a 10.000 BAAR por mL de espécimen para dar una baciloscopia positiva, en contraste, solo es necesario 10 a 100 organismos para dar un cultivo positivo (Yeager, Lacy, Smith, & Lemastre, 1967).

2. CULTIVO

El cultivo tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad del 98%, por lo tanto, un resultado positivo para BAAR es diagnóstico de TB. El cultivo al identificar con certeza *M. tuberculosis*, se convierte en el *gold standard* del diagnóstico de la enfermedad tuberculosa y sirve para los estudios de sensibilidad. En Bolivia, los medios de cultivo más usados son el Lowenstein-Jensen (LJ) y Ogawa Kudoh en medios sólidos, pero ambos tardan de 3 a 6 semanas en detectar crecimiento bacteriano. Otros medios más rápidos, de 1 a 3 semanas, como el radiométrico BACTEC, por su elevado costo en equipo, reactivos y mantenimiento, están fuera de uso rutinario (Morgan M., 1983).

Es obligatorio realizar cultivo en las siguientes situaciones:

- En el sintomático respiratorio con baciloscopía seriada negativa y persistencia de la sospecha de tuberculosis.
- Cuando la baciloscopía de control al finalizar el segundo mes de tratamiento da positiva para realizar pruebas de susceptibilidad.
- En las muestras de esputo inducido o aspirado gástrico.
- Muestras de origen extrapulmonar.
- Caso sospechoso de TB, que sea contacto de un caso de tuberculosis multirresistente.
- En el control de tratamiento de pacientes que han sido diagnosticados por cultivo o de fracasos en retratamiento.
- Para realizar pruebas de susceptibilidad del *M. tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, en pacientes que fracasan, recaen o abandonan el tratamiento (Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia, 2009).

h. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A DROGAS

La fármaco resistencia de la tuberculosis (TB) es una cuestión de gran preocupación para los programas de control de la tuberculosis, desde que no existe cura para algunos casos de TB producidos por cepas multidrogorresistentes (MDR-TB) de *M. tuberculosis*. Existe la preocupación de que estas cepas podrían propagarse por todo el mundo, haciendo hincapié en la necesidad de medidas adicionales de control, como los nuevos métodos de diagnóstico, mejores medicamentos para el tratamiento y una vacuna más eficaz. MDR-TB, que se define como resistencia al menos a rifampicina (RIF) y a isoniazida (INH), es un factor de interés compuesto para el control de la enfermedad, ya que los pacientes portadores de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos tienen que ser introducidos en los regímenes de tratamiento alternativos que implican fármacos de segunda línea que son más costosos, más tóxicos, y menos eficaces.

Por otra parte, el problema de las cepas extensamente resistentes a los medicamentos (XDR) recientemente se ha introducido. Estas cepas, además de ser MDR, se definieron inicialmente como las que tienen resistencia a al menos tres de las seis clases principales de fármacos de segunda línea (aminoglucósidos, polipéptidos,

fluoroquinolonas, tioamidas, cicloserina, y ácido paraaminosalicílico). Recientemente, en una reunión de consulta de la OMS, Grupo de trabajo mundial sobre la TB-XDR, que tuvo lugar en Ginebra, se acordó una definición de caso de laboratorio revisada: "TB-XDR es la tuberculosis que muestra resistencia al menos a rifampicina e isoniazida, que es la definición de la TB-MDR, además de cualquier fluoroquinolona y a por lo menos 1 de los 3 siguientes medicamentos inyectables utilizados en el tratamiento de la TB: capreomicina, kanamicina y amikacina". (Centers for Disease Control and Prevention, 2006)

La TB-XDR constituye ahora una amenaza emergente para el control de la enfermedad y una mayor propagación de la resistencia a los medicamentos, especialmente en pacientes con infección por VIH, como se informó recientemente (Gandhi, y otros, 2010). Por esta razón, la detección rápida de la resistencia a los medicamentos para fármacos antituberculosos de primera y de segunda línea se ha convertido en un componente clave de los programas de control de la tuberculosis.

i. METODOS PARA LA DETECCION DE LA RESISTENCIA A LOS FARMACOS

La detección temprana de la resistencia a los medicamentos constituye una de las prioridades de los programas de control de TB. Permite iniciar el tratamiento adecuado de los pacientes, así como la vigilancia de la resistencia a los medicamentos. La detección de la resistencia a los medicamentos se ha realizado en el pasado por los llamados "métodos convencionales" basados en la detección del crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de antibióticos. Sin embargo, debido a la laboriosidad de algunos de estos métodos, y sobre todo, el período de tiempo largo necesario para obtener resultados, se han propuesto nuevas tecnologías y enfoques en los últimos años. Éstos incluyen tanto métodos fenotípicos como genotípicos. En muchos casos, los métodos genotípicos en particular, han estado dirigidos a la detección de la resistencia a RIF, ya que se considera un buen marcador indirecto de la TB-MDR, especialmente en entornos con una alta prevalencia de TB-MDR. Los métodos genotípicos tienen la ventaja de un tiempo de respuesta más corto, no hay necesidad para el crecimiento del

organismo, la posibilidad de aplicación directa en muestras clínicas, riesgo biológico más bajo, y la viabilidad de la automatización. Sin embargo, no se conocen todos los mecanismos moleculares de la resistencia a los medicamentos.

Los métodos fenotípicos, por otra parte, son, en general, más simples de realizar y pueden estar más cerca de la aplicación de forma rutinaria en los laboratorios clínicos de micobacteriología.

ii. METODOS FENOTÍPICOS CONVENCIONALES

En general, los métodos fenotípicos evalúan la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de antibióticos para distinguir entre cepas sensibles y resistentes. Esto es posible ya que aislados de *M. tuberculosis* de pacientes nunca tratados antes son muy uniformes en su nivel de susceptibilidad, como lo muestran los rangos estrechos de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los principales fármacos antituberculosos (Heifets, 1996).

La definición clásica de una cepa de *M. tuberculosis* resistente a fármacos es que muestra un grado de susceptibilidad significativamente menor que la de una cepa salvaje que nunca ha estado en contacto con el fármaco (Canetti, 1963; Canetti, 1969). Los métodos fenotípicos basados en el cultivo de *M. tuberculosis* en presencia de antibióticos han sido más comúnmente realizados en medios sólidos a base de huevo o de agar, y también se puede realizar como un método directo o indirecto. Para el método directo, los medios que contienen antibióticos y medios control se inoculan con una muestra clínica descontaminada y concentrada, mientras que para el método indirecto se inoculan los medios que contienen antibióticos y control con una suspensión bacteriana de la cepa aislada. Hay tres métodos fenotípicos convencionales del ensayo de sensibilidad a los fármacos a base de medios sólidos: el método de la proporción, el método de la relación de resistencia y el método de concentración absoluta (Canetti, 1963; Canetti, 1969; Kent, 1985). Los métodos más recientes se basan en medios líquidos como el BACTEC radiométrico y los métodos en tubo indicador de crecimiento de micobacterias.

1. METODO DE LAS PROPORCIONES

El método de las proporciones es el método más comúnmente usado en todo el mundo entre los tres métodos mencionados anteriormente. Se permite la determinación precisa de la proporción de mutantes resistentes a un determinado medicamento. En pocas palabras, varias diluciones seriadas 1 en 100 de bacilos se inoculan en medios que contienen drogas y libres de drogas (control). Una de esas diluciones debe producir un número de colonias que es fácil de contar. El número de colonias obtenidas en los medios que contienen fármacos y el control se cuentan y se calcula entonces la proporción de mutantes resistentes. Cuando se realiza en tubos de medio Lowenstein - Jensen, la prueba se lee por primera vez después de 28 días de incubación a 37°C. Si la proporción de bacterias resistentes es superior al 1% para isoniacida, rifampicina y ácido para-aminosalicilico, o el 10% para el resto de las drogas, la cepa se considera resistente, y los resultados son definitivos; de lo contrario, la prueba se lee de nuevo a los 42 días de incubación para evaluar si la cepa es susceptible a un determinado fármaco (Heifets, 2000). Si la prueba se realiza en agar, se utiliza Middlebrook 7H10/11 y el medio se incuba en una atmósfera de CO₂ al 10%. Los resultados se interpretan después de 21 días de incubación, o incluso antes si muestran que la cepa sea resistente (Kent, 1985). Las concentraciones críticas de los principales fármacos utilizados en el método de las proporciones se muestran en la Tabla 4.

Tabla

Concentraciones críticas de los principales fármacos en el método de las proporciones

| Antibiotic | Löwenstein-Jensen | 7H10 agar | 7H11 agar |
|--------------|-------------------|-----------|-----------|
| Isoniazid | 0.2 | 0.2, 1.0 | 0.2, 1.0 |
| Rifampicin | 40.0 | 1.0 | 1.0 |
| Ethambutol | 2.0 | 5.0 | 7.5 |
| Streptomycin | 4.0 | 2.0 | 2.0, 10.0 |
| Pyrazinamide | 100 | - | - |
| PAS | 0.5 | 2.0 | 8.0 |
| Kanamycin | 20.0 | 5.0 | 6.0 |
| Ethionamide | 20.0 | 5.0 | 10.0 |
| Ofloxacin | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Capreomycin | 20.0 | 10.0 | 10.0 |
| Cycloserine | 40.0 | - | - |

Fuente: Adaptado por Kent 1985; WHO/CDC/TB/2001.228; y NCCLS 2000

2. METODO DE LA RELACION DE RESISTENCIA

Este método se basa en la relación de resistencia, que corresponde a la CIM de una cepa de ensayo dividido por el CIM de la cepa de referencia H37Rv sensible a los medicamentos probado al mismo tiempo. Por lo tanto, se compara la resistencia de una cepa desconocida con la de una cepa de laboratorio estándar. Para la realización de la prueba, conjuntos paralelos de tubos que contienen diluciones uno en dos de la droga a prueba se inoculan a continuación con un inóculo estandarizado tanto a la cepa a prueba como la cepa de referencia. La lectura de la prueba se lleva a cabo después de 4 semanas de incubación a 37°C. Tubos que contienen 20 o más colonias son considerados como positivos para el crecimiento y el CIM se define como la concentración más baja de fármaco en presencia del cual el número de colonias es inferior a 20. Un aislado con un valor de la relación de resistencia de 2 o menos se considera susceptible, mientras que

una proporción de resistencia de 8 o más define el aislado como resistente (Kent, 1985; Heifets, 2000).

3. METODO DE CONCENTRACION ABSOLUTA

Este método utiliza un inóculo estándar de la cepa de prueba que se cultiva en un medio que contiene el fármaco dilución 1 en dos y el control libre de drogas. La resistencia de una cepa se expresa en términos de la concentración más baja de un determinado fármaco que inhibe todo o casi todo el crecimiento de la cepa. Las concentraciones críticas incluidas en el medio son similares a los utilizados en el método de las proporciones (ver Tabla 4), pero la concentración de fármaco considerado como "crítico" debe determinarse en cada laboratorio (Heifets, 2000). Para la interpretación de la prueba, la lectura se lleva a cabo después de 4 semanas de incubación a 37 °C, o en 5-6 semanas si no hay suficiente crecimiento. Una cepa se considera que es susceptible si el número de colonias en el medio con fármaco es menos de 20 con un (confluente) crecimiento 3 + o 4 + en el control libre de fármacos.

iii. METODOS GENOTÍPICOS

Los métodos genotípicos para la resistencia a fármacos en la tuberculosis buscan los determinantes genéticos de resistencia en lugar del fenotipo de resistencia, e implican dos pasos básicos: amplificación de ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar las secciones del genoma de *M. tuberculosis* conocido que es alterado por cepas resistentes; y una segunda etapa de evaluación de los productos amplificados para mutaciones específicas que correlacionan con la resistencia a fármacos (García de Viedma, 2003; Palomino, 2005). Entre los métodos genotípicos tenemos: Secuenciación de ADN, técnicas de hibridación en fase sólida, Técnicas de PCR en tiempo real, Microarrays.

iv. NUEVOS METODOS FENOTÍPICOS

La laboriosidad y largo tiempo requerido por los métodos convencionales para dar resultados y, por otro lado, la necesidad de equipos costosos y de personal técnico cualificado para la mayoría de las técnicas moleculares, siguen estimulando la búsqueda

de métodos alternativos y asequibles para la detección de resistencia a los medicamentos en TB.

Los siguientes métodos se consideran métodos nuevos para *M. tuberculosis*, que ya se han probado tanto en aislamientos de cultivo y directamente en muestras de esputo clínicas: Métodos basados en fagos, métodos colorimétricos, método de agar en capa fina, ensayo de la susceptibilidad a las drogas en caldo mediante observación microscópica (MODS).

Se describirán los métodos de nitrato reductasa muy utilizado en nuestro medio como el método MODS que recientemente está siendo evaluado en nuestro medio.

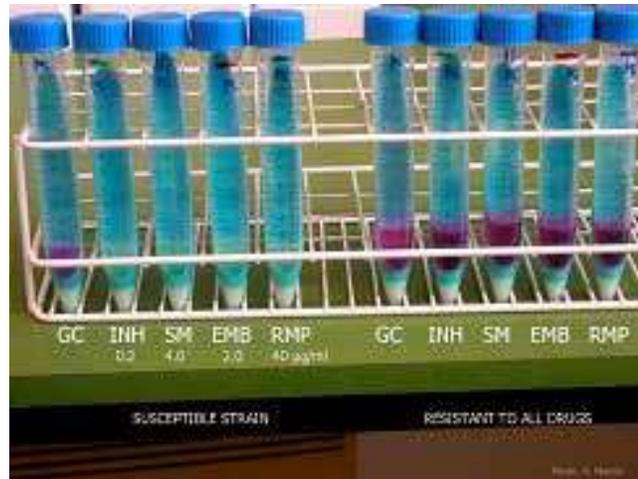
1. EL ENSAYO DE NITRATO REDUCTASA

El ensayo de la nitrato reductasa (ENR) es una técnica bastante simple basado en la capacidad de *M. tuberculosis* de reducir el nitrato a nitrito, que se detecta mediante la adición de un reactivo químico al medio de cultivo. *M. tuberculosis* se cultiva en medio de Lowenstein - Jensen en presencia de un antibiótico y su capacidad para reducir el nitrato se mide después de 10 días de incubación. Las cepas resistentes reducirán el nitrato, que se revela por un color rosa - rojo en el medio, mientras que las cepas susceptibles van a perder esta capacidad, ya que son inhibidas por el antibiótico (Ångeby, 2002). El ensayo se ha evaluado en varios estudios de fármacos de primera línea y la ofloxacina con buenos resultados (Montoro, 2005; Martín, 2005). Tiene la ventaja añadida de utilizar el mismo formato y medio de cultivo como el método de las proporciones estándar. En un reciente estudio multicéntrico que evaluó el desempeño del ENR para la detección de la resistencia a los fármacos de primera línea, la prueba demostró un comportamiento muy positivo para INH, RIF y EMB con una precisión del 96,6% al 98%. Los valores más bajos se obtuvieron para SM (Martín, 2005). Sin embargo, el ENR se implementa fácilmente en lugares con instalaciones de laboratorio limitados. Dos estudios recientes aplicados al ENR directamente en muestras de esputo produjeron resultados variables para la sensibilidad y especificidad; se obtuvieron los mejores resultados para la detección de resistencia a INH y RIF (Musa, 2005; Solís,

2005). Estos dos estudios han demostrado la viabilidad de la aplicación del ENR como una prueba directa de las muestras de esputo que justifican evaluaciones adicionales en las poblaciones objetivo.

Ilustración .

Ensayo de Nitrato Reductasa mostrando una cepa susceptible y otra resistente



Fuente: Palomino, Tuberculosis 2007 de Basic Science to Patient Care, 2007

2. EL ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS EN CALDO MEDIANTE OBSERVACION MICROSCOPICA (MODS)

El ensayo de la susceptibilidad a drogas en caldo mediante observación microscópica se ha descrito para la detección temprana del crecimiento y como método rápido de ensayo de la susceptibilidad a fármacos para *M. tuberculosis*. Se basa en la observación de la formación de cordón que es característica de *M. tuberculosis* y que se visualiza microscópicamente en medio líquido con el uso de un microscopio invertido (Caviedes, 2000). En este estudio, las muestras de esputo de TB-positivos fueron probados para la susceptibilidad a INH y RIF por MODS. Los resultados se compararon con los obtenidos con el método colorimétrico utilizando azul de Alamar. Obtuvieron 89% de concordancia entre los dos métodos con resultados disponibles en un promedio de 9,5 días. El método ha sido propuesto como un método rápido, económico, sensible, y

específico para el ensayo de sensibilidad a los medicamentos de *M. tuberculosis*, apropiado para su uso en países en desarrollo.

En un estudio operativo reciente realizado en el Perú, el rendimiento del ensayo MODS se comparó con un sistema automatizado de cultivo de micobacterias, y el método de proporción en Löwenstein-Jensen para la detección directa de la resistencia a INH, RIF, EMB, y SM en muestras de esputo (Moore, 2006). El tiempo promedio para obtener resultados fue de 7,22, y 68 días para los MODS, cultivo de micobacterias automatizado, y el método de las proporciones respectivamente. La concordancia entre MODS y el patrón de referencia para las pruebas de sensibilidad a los medicamentos fue del 97% para INH, el 100% de RIF, y 99% para INH y RIF combinado (MDR). Los valores más bajos de concordancia fueron obtenidos para EMB (95%) y SM (92%). Llegaron a la conclusión de que un solo cultivo MODS del esputo proporciona una detección más rápida y sensible de la MDR-TB. Una pequeña desventaja del MODS es el requerimiento de un microscopio invertido para observación del crecimiento de las micobacterias.

8. DISEÑO METODOLÓGICO

a. TIPO O DISEÑO DEL ESTUDIO

- Estudio observacional-descriptivo para la comparación de técnicas diagnósticas.
- Test diagnóstico

b. SITIO Y CONTEXTO DEL ESTUDIO

Se obtuvieron muestras de esputo de pacientes sintomáticos respiratorios en el Instituto Nacional del Torax, Hospital Municipal de Caranavi, Hospital Boliviano Holandes, Hospital de Clínicas, Hospital Corea y Hospital Materno Infantil Los Andes. Ubicados en la ciudad de La Paz, ciudad El Alto y en Caranavi, respectivamente. Todos pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis.

Las muestras obtenidas correspondieron a la demanda natural de los referidos laboratorios de diagnóstico de TB. No fue requerida ninguna muestra biológica extra por causa de este estudio, siendo aprovechado el mismo material usado en el diagnóstico de rutina del Programa Nacional de Tuberculosis de Bolivia. No hubo ningún tipo de contacto del equipo investigador con los pacientes, con el fin de obtener información.

Los cultivos de esputo, se realizaron en los laboratorios de los distintos centros de salud, donde además se realizó el test de niacina para la identificación de especie. Las pruebas de sensibilidad y resistencia se realizaron a partir de los cultivos positivos enviados por los Laboratorios anteriormente citados, en el Laboratorio de referencia nacional de tuberculosis (INLASA).

El ensayo MODS se realizó con una alícuota de las mismas muestras en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

c. UNIVERSO Y POBLACIÓN O MUESTRA

La población de estudio estuvo constituida por pacientes sintomáticos respiratorios (individuos con tos por más de 2 semanas), mayores de 14 años que acudieron al Instituto Nacional del Torax, Hospital Municipal de Caranavi, Hospital Boliviano Holandes, Hospital de Clínicas, Hospital Corea y Hospital Materno Infantil Los Andes.

i. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ✓ Muestras de pacientes sintomáticos respiratorios mayores de 14 años, que presenten baciloscopía de esputo positiva o negativa.
- ✓ Pacientes que tengan llenado el formulario de solicitud de cultivo y prueba de sensibilidad a fármacos para Micobacterias del Programa Nacional de Tuberculosis.

ii. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ✓ No contar con el formulario de solicitud de cultivo y prueba de sensibilidad a fármacos para Micobacterias del Programa Nacional de Tuberculosis.
- ✓ Pacientes cuya muestra estuvo guardada más de 48 horas.
- ✓ Pacientes cuya muestra no estuvo conservada en refrigeración.
- ✓ Pacientes cuya muestra presentaba desarrollo disgónico en el cultivo.
- ✓ Pacientes que no contaban con resultados de sensibilidad y resistencia por el método de las proporciones.

iii. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- ✓ Cultivos que se contaminen a lo largo del período de estudio (Método de Proporciones hasta 90 días y ensayo MODS hasta los 16 días).
- ✓ Cultivos identificados como micobacterias atípicas.

d. TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra para la comparación de técnicas fue de 100 muestras con Baciloscopía positiva destinadas a cultivo y pruebas de susceptibilidad a fármacos realizado por el programa de control de la tuberculosis.

e. RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

La información de los pacientes se obtuvo a partir de los formularios patrón (ANEXO 2) llenados por los propios centros de diagnóstico que colaboraron en el trabajo. Un formulario del proyecto fue llenado con los resultados de la baciloscopía, del cultivo y de las PSF (método de Las Proporciones), que fueron realizados por los propios centros de diagnóstico y el laboratorio de referencia de tuberculosis INLASA en el caso de las PSF, según protocolos aprobados por el PNCT.

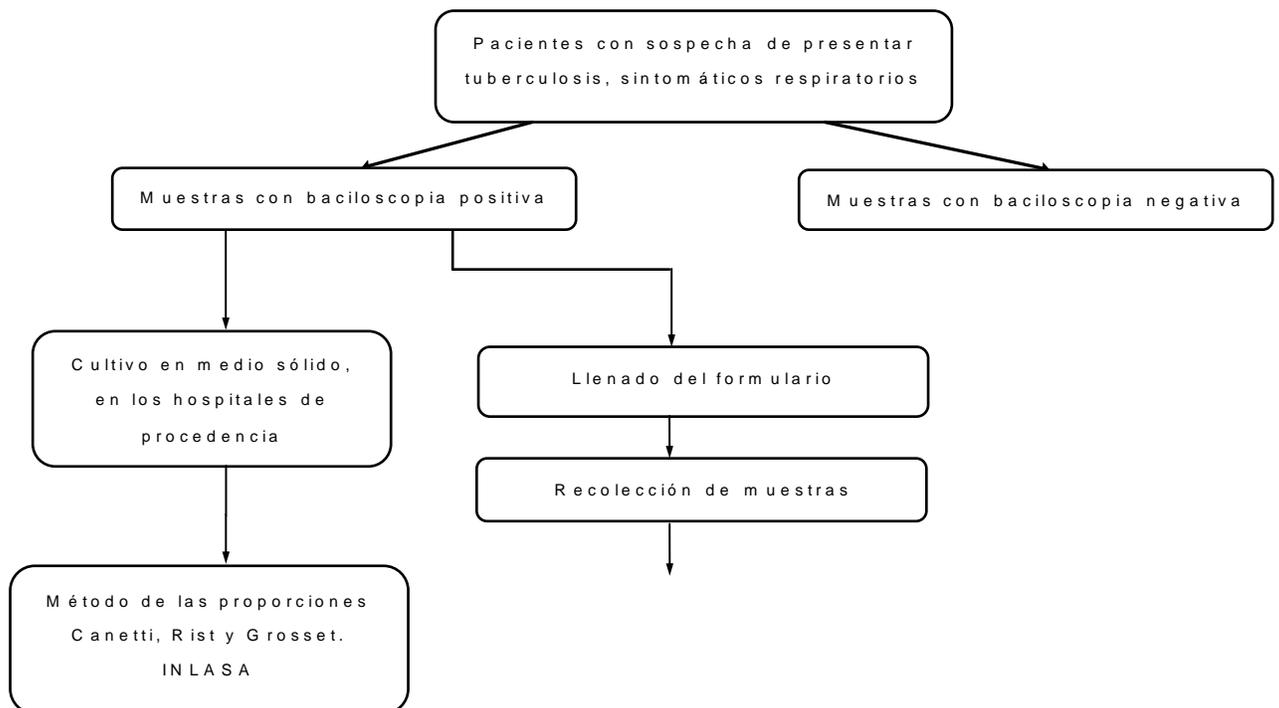
La obtención de muestras biológica respiratoria fue de al menos 2mL de esputo. Para almacenar los datos sobre las variables y los resultados del test se creó una planilla con el programa Microsoft Excel 2013.

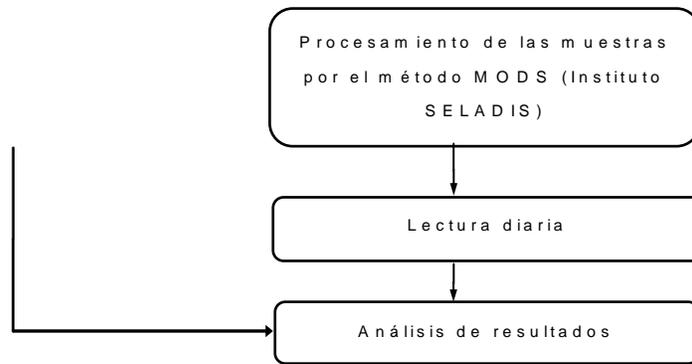
f. RECOLECCION DE MUESTRAS

La recolección de muestras de esputo de pacientes sintomáticos respiratorios, se realizó en diferentes centros de salud (mencionados anteriormente) por el personal capacitado respectivo de cada centro como rutina diaria para el diagnóstico de tuberculosis desarrollado por el PNCT. Para las pruebas de susceptibilidad se aprovecharon las mismas muestras que fueron recogidas de cada centro y procesadas antes de las 48 horas de ser recolectadas, durante ese tiempo las muestras fueron conservadas a 4°C.

Se verificó que todas las muestras estén en un envase adecuado y etiquetados correctamente. Además se verificó la fecha de recolección de la muestra, priorizando a las muestras con dos días o menos de recolección. Para el ensayo MODS, el cultivo y las PSF por el método de las proporciones se utilizó la misma muestra.

g. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS





h. CULTIVO EN MEDIO SOLIDO Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A FÁRMACOS

En el caso de las muestras con baciloscopía positiva, se verificó antes de recogerlas, que estas muestras hayan sido llevadas a cultivo en los Centros de salud de procedencia. El cultivo en estos laboratorios se realizó en medio Lowestein Jensen, Stonebrik, Ogawa, dependiendo de la técnica que emplea el laboratorio. Los cultivos positivos una vez desarrollados en cada centro de procedencia se enviaron al laboratorio de Tuberculosis INLASA para las PSF por el método de las proporciones (según normas estandarizadas por el Programa Nacional de Tuberculosis)

i. MÉTODO MODS

i. DECONTAMINACION DE LAS MUESTRAS

Se utilizó una alícuota de 2 mL de la muestra, a la cual se agregó el mismo volumen de solución digestiva (NaOH, citrato de sodio-NALC) (ANEXO 5), se mezcló durante 30 segundos en vortex y se dejó reposar unos 15 a 20 minutos. Se le agregó PBS (tampon fosfato) pH 6,8 (ANEXO 4) hasta un volumen de 13 mL. Se llevó a centrifugar a 3000g durante 15 minutos, luego se decantó el sobrenadante y se agregó gotas (1-3gotas) de ácido clorhídrico (HCl) 1M.

ii. PROCEDIMIENTO MODS

Luego de la decontaminación de la muestra se procedió a agregar 1mL del cultivo Middlebrook de los frascos con tapa blanca, correspondientes a las muestras (previamente a estos frascos se les agrego 100µL de PANTA (polimixina, anfotericina, ácido nalidixico, trimetoprima y azlocilina), la preparación de la misma se explica más adelante), se resuspendió el sedimento y se tomó 0.5mL del resuspendido y se lo almacenó en un criotubo de 1mL, para luego llevarlo a congelación, esto corresponde al “back up” de la muestra.

iii. PREPARACION DE CONTROLES POSITIVOS

Se trabajó con cepas caracterizadas en el INLASA, se utilizó una cepa sensible (ATCC), una cepa resistente a isoniacida y una cepa resistente a rifampicina. Se trasladaron colonias del medio a un tubo de TB Diluting Fluid que contenía perlas, se agitaron los tubos en vortex hasta diluir por completo las colonias. Luego se agregó el contenido a otro tubo que contenía agua y Tween (ANEXO 6), ajustando a una turbidez estándar de McFarland de látex N°1 (3×10^6 UFC/mL) (ANEXO 3). Se agregó 5uL de la suspensión de cepa a frascos que contiene caldo base Middlebrook 7H9.

iv. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ANTIBIOTICAS

Para la preparación de los antibióticos se utilizó tres frascos, uno con la letra I, otro con la letra R y otro con la letra N impresa, los cuales correspondían a: Isoniacida, Rifampicina y PANTA respectivamente. Se reconstituyeron los antibióticos en estos frascos que contenían agua desionizada (ANEXO 7).

Luego se sellaron las placas con tapas de silicona y fueron colocadas en bolsas ziplock, para luego ser llevadas a incubación a 37 °C (ANEXO 8).

v. LECTURA DIARIA DE PLACAS

Pasados los 5 días después de la siembra, se procedió a iniciar la lectura de las placas con la ayuda de un microscopio, de luz invertida (ANEXO 9). Se realizó la

lectura de las placas hasta observar desarrollo en los pozos, indicando como positivo al observar el desarrollo de las comas características de *M. tuberculosis*, se continuó las lecturas de las placas positivas para observar la formación de los cordones. Paralelamente se realizó las lecturas de los pozos con droga, indicando como sensible al observar desarrollo sólo en los pozos sin droga, como resistente a RIF o INH al observar desarrollo ya sea en el pozo que contiene RIF o INH respectivamente y como MDR si se observa desarrollo tanto en el pozo que contiene RIF como INH (ANEXO 10). En el caso de no observar desarrollo se realizó la lectura diaria hasta llegar al día 21, si hasta ese día no se observó el desarrollo de las comas, se reportó como muestra negativa. Se reportó como indeterminado en el caso de observar el desarrollo sólo en un pozo sin droga. Se reportó como contaminado en el caso de observar el desarrollo solo de hongos o alguna otra bacteria diferente.

j. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se describió los resultados obtenidos en cada una de las técnicas diagnósticas mediante el número de casos observados y sus porcentajes. Los resultados del ensayo MODS fueron comparados con los resultados del método *gold estándar* (método de las proporciones) (Canetti, Rist, & Grosset, 1963).

La estimación de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo del test, se realizó mediante un análisis de indicadores estadísticos básicos para evaluar el desempeño del procedimiento diagnóstico.

Para estimar la concordancia entre las dos técnicas diagnósticas de *M. tuberculosis* resistente a fármacos se utilizó el coeficiente de concordancia kappa.

Se analizaron los datos cuantitativos de los valores diagnósticos a través de tablas 2x2. El análisis de concordancia y chi-cuadrada se realizó con el programa Minitab 15. Los datos de las tablas 2x2 se introdujeron en el programa estadístico EPIDAT 3.0 y se realizó la determinación de los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, también con la ayuda de este programa se determinó la

concordancia entre las técnicas de diagnóstico (con un nivel de confianza del 95%). Un valor P inferior a 0,05 se utiliza para indicar la significancia estadística.

k. ASPECTOS BIOÉTICOS

El presente estudio forma parte del proyecto “Validación del ensayo MODS (*Microscopic Observation Drug susceptibility*) para el Diagnóstico de tuberculosis pulmonar en La Paz- Bolivia” llevado a cabo entre la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) y la Universidad Autónoma de Barcelona (UBA), por lo tanto se adjunta el aval bioético del proyecto. Documento adjunto (ANEXO 1). No fue necesario el uso del consentimiento informado para cada paciente ya que el ensayo MODS se realizó como prueba adicional dentro del PNCT para la recolección de datos.

9. RESULTADOS

Se trabajó sobre un total de 100 muestras con baciloscopía positiva. Del total de muestras mediante el método de las proporciones se obtuvieron 97 perfiles de susceptibilidad y los 3 restantes se contaminaron. Mediante el ensayo MODS se obtuvo el resultado de susceptibilidad de 99 muestras y 1 contaminada.

Por lo tanto, para el análisis estadístico se excluyeron las 4 muestras, llevándose a cabo el estudio en 96 muestras.

a. PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD OBTENIDOS MEDIANTE EL METODO DE LAS PROPORCIONES

Estos perfiles se obtuvieron con el fin de establecer posibles asociaciones entre fármacos. De las 96 muestras 59 fueron sensibles a todos los fármacos (INH, RIF, SM, EMB, PZA), 28 fueron monorresistentes, 7 polirresistentes y 2 MDR.

De las 28 monorresistentes, 20 fueron resistentes a SM, 6 a PZA y 2 a INH. De las 7 polirresistentes, 4 fueron resistentes tanto a INH como a SM, 2 resistentes a SM y PZA y 1 resistente a INH, SM y EMB.

Las 2 muestras MDR, fueron también resistentes a SM. Las dos únicas muestras resistentes a RIF son MDR (tabla 5).

Tabla

Perfiles de susceptibilidad obtenidos mediante el método de las proporciones

| Muestras | Resistencia a Fármacos de Primera Línea | | | | | TOTAL |
|----------------------------|---|-----|----|-----|-----|-------|
| | INH | RIF | SM | EMB | PZA | |
| Monorresistentes | 2 | 0 | 20 | 0 | 6 | 28 |
| Polirresistentes | ✓ | - | ✓ | - | - | 4 |
| | - | - | ✓ | - | ✓ | 2 |
| | ✓ | - | ✓ | ✓ | - | 1 |
| MDR | ✓ | ✓ | ✓ | - | - | 2 |
| Total Muestras Resistentes | 9 | 2 | 29 | 1 | 8 | 37 |
| Total Muestras Sensibles | - | - | - | - | - | 59 |
| Total Muestras | | | | | | 96 |

El objetivo de este estudio fue el de encontrar cepas MDR mediante el ensayo MODS, por esta razón se llevó a cabo el análisis y comparación de los resultados tomando únicamente el perfil de susceptibilidad a INH y RIF, siendo el *gold estándar* para todo el análisis estadístico el método de las proporciones. (Canetti, Rist, & Grosset, 1963)

Mediante el método de las proporciones de las 96 muestras, que fueron enviadas al estudio de susceptibilidad: 87 fueron sensibles tanto a INH como a RIF, 7 monorresistentes a INH, ninguna monorresistente a RIF y 2 resistentes a INH y RIF (MDR) (Tabla 6).

De las 96 muestras mediante el ensayo MODS se obtuvieron 88 muestras sensibles tanto a INH como a RIF, 6 monorresistentes a INH, ninguna monorresistente a RIF y 2 resistentes a INH y RIF (MDR) (Tabla 6).

Tabla

Comparación de los resultados de las PSF a INH y RIF mediante MODS y el método de las proporciones.

| INH y RIF | Método Proporciones | MODS |
|---------------------------|---------------------|------|
| Sensibilidad a Ambos | 87 | 88 |
| Resistencia a Ambos (MDR) | 2 | 2 |
| Resistencia solo a INH | 7 | 6 |
| Resistencia solo a RIF | 0 | 0 |
| Total | 96 | 96 |

En los resultados de susceptibilidad a INH se observó discrepancia en tres muestras, una mal clasificada como sensible y dos mal clasificadas como resistentes mediante el ensayo MODS. Por otro lado, no se observó discrepancia entre los resultados de susceptibilidad a RIF y MDR. (Tabla 7)

Tabla

Resultados del rendimiento de las PSF de MODS en referencia al método de las proporciones para la detección de *M. tuberculosis* drogorresistente

| MODS | MÉTODO DE LAS PROPORCIONES | | | | | |
|------------|----------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| | RIFAMPICINA | | ISONIAZIDA | | TB-MDR | |
| | Resistente | Sensible | Resistente | Sensible | Resistente | Sensible |
| Resistente | 2 | 0 | 7 | 1 | 2 | 0 |
| Sensible | 0 | 94 | 2 | 86 | 0 | 94 |
| Total | 2 | 94 | 9 | 87 | 2 | 94 |
| | 96 | | 96 | | 96 | |

b. CONCORDANCIA DEL MODS CON EL METODO DE LAS PROPORCIONES

Se calculó el valor que expresa el grado en que el método de las proporciones coincide con el ensayo propuesto en este estudio (MODS), aplicando el índice de concordancia kappa mediante el cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Se realizó dos tablas de contingencia con los resultados obtenidos:

- ✓ La primera tabla se realizó con los resultados obtenidos de susceptibilidad a INH, obteniendo un Chi-cuadrada de 62,696 (valor $P < 0,05$) (tabla 8).
- ✓ La segunda tabla se realizó con los resultados obtenidos de susceptibilidad a RIF y MDR, obteniendo un Chi-cuadrada de 96,000 (valor $P < 0,05$) (tabla 9).

En los dos casos los valores nos indican que existe una dependencia entre los resultados obtenidos, por lo cual si podemos realizar el análisis de concordancia.

Tabla

Tabla de contingencia entre los resultados de sensibilidad y resistencia a INH entre MODS y el método de las proporciones

| | | Método de las proporciones (INH) | | Total |
|---------------|---|-------------------------------------|----|-------|
| | | P | N | |
| MODS (INH) | P | 7 | 1 | 8 |
| | N | 2 | 86 | 88 |

| | | | |
|-------|---|----|----|
| Total | 9 | 87 | 96 |
|-------|---|----|----|

Tabla

Tabla de contingencia entre los resultados de sensibilidad y resistencia a RIF entre MODS y el método de las proporciones

| | | Método de las proporciones (RIF y MDR) | | Total |
|------------------------|---|---|----|-------|
| | | P | N | |
| MODS (RIF y MDR) | P | 2 | 0 | 2 |
| | N | 0 | 94 | 94 |
| Total | | 2 | 94 | 96 |

A partir de la tabla 8, al determinar la concordancia del ensayo MODS frente al método de las proporciones respecto a la susceptibilidad a INH, se obtuvo una concordancia observada del 0.9688, una concordancia esperada del 0,8385 y un valor kappa de 0,8065.

A partir de la tabla 9, se determinó la concordancia del ensayo MODS ante el método de las proporciones respecto a la susceptibilidad a RIF y MDR debido a que las únicas muestras resistentes a RIF son también las únicas muestras MDR, se obtuvo los mismos valores, una concordancia observada del 1,0000, una concordancia esperada del 0,9592 y un valor kappa de 1,0000.

Estos datos obtenidos nos indican que entre MODS y el método de las proporciones tanto para INH, RIF y MDR existe una fuerza de concordancia casi perfecta (tabla 10).

Tabla

Concordancia entre MODS y el método de las proporciones respecto a la Isoniacida y Rifampicina.

| | INH | RIF | MDR |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Concordancia observada | 0,9688 | 1,0000 | 1,0000 |
| Concordancia esperada | 0,8385 | 0,9592 | 0,9592 |
| Valor kappa | 0,8065 | 1,0000 | 1,0000 |
| Fuerza de concordancia | Casi perfecta | Casi perfecta | Casi perfecta |

c. VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE AL METODO DE LAS PROPORCIONES

Luego de determinar la concordancia entre el método de las proporciones y el ensayo MODS a partir de los datos obtenidos en la tabla 8 respecto a la susceptibilidad a INH, el ensayo MODS obtuvo una sensibilidad del 77.8% , una especificidad del 98.8% , un valor predictivo positivo del 87.5% y un valor predictivo negativo del 97.7% .

De acuerdo a la tabla 9 respecto a la susceptibilidad a RIF y MDR, se obtuvo una sensibilidad del 100% , una especificidad del 100% , un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 100% (tabla 11).

Tabla

Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del ensayo MODS ante el método de las proporciones respecto a la INH y RIF

| | INH | RIF | MDR |
|---------------------------|-------|------|------|
| Sensibilidad | 77.8% | 100% | 100% |
| Especificidad | 98.8% | 100% | 100% |
| Valor predictivo positivo | 87.5% | 100% | 100% |
| Valor predictivo negativo | 97.7% | 100% | 100% |

A partir de los datos obtenidos en la tabla 11 podemos indicar que el ensayo MODS identifica de forma correcta la susceptibilidad a INH en un 77,8% , a RIF y MDR en un 100% de los casos verdaderos positivos, es decir la verdadera susceptibilidad a los fármacos de los enfermos de tuberculosis, y es capaz de identificar correctamente al 98,8% , 100% y 100% de los casos verdaderamente negativos tanto para INH y RIF como para MDR respectivamente.

El valor predictivo positivo nos indica que por el ensayo MODS, en el caso de obtener un resultado positivo, existe un 87,5% , 100% y 100% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga tuberculosis resistente a INH, RIF y MDR respectivamente.

El valor predictivo negativo obtenido, nos indica que ante un resultado negativo en el ensayo MODS, existe una probabilidad de 97,7% , 100% y 100% , de que el paciente no tenga tuberculosis resistente a INH, RIF y MDR respectivamente.

Para evaluar al ensayo MODS también se utilizó la curva ROC que nos permite evaluar la calidad de un procedimiento diagnóstico trabajando con las nociones de

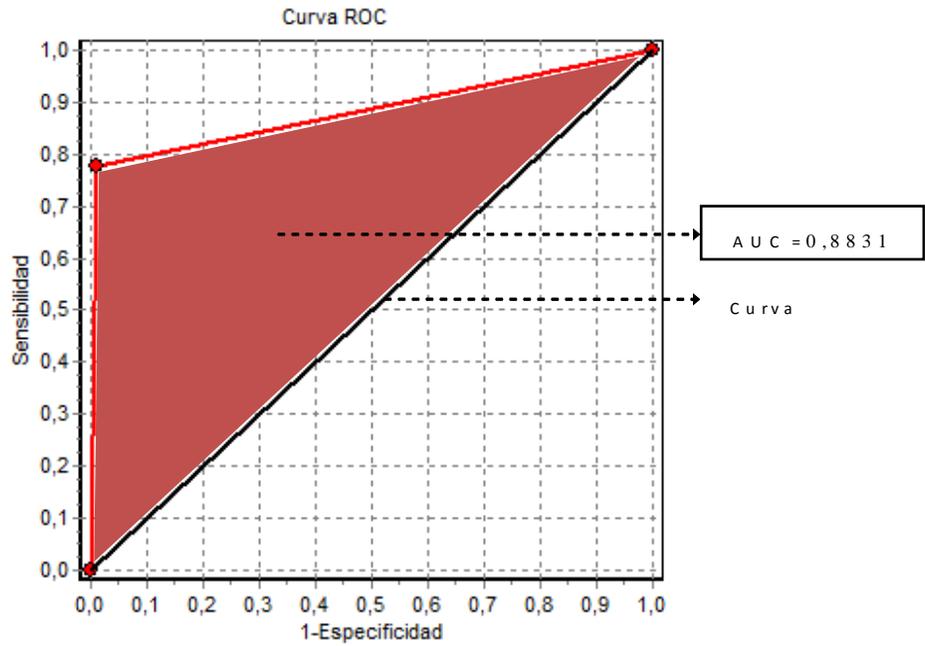
sensibilidad y especificidad. La interpretación se realiza mediante la comparación del valor obtenido AUC (área bajo la curva) con los siguientes intervalos para los valores de (AUC):

- ✓ (0.5 - 0.6): Test malo.
- ✓ (0.6 - 0.75): Test regular.
- ✓ (0.75 - 0.9): Test bueno.
- ✓ (0.9 - 0.97): Test muy bueno.
- ✓ (0.97 - 1): Test excelente.

Con un nivel de confianza del 95% se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,8831 para el perfil de susceptibilidad a INH (grafica 1); y un área bajo la curva de 1,0000 para RIF y MDR. Lo cual indica que existe un 88% de probabilidad de que el ensayo MODS detecte correctamente la susceptibilidad a INH y un 100% de probabilidad de que el ensayo MODS detecte correctamente la susceptibilidad a RIF y MDR (grafica 2).

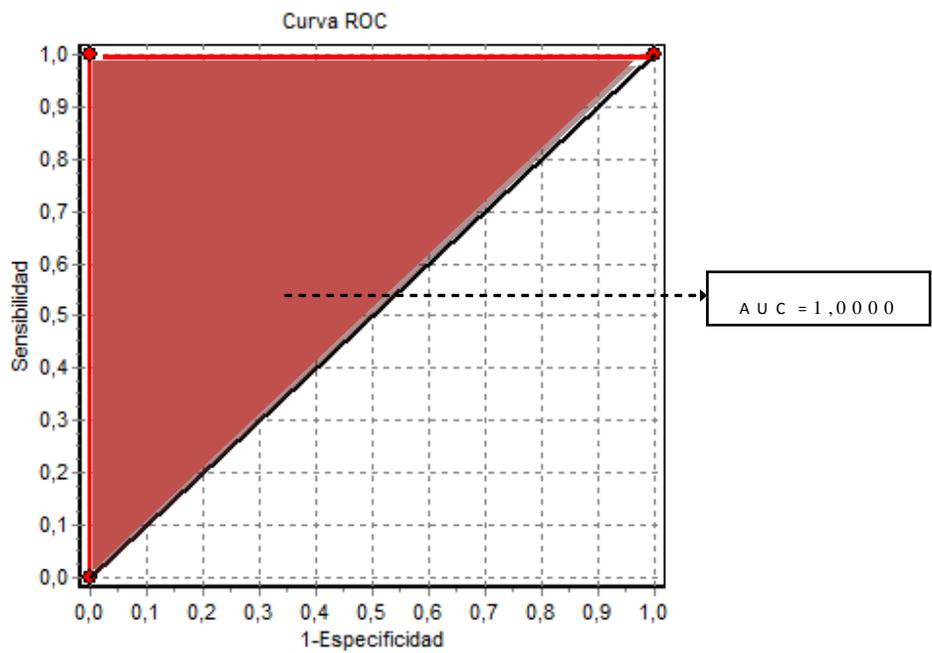
G r á f i c a

Curva ROC del ensayo MODS para Isoniacida



G r á f i c a

Curva ROC del ensayo MODS para Rifampicina y MDR



d. TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA OBTENCION DE LOS RESULTADOS POR AMBOS METODOS

El tiempo transcurrido desde la fecha de inoculación (procesamiento de la muestra) a la fecha de la disponibilidad de los resultados de susceptibilidad para INH y RIF mediante el método MODS tuvo un rango de 5 a 16 días con un promedio de 9 días para INH y 12 días para RIF.

El tiempo transcurrido para la disponibilidad de los resultados de susceptibilidad mediante el método de las proporciones por el Instituto Nacional de Referencia (INLASA) varió entre 70 a 190 días con un promedio de 140 días. Este tiempo abarca desde la inoculación de la muestra, obtención del cultivo puro (desarrollo de colonias), resiembra en Lowestein-Jensen con fármacos y finalmente la lectura del método de las proporciones para el reporte de resultados.

e. PORCENTAJE DE MUESTRAS EN RELACION A LOS DIAS DE LA OBTENCION DE RESULTADOS

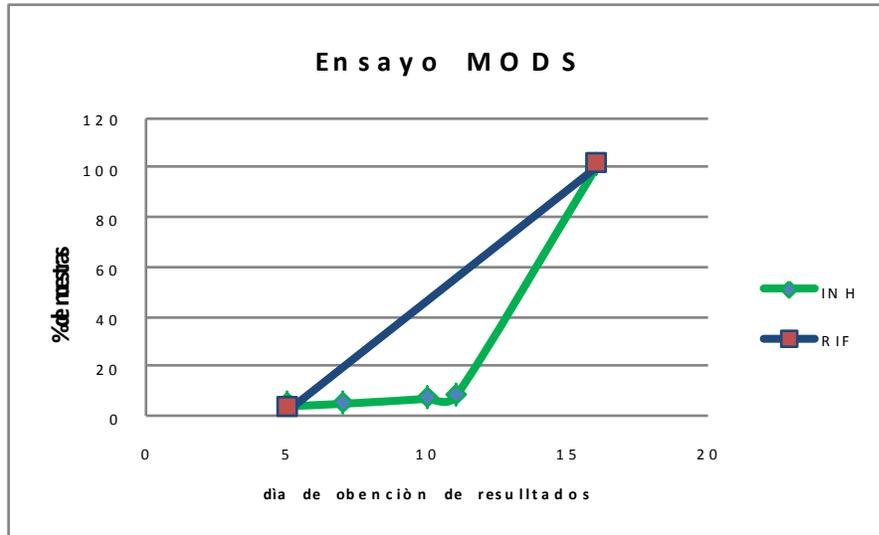
De las 96 muestras procesadas por el método MODS, 8 fueron resistentes a INH, obteniendo los resultados en un promedio de 9 días después de la siembra. Por otro lado, 2 muestras fueron resistentes a RIF, obteniendo los resultados en un promedio de 5 días. El resto de las muestras que resultaron sensibles, fueron reportadas como tal al día 16. Se realizó la lectura hasta el día 21 y no se observó cambio alguno.

Mediante el ensayo MODS el 4% de los resultados de susceptibilidad a INH se obtuvieron al día 5, el 5% al día 7, 7% al día 10, 8% al día 11 y 100% de los resultados al día 16. (Grafica 3)

En el caso de RIF, mediante MODS se obtuvo al día 5 el 2% de resultados y al día 16 se obtuvo el 100% de los resultados. (Grafica 3)

G r á f i c a

Relación entre el porcentaje de resultados obtenidos con respecto al día de reporte de resultados, mediante el ensayo M O D S



Mediante el método de las proporciones en cuanto a la susceptibilidad a INH y RIF, al día 90 se obtuvo el 5%, al día 110 se obtuvo el 15%, al día 130 se obtuvo el 36%, al día 150 se obtuvo el 68%, al día 170 se obtuvo el 92% y al día 190 se obtuvo el 100% de los resultados de susceptibilidad (Grafica 4).

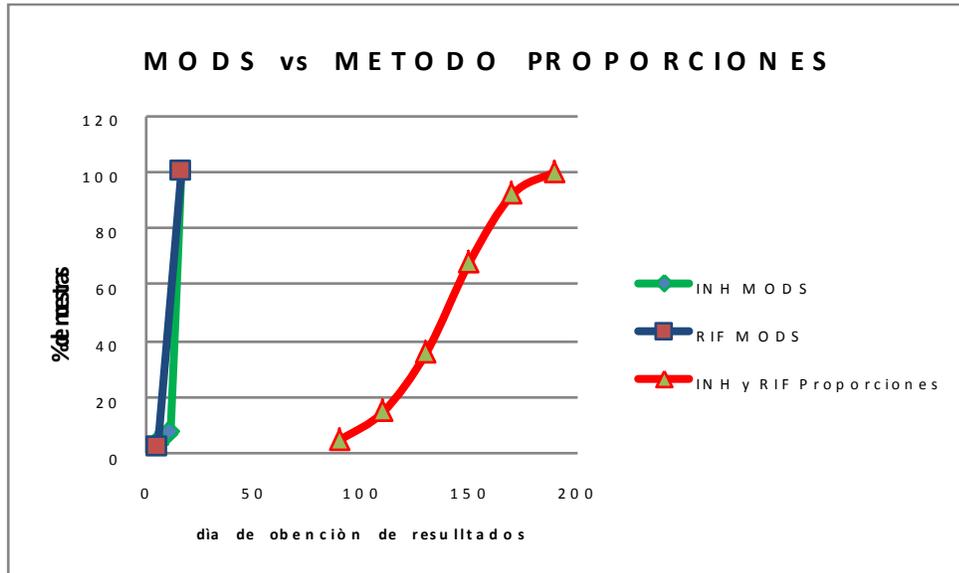
G r á f i c a

Relación entre el porcentaje de resultados obtenidos con respecto al día de reporte de resultados, mediante el método de las proporciones



G r á f i c a 5

Relación entre el porcentaje de resultados obtenidos con respecto al día de reporte de resultados, comparando el ensayo M O D S con el método de las proporciones



10. D I S C U S I O N

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

Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y aunque muchos países disponen de programas de control y han adoptado la estrategia DOTS como pilar en el control de esta enfermedad, cerca de 50 millones de personas están infectadas con cepas MDR. El incremento de los casos de TB producidos

por cepas con estas características se convierte en una situación preocupante, debido a lo complejo, prolongado y costoso que se vuelve el tratamiento (World Health Organization, 2004).

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

La frecuencia de mutantes resistentes y sus niveles de resistencia, varían en dependencia de la droga y de los genes mutados, cuya expresión fenotípica incluirá: alteraciones en sitio de acción de la droga, pérdida de las enzimas que producen la activación de la misma y cambios en la permeabilidad de la pared (De Rossi, Ainsa, & Riccardi, 2006).

Los métodos para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* juegan un papel primordial en el monitoreo de la resistencia de las cepas de *M. tuberculosis* que circulan y sus resultados ayudan a seleccionar o modificar la terapéutica e impedir oportunamente la diseminación de cepas resistentes en la comunidad (De Iogu, Uda, Pellerano, Pusceddu, Saddi, & Schivo, 2001).

Actualmente, se dispone de una gran variedad de métodos para evaluar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas; sin embargo, ninguno es perfecto y los resultados que ofrecen aún no satisfacen la orientación clínica necesaria para imponer un tratamiento efectivo y evitar la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes (Kim, 2005).

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

El creciente aumento de los casos de TB-MDR cada vez más frecuente en diversas regiones del mundo y la repercusión de esta situación en el control de esta enfermedad, así como el tiempo que necesitan las técnicas convencionales basadas en el cultivo para mostrar los resultados de la susceptibilidad han motivado el desarrollo de técnicas rápidas de detección de resistencia.

Como una alternativa que permite una reducción del tiempo necesario para obtener los resultados, fue desarrollado el ensayo MODS el cual se encuentra disponible comercialmente. Los resultados que este método proporciona son perfectamente comparables con los obtenidos mediante el método de las proporciones. El presente trabajo corresponde a una evaluación del ensayo MODS para la detección de cepas fármaco resistentes utilizando el método de las proporciones como gold estándar.

Se empezó a trabajar sobre un total de 115 muestras con baciloscopía positiva, las cuales estaban destinadas a realizar cultivo en los diferentes centros y PSF en el laboratorio Nacional de Referencia INLASA. De estas muestras, 3 cultivos se contaminaron antes de enviar a realizar las PSF y 12 cultivos fueron excluidos del estudio debido al desarrollo disgónico de las colonias (ANEXO 11). En total para las PSF se trabajó con 100 muestras que rendían los criterios de inclusión, de las cuales 4 resultaron contaminadas, trabajando para el análisis estadístico con 96 muestras.

Uno de los problemas para el desarrollo de este estudio fue la contaminación del cultivo primario observando desarrollo de colonias antes de las 48 horas, el cual es indicativo de contaminación, generalmente de origen bacteriano, pocas veces causada por hongos. Para evitar al máximo esta contaminación es importante el procedimiento utilizado para descontaminar la muestra, cuyo principal objetivo es destruir la microbiota asociada y no el *M. tuberculosis*. Una de las formas de disminuir la contaminación sería aumentar el tiempo de contacto de la muestra con la solución de lisis.

Casal et al. (1999), sostienen que los métodos de descontaminación más utilizados en la actualidad son los de Petroff, Tacquet y Ticsen, Kubica modificados por Krasnow y N-acetil-L cisteína- Hidróxido Sódico (NALC-NaOH). Además afirman que la elección de cualquiera de estos métodos dependerá del tipo de muestras que se descontamine y, sobre todo, de la utilización de determinados medios de cultivo líquidos y la realización de técnicas moleculares a partir del sedimento de las muestras descontaminadas, ya que algunos reactivos utilizados en estos métodos pueden retrasar el crecimiento de las micobacterias o interferir en las reacciones de amplificación (Griffith, 1998).

El porcentaje de contaminación aceptado, para los medios sólidos lo establecen entre el 3% y el 5%. Un índice de contaminación significativamente menor del 3% indica que la descontaminación es demasiado fuerte y un rango significativamente mayor del 5% sugiere un proceso de descontaminación demasiado suave o de digestión incompleta. Por lo que se deduce que la contaminación total observada en el cultivo primario más las PSF por el método de las proporciones en medio LJ de la presente investigación se encuentra dentro del rango permitido con un 4.6%. (Parimango Rodríguez, Chavez Castillo, Lujan Velasquez, Ortiniano Garcia, Robles Castillo, & Muñoz Ganoza, 2007)

En el caso del ensayo MODS el proceso de descontaminación es muy severo con un 1% de contaminación, probablemente por la adición de la solución PANTA que se

añade al medio líquido compuesto por diferentes antibióticos Polimixina B que tiene un espectro de actividad limitado casi exclusivamente a los bacilos Gram Negativos, Anfotericina B es un antibiótico antifúngico in vitro es activa contra muchos hongos patógenos, Acido Nalidixico es un antimicrobiano perteneciente a la familia de las quinolonas activo contra Gram negativos, Trimetoprima es un antibiótico bacteriostático con actividad contra Gram positivas y Gram negativas, Azlocilina es un antibiótico que en su acción bacteriana muestra actividad en contra de un amplio espectro de bacterias, incluyendo las *Pseudomona aeruginosa* y a diferencia de la mayoría de las cefalosporinas exhibe actividad en contra de los enterococos. La solución PANTA inhibe el crecimiento de toda la microbiota acompañante, pero el crecimiento del *M. tuberculosis* no se ve afectado. (Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, 2008)

La metodología del MODS protege inherentemente contra la contaminación cruzada desde el punto de inoculación de la muestra en adelante porque el cultivo es luego sellado dentro de una bolsa de plástico transparente. Se tomó el cuidado suficiente mientras se procesaba la muestra para evitar contaminación cruzada (proceso en campana tipo II). La contaminación máxima se observó en la fase inicial del estudio y luego se fortaleció la práctica de descontaminación dedicada y asepsia y de un seguimiento continuo. Estos dos aspectos, junto con prácticas de bioseguridad estrictas deben recibir la debida atención para que el ensayo funcione correctamente.

Como se mencionó anteriormente 12 cultivos fueron excluidos del estudio debido al desarrollo disgónico de las colonias en medio LJ. Se refiere al crecimiento disgónico como un crecimiento con colonias pequeñas menores de 1 mm. de diámetro adheridas al medio, generalmente producidas por *M. bovis* y *M. tuberculosis* con pretratamiento; y el crecimiento tipo eugónico como un crecimiento con colonias típicas mayores a 1 mm de diámetro, tienen bordes irregulares aplanados, un centro en forma de coliflor y fáciles de separar de la superficie del medio.

En la evaluación del tipo de crecimiento de las colonias en el medio LJ se observó que primó el tipo eugónico. Las muestras que resultaron en crecimiento disgónico fueron excluidas del estudio ya que referían micobacterias atípicas o *M. tuberculosis* con tratamiento antibiótico.

El primer objetivo de este estudio fue analizar las características de los perfiles de susceptibilidad a fármacos de *M. tuberculosis* obtenidos por métodos diagnósticos de referencia, en este caso el método utilizado fue el método de las proporciones realizado por el laboratorio nacional de referencia (INLASSA).

Las formas más comunes de TB monorresistente son a INH o a SM como veremos en diferentes trabajos. Esta última refleja el amplio uso de la SM en el pasado y no representa un gran desafío para el tratamiento dado que esta droga ya no se incluye en los esquemas estandarizados de tratamiento. (Ruiz, Rodríguez Cano, Zerolo, & Casal, 2003)

Park et al. (2002) estudiaron la susceptibilidad de 53 aislados, de acuerdo con el método de referencia 7H10 de proporciones, 43(81%) de los aislados fueron resistentes a INH, 42(79%) a RIF, 31(58%) a EMB, y 39(74%) a SM.

Moore et al. (2004) de 276 pacientes con pretratamiento y en tratamiento 19 y 48% fueron resistentes a INH, 2 y 42% a RIF, 14 y 27% a EMB, 5 y 22% a SM respectivamente.

En un estudio posterior realizado por Moore et al. (2006) en 349 muestras 10.7% fueron resistentes a RIF, 19.5% a INH, 10.1% a EMB, 21.4% a SM (Moore, y otros, 2006).

Llerena et al. (2010) analizaron las pruebas susceptibilidad de 128 pacientes donde la mayor resistencia se encontró para la SM en 5,7%, seguida de la INH con 3,3%, RIF 1,6% y EMB 0,8%.

En nuestro trabajo observamos que SM presenta una cifra muy alta con 30.2% , seguida de INH con 9.3% , PZA con 8.3% , RIF con 2% y EMB con 1% .

Como podemos observar en el trabajo de Park et al. las cifras son bastante altas en comparación a nuestros resultados debido a que los aislados eran de pacientes con alto riesgo de contraer TB-MDR, en cambio nuestros aislados provenían de pacientes que asistían a los diferentes centros de salud con sospecha de TB. En el primer trabajo de Moore et al. (2004) estudiaron a pacientes pre tratados y en tratamiento donde se observan cifras comparables en pacientes con pre tratamiento excepto a EMB y cifras muy altas en pacientes con tratamiento, en nuestro estudio solamente se trabajó con pacientes que nunca recibieron tratamiento contra TB. En el segundo trabajo de Moore et al. (2006) trabajan con tres grupos de pacientes con sospecha de TB, pacientes con riesgo de contraer TB-MDR y pacientes con HIV, al igual que en su primer trabajo se observan cifras altas de resistencia en comparación a nuestro estudio.

Nuestros resultados son comparables con el trabajo de Llerena et al. (2010) donde analizan los perfiles de susceptibilidad realizadas en el Instituto Nacional de Salud Colombia, reportando mayor resistencia a SM , seguida de INH, RIF y EMB .

Los diferentes trabajos no incluyen la susceptibilidad a PZA, ya que para su determinación por el método de las proporciones en tubo usando el medio de Lowenstein-Jensen requiere acidificar éste hasta un pH 5 para que la droga actúe; sin embargo, el crecimiento de *M. tuberculosis* se hace difícil y algunas cepas no logran desarrollarse. Por otra parte, si el pH es mayor a 5.5, la droga se inactiva y es probable que la prueba dé un resultado de falsa resistencia⁴⁻⁶. La prueba de la pirazinamidasasa (método de Wayne), se ha descrito para ser utilizada en reemplazo de la prueba de sensibilidad a la PZA por el método de proporciones, ésta pone de manifiesto la presencia del ácido pirazinoico por la formación de una sal ferrosa de color rosado, y permite obtener el resultado en 4 días (ANEXO 12). Las cepas de *M. tuberculosis* que son sensibles a la PZA poseen la enzima pirazinamidasasa (PZA sa) que metaboliza la PZA

con formación del ácido pirazinoico. Las cepas que resulten PZA-resistentes han perdido la actividad de esta enzima. (Leo, y otros, 2003)

Leo et al. en un trabajo realizado en Lima, Perú reporta 1.9% de resistencia a la pirazinamida en 1074 pacientes sin antecedentes de tratamiento (Leo, y otros, 2003). Gutierrez et al. estudió la resistencia de 650 cultivos en el centro de referencia de control de tuberculosis Cordova España donde se reporta 2% de resistencia a PZA. Montoro et al. en Caracas Venezuela de 102 cepas estudiadas 16 (15.7%) fueron resistentes a PZA por el método de Wayne. El porcentaje de resistencia a PZA varía en diferentes trabajos dependiendo de la región, en nuestro medio encontramos un porcentaje intermedio (8.3%) en relación a los otros trabajos realizados en diferentes países.

Dentro de la TB polirresistente, la más frecuente combinación incluye la resistencia simultánea a INH y SM, otras combinaciones son menos frecuentes, como es el caso de la resistencia simultánea a INH y RIF (MDR).

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

El hecho que la monorresistencia a la RIF sea rara y que más del 90% de las cepas resistentes a la RIF presenten además resistencia a la INH, ha convertido la resistencia a esta droga en un marcador de MDR, especialmente en países con una alta prevalencia de cepas resistentes.

En nuestros resultados observamos una baja frecuencia de MDR (2.1%), también una relación estrecha en los perfiles de susceptibilidad a RIF y MDR, las dos únicas muestras resistentes a RIF son también resistentes a INH, lo cual concuerda con estudios realizados anteriormente donde utilizan a RIF como marcador de TB-MDR. Sin embargo, en trabajos publicados observan bajos porcentajes de tuberculosis monorresistentes a RIF, si bien no en todos los casos puede ser utilizado como marcador de TB-MDR, debe utilizarse para cambiar el esquema de tratamiento y evitar el fracaso terapéutico, por lo tanto la determinación de la susceptibilidad a RIF es una de las más importantes para dirigir efectivamente el tratamiento.

Según los datos obtenidos del INLASA durante los años 2010 y 2011 los casos de TB-MDR se encontraban entre 1 a 2% del total de casos de tuberculosis pulmonar en Bolivia, según el Informe Regional 2012 de la OPS y la OMS en el año 2011 se calcula un 2.9% de casos de TB-MDR en Bolivia. De acuerdo a nuestros resultados el porcentaje de TB-MDR es de 2.1%, valor que se encuentra dentro del rango estadístico en Bolivia tomando en cuenta que la muestra en estudio es de la ciudad de La Paz del año 2013.

En cuanto a la evaluación de la concordancia del método MODS con el método de las proporciones. A partir de la tabla 8 al determinar la concordancia del ensayo MODS frente al método de las proporciones respecto a la susceptibilidad a INH se obtuvo una concordancia del 96.9%. Hubo discrepancia en tres de las 96 muestras, una mal clasificada como resistente y dos mal clasificadas como sensibles por el ensayo MODS. Una posible explicación de la discrepancia entre los resultados de la prueba MODS frente al método de las proporciones en LJ radica en la naturaleza cualitativa de la prueba MODS. En el ensayo MODS, a diferencia de los métodos en agar sólido, no

hay colonias discretas para contar y, por lo tanto, una proporción de resistencia no se puede calcular. En el método MODS, cualquier crecimiento en medio que contiene el fármaco indica resistencia a los fármacos, mientras que en pruebas de agar sólido, el crecimiento de menos del 1% del que se dio en el medio libre de fármaco se interpreta como susceptibilidad (Mello, y otros, 2007).

A partir de la tabla 10 al determinar la concordancia del ensayo MODS frente al método de las proporciones respecto a la susceptibilidad a RIF y MDR se obtuvo una concordancia del 100% en ambos casos. Ambos métodos detectaron el 2.1% de los aislados como TB-MDR y no hubo discrepancia entre los dos métodos. Los porcentajes de concordancia entre el ensayo MODS y el método de las proporciones del presente estudio son similares a los reportados por anteriores estudios, como veremos adelante.

Moore et al. En un estudio comparó los resultados de las pruebas de susceptibilidad de 349 muestras positivas entre el ensayo MODS y el método de las proporciones en LJ como gold standard. Se obtuvo una concordancia de 100% para RIF, 96.7% para INH y 98.8% para MDR.

Según el trabajo de Girum Shiferaw y col. en 247 muestras la concordancia de las PSF entre el Método de las Proporciones y el ensayo MODS fueron para INH, RIF y MDR 96.7, 98.8 y 98.8% respectivamente (Shiferaw, Woldeamanuel, Gebeyehu, Girmachew, Demessie, & Lemma, 2007).

Park et al., evaluó el desempeño de las PSF mediante el ensayo MODS comparándola con el método de proporción en agar 7H10 de referencia. Utilizó 53 aislados de *M. tuberculosis* de personas con alto riesgo de contraer TB-MDR, en este estudio hubo una concordancia del 100% tanto para INH como para RIF entre los dos métodos. (Park, Bishai, Chaisson, & Dorman, 2002)

En un estudio realizado en Vietnam los resultados de las pruebas de susceptibilidad mediante MODS fueron comparados con los resultados método de las

proporciones en LJ para 300 muestras. La concordancia entre ambos métodos fue 92.7% , 98.7% y 99% para la detección de aislados resistentes a INH, RIF y MDR respectivamente. (Minh Ha, y otros, 2012)

Como podemos observar en los diferentes trabajos al igual que en el nuestro los resultados de susceptibilidad tanto para INH, RIF como MDR del ensayo MODS frente al método de las proporciones son comparables ya que existe una fuerza de concordancia casi perfecta (tabla 10).

Los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del MODS frente al método de las proporciones, revelan que los resultados del ensayo MODS obtenidos en este estudio fueron comparables a los trabajos realizados por diferentes autores. Parsons et al. bajo una revisión de la literatura y un meta-análisis conducidos para analizar las sensibilidades y especificidades del ensayo MODS, calculó que las sensibilidades y especificidades agrupadas para la detección de resistencia a INH fue de 92% y 96% respectivamente, para RIF fue de 96% y 96% respectivamente (Parsons, y otros, 2011).

En un estudio retrospectivo, Moore et al. Analizó la base de datos de 207 resultados de muestras respiratorias de pacientes pre tratados cultivados por el método MODS. El método de referencia fue el ensayo indirecto de micropozos Azul Alamar y/o el ensayo en micropozos de tetrazolium. Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron 81.1% , 96.9% , 85.7% y 95.7% para INH; 100% , 98.3% , 57.1% , y 100% para RIF; 100% , 98.2% , 57.1% y 100% para MDR. Además analizó 69 muestras de pacientes en tratamiento. Los valores fueron 90.3% , 91.2% , 90.3% y 91.2% para INH; 92.9% , 89.7% , 86.7% y 94.6% para RIF; 90.9% , 93.3% , 87.0% y 95.5% para MDR respectivamente. (Moore, y otros, 2004)

Moore et al. en un posterior estudio en 338 muestras obtuvo un porcentaje de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN en el ensayo MODS de 100% , 100% , 100% y

100% para RIF; 84.6% , 99.6% , 98.2% y 96.4% para INH; 88.6% , 100% , 100% y 98.7% para MDR respectivamente. (Moore, y otros, 2006)

Según Minh Ha et al. (2012) la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de MODS fue 72.6% y 97.9% , 90.0% y 93.2% respectivamente para la detección de resistencia a INH , 72.7% , 99.7% , 88.9% y 98.9% respectivamente para la detección de resistencia a RIF, 77.8% , 99.7% , 87.5% y 99.3% respectivamente para la detección de MDR.

En los diferentes trabajos publicados al igual que en el presente trabajo se observan porcentajes altos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN mediante el ensayo MODS obteniendo los mejores resultados en la detección de TB-MDR, seguida de la detección de resistencia a RIF y por último la detección de resistencia a INH.

Como se mencionó anteriormente uno de los parámetros más importantes para el control de la TB-MDR, es el tiempo de espera que el paciente debe tener para recibir su resultado siendo en promedio 140 días en el caso del método gold estándar cultivo - método de las proporciones según datos del presente estudio, y el tiempo promedio para la obtención de los resultados de susceptibilidad a INH y RIF mediante el ensayo MODS fue 12 días, con un límite inferior de crecimiento de 5 días y un tiempo máximo de desarrollo de 16 días.

Entre otros estudios realizados al respecto; Shiferaw et al. en un estudio prospectivo de 262 muestras con baciloscopia positiva obtuvo los resultados tanto del cultivo positivo como la susceptibilidad a INH y RIF en un tiempo promedio de 9 días con un rango de 5 a 29 días (Shiferaw, Woldeamanuel, Gebeyehu, Girmachew, Demessie, & Lemma, 2007).

Mello et al. realizó un estudio en 251 individuos con riesgo de contraer TB droga resistente, 180 resultaron positivos mediante los métodos MODS y LJ y fueron incluidos en el análisis de susceptibilidad. El tiempo promedio desde la siembra hasta la obtención

de los resultados fue de 21 días (rango 17 - 24 días) para el ensayo M O D S y 49 días (rango de 46 - 55 días) para el método de las proporciones. (M ello, y otros, 2007)

M oore et al., realizó un análisis retrospectivo a dos grupos de pacientes, con pre tratamiento y en tratamiento por M O D S, 8.2 días (7.9 a 8.4 días) y 10 días (9 a 11 días) respectivamente, y por el método de las proporciones 17.3 días (16.5 a 18.1 días) y 23.6 días respectivamente sin contar con el lapso de tiempo para obtener el cultivo puro. El tiempo fue significativamente más corto en pacientes con pre tratamiento que en los pacientes con tratamiento. (M oore, y otros, 2004)

Caviedes et al. obtuvo los resultados de susceptibilidad de 88 pacientes mediante el ensayo M O D S en un rango de 5 a 20 días (9.5 días promedio). (Caviedes, y otros, 2000)

M oore et al. (2006) en un estudio posterior obtuvo la susceptibilidad de 349 pacientes, el tiempo promedio de la obtención de resultados fue de 7 días para el ensayo M O D S, 22 días para el cultivo automático y 68 días para LJ.

Mediante el método de las proporciones se obtuvo los resultados de susceptibilidad para INH y RIF en un promedio de 142 días desde la siembra de las muestras, con un límite inferior de crecimiento de 90 días y un tiempo máximo de desarrollo de 190 días.

Para realizar esta PSF es necesario obtener primero el cultivo primario que tarda un tiempo de 20 a 60 días, para luego sembrar en medio LJ con los diferentes fármacos y realizar la lectura en un tiempo promedio de 45 días.

En el Laboratorio Nacional de referencia de Diagnóstico de Tuberculosis (INL A S A), debido a la carga de muestras que recibe de toda Bolivia, los 45 días que deberían ser invertidos en la prueba de susceptibilidad por el método de las proporciones no son reales, sino que pasan varios días antes de que procesen los cultivos positivos recibidos de los diferentes centros de salud. También existen otros percances como el envío de los cultivos primarios desde otras ciudades y su contaminación en el trayecto, que trae como consecuencia empezar el proceso nuevamente desde la recolección de la

muestra. Por otro lado, la contaminación podría darse al momento de realizar el método de las proporciones, que resulta en volver a realizar la resiembra una vez detectada la contaminación, la cual se da generalmente al momento de la lectura (45 días). En caso de haber una contaminación por el método de las proporciones, el PNCT recurre al método de la nitrato reductasa para adelantar el resultado, pero de todas maneras éste toma 21 días hasta su lectura.

11. CONCLUSION

Los resultados del presente estudio apoyan nuestra hipótesis, demostrando que el ensayo MODS es un método capaz de detectar cepas de *M. tuberculosis* drogorresistentes directamente de muestras de esputo con alta sensibilidad y especificidad, reducida inversión económica y tecnológica, y sobre todo mayor rapidez en comparación a los métodos convencionales.

Los perfiles de susceptibilidad obtenidos mediante el método de las proporciones muestran que existe una relación estrecha en la resistencia a RIF y MDR, ya que la mayoría de las cepas resistentes a RIF tienden a ser MDR.

Los resultados obtenidos mediante el método MODS muestran que éste presentó una concordancia casi perfecta con el método de las proporciones para la detección de cepas resistentes tanto a INH, RIF como a cepas MDR.

Al determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método MODS para la susceptibilidad a INH, RIF y MDR, se obtuvieron resultados favorables ya que el método MODS presentó una elevada sensibilidad y especificidad.

Si bien el ensayo MODS y el método de las proporciones ofrecen resultados comparables, el método MODS es mucho más rápido comparando la variable tiempo.

Finalmente con los resultados obtenidos, se puede considerar al ensayo MODS como un método válido y aplicable, que permite la detección de casos de *M. tuberculosis* multidrogorresistente de manera equivalente y aún superior a los métodos microbiológicos de referencia, disminuyendo el tiempo y el costo del diagnóstico, por lo

tanto válido para aplicarlo como método de diagnóstico de rutina o de tamizaje de TB-MDR en nuestro país.

12. BIBLIOGRAFIA

- Aidar, O., Ambroggi, M., Arévalo Jave, J., & Brian, M. C. (2010). Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis.
- Arráziz, N., Bermúdez, V., & Urdaneta, B. (2005). Resistencia a Drogas en M. tuberculosis: Bases Moleculares. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 24(1), 23-31.
- Asencios Solis, L., Acurio Usca, M., & Quispe Torres, N. y. (2012). Susceptibilidad a drogas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante observación microscópica (M ODS). Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.
- Aziz, M., & Wright, A. (2005). The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease global project on surveillance for antituberculosis drug resistance: A model for Other Infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 41:258-62.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., & Butel, J. S. (2011). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Mexico: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Calvo Bonachera, J., & Rosique, B. (2010). Tuberculosis. Diagnóstico y tratamiento.
- Camínero Luna, J. (2003). Guía de la tuberculosis para médicos especialistas.
- Canetti, G., Rist, N., & Grosset, J. (1963). Measurement of the sensitivity of the bacillus to drugs: antibiogram for the method of proportions, methodology, criteria of resistance, results, interpretation. *Tuberculose et de Pneumologie*, 27, 217-272.
- Cardoso Leão, S., & Portaels, F. (2007). History of Tuberculosis. En Palomino JC, Cardoso Leão S y Ritacco V. Tuberculosis, from basic science to patient care.
- Caviedes, L., Lee, T.-S., Gilman, R. H., Sheen, P., Spellman, E., Lee, E. H., y otros. (2000). Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. *Journal Clinical Microbiology*, 38, 1203-1208.
- Caviedes, L., Lee, T.-S., Gilman, R. H., Sheen, P., Spellman, E., Lee, E. H., y otros. (Marzo de 2000). Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3):1203-8.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2006). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs-world, 2000-2004. *55*, 301-305.
- Centro Cochrane Iberoamericano. (2009). Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut (AIAQS) de Catalunya.
- Cohen, T., Sommers, B., & Murray, M. (2003). The Effect of Drug Resistance on the Fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infectious Diseases*, *3*, 13-21.
- Coronel, J., Roper, H., & Caviedes, L. (2010). MODS: a user guide (v12.1). Microscopic observation drug susceptibility assay.
- Cotran, R. S., Kumar, V., & Collins, T. (2000). *Patología Funcional y Estructural* (Sexta ed. ed.). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
- David A. J. Moore, M. C. (2006). Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *New England Journal of medicine*, *355*, 1539-1550.
- De logu, A., Uda, P., Pellerano, M., Pusceddu, M., Saddi, B., & Schivo, M. (2001). Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, isoniazid and streptomycin in liquid medium. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious*, *20*:33-9.
- De Rossi, E., Ainsa, J., & Riccardi, G. (2006). Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*:36-52.
- Deland, F. H., & Wagner, H. N. (1969). Early detection of bacterial growth, with carbon-14-labeled glucose. *Radiology*, *92*, 154-155.
- Gandhi, N. R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, S. H., Zignol, M., Soolingen, D. v., y otros. (2010). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*, *375*, 1830-1843.
- Gillespie, S. H., & Hawkey, P. M. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.
- Griffith, D. (1998). Mycobacteria as Pathogens of Respiratory Infection. *Infectious Disease Clinics of North America*. *12*(3):593-600.
- Hoepfner, D., Marcinjuk, B., & McNab, B. (1999). Tuberculosis in patients with a normal chest radiography. *115*, 445-52.
- Iseman. (2007). Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Charles Darwin would understand. *Clinical Infectious diseases*(45), 1415-1416.

- Juárez Beltrán, M., Zaragoza Velasco, K., & Criales Cortés, J. L. (Octubre-Diciembre de 2009). Tuberculosis pulmonar. *4*, 319-329.
- Kaufmann, S. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*, *1*, 20-30.
- Kim, S. (2005). Series drug susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *European Respiratory Journal*, *25*:564-9.
- Koneman, E. W., & Winn, W. C. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas. (2008). M ODS Guía del usuario Microscopic observation drug susceptibility assay. *12*, 10. Lima, Perú.
- Lee, A. S., Teo, A. S., & Wong, S. Y. (2001). Novel Mutations in *ndh* in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, *45*(7), 2157-2159.
- Leo, H., Vásquez, L., Asencios, L., Quispe, N., Gómez, L., Lecca, L., y otros. (2003). Determinación de la Susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a la Pirazinamida Mediante la Prueba de la Pirazinamida, Perú-1999. *Peru Med Exp Salud Publica*, *20*(2).
- Lozano, J. A. (2002). Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *21*(8).
- Martin, A., Francoise, P., & Palomino, J. C. (2006). Colorimetric redox - indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*, 175-183.
- Martín, F. (2009). Reunión de Primavera de la SCCALP Mesa redonda: Patología infecciosa. Problemas actuales. *BOL PEDIATR*, *49*, 167-173.
- Mello, F. C., Arias, M. S., Rosales, S., Grazia Marsico, A., Pavón, A., Alvarado Gálvez, C., y otros. (2007). Clinical Evaluation of the Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Isoniazid or Rifampin. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(10), 3387-3389.
- Minh Ha, D. T., Ngoc Lan, N. T., Wolbers, M., Kiet, V. s., Thanh Hang, H. T., Hong Duc, N., y otros. (2012). Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for diagnosis of multidrug resistant Tuberculosis in Viet Nam. *BMC Infectious Diseases*, *12*:49.
- Minion, J., Leung, E., Menzies, D., & Pai, M. (2010). Microscopic observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, *10*, 688-698.

- Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia. (2009). Guía de Atención de la Tuberculosis Pulmonar y Extrapulmonar.
- Moore, D. A., Evans, C., Gilman, R., Caviedes, L., Coronel, J., Vivar, A., y otros. (2006). Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *The New England Journal of Medicine*, 355, 1539-50.
- Moore, D. A., Mendoza, D., Gilman, R. H., Evans, C. A., Holm Delgado, M. G., Guerra, J., y otros. (Octubre de 2004). Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay, a Rapid, Reliable Diagnostic Test for Multidrug-Resistant Tuberculosis Suitable for Use in Resource-Poor Settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 4432-4437.
- Morgan M., H. C. (1983). Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smearnegative specimen. *Journal Clinical Microbiology*, 18, 384-388.
- Murillo Godínez, G. (2009). Las Gotitas de Flügge. Unidad de Cuidados Intensivos del Adulto. *Med Inst Mex Soc*, 47(3), 290.
- Murray, P. R., & Rosenthal, K. S. (2007). *Microbiología Médica*. Madrid, España: GEA Consultoría Editorial.
- Organización Panamericana de la Salud. (2010). Guía para el Manejo Programático de la Tuberculosis multidrogorresistente en Colombia. Ministerio de Salud Social.
- Organización Panamericana de la Salud. (2012). Tratamiento antirretroviral bajo la lupa: un análisis de salud pública en Latinoamérica y el Caribe. Bolivia.
- Organization World Health. (2003). Treatment of Tuberculosis. Guidelines for National Programmes. *Third Edition*. (WHO, Ed.) Geneva.
- Pai, M., Kalantri, S., & Dheda, K. (2006). New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diag*. 6:423-32.
- Palomino, J. C., Cardoso Leao, S., & Ritacco, V. (2007). *Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care*.
- Palomino, J. C., Cardoso Leão, S., & Ritacco, V. (2007). Tuberculosis 2007. From basic science to patient care.
- Parimango Rodríguez, D., Chavez Castillo, M., Lujan Velasquez, M., Ortiniano Garcia, M., Robles Castillo, H., & Muñoz Ganoza, E. (2007). Comparación de los medios Ogawa y Löwestein-Jensen en el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista Médica Vallejana*, 4(1), 24-31.

- Park, W. G., Bishai, W. R., Chaisson, R. E., & Dorman, S. E. (Diciembre de 2002). Performance of the Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay in Drug Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *40*, 4750–4752. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Parsons, L. M., Somoskovi, A., Gutierrez, C., Lee, E., Paramasivan, C., Abimiku, A., y otros. (Abril de 2011). Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*, 314–350.
- Parsons, L. M., Somoskovi, A., Urbanczik, R., & Salfinger, M. (2004). Laboratory Diagnostic Aspect of Drug Resistance of Tuberculosis. *Frontiers Bioscience*, *1*, 2086–2105.
- Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. (2008). Normas Técnicas 2008.
- Rodríguez De Marco, J. (2004). Tuberculosis. Comisión Honoraria para la lucha antituberculosa. Departamento de Tuberculosis.
- Ruiz, P., Rodríguez Cano, F., Zerolo, F. J., & Casal, M. (2003). La estreptomina como fármaco de segunda línea en la quimioterapia de la tuberculosis. *Revista Española Quimioterapia*, *16*(2), 188-194.
- Russell, D. G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*, 569-586.
- Salazar Quirós, A., & Sáenz Campos, D. (2005). Tratamiento de Tuberculosis en Primer y Segundo Nivel de Atención. San Jose, Costa Rica.
- Shamputa, I. C., Jugheli, L., Sadradze, N., Willery, E., Portaels, F., Supply, P., y otros. (2006). Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respiratory Research*, *7*(99).
- Shiferaw, G., Woldeamanuel, Y., Gebeyehu, M., Girmachew, F., Demessie, D., & Lemma, E. (Abril de 2007). Evaluation of Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay for Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*, 1093–1097.
- Somoskovi, A., Parsons, L. M., & Salfinger, M. (2001). The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research*, *2*(3), 164-168.
- Tapia Sainz, R., Vidal Aranda, R., & Zaiduni Salazar, M. (2009). Manual de Normas Técnicas en Tuberculosis. La Paz, Bolivia.
- Torres, C. A., & Varón, F. A. (2010). Guías de Práctica Clínica ASMA. FUNDACIÓN NEUMOLÓGICA COLOMBIANA.

- Wade, M., & Zhang, Y. (2004). Mechanisms of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers bioscience*, 9, 975-994.
- World Health Organization. (2004). International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. (2007). Green Light Committee (GLC) of the Working Group on MDR-TB. Annual Report 2007. WHO/HTM/TB/2008.409.
- World Health Organization. (2007). Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAG-TB). Report of the seventh meeting.
- World Health Organization. (2008). New laboratory diagnostic: Tools for Tuberculosis control.
- World Health Organization. (2010). Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). 2010 Global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3.
- World Health Organization. (2010). Non-commercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis. Geneva.
- World Health Organization. (2011). Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement (Internet). Geneva: WHO; 2011. (Citado el 13 de Marzo del 2013).
- World Health Organization. (2008). Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IRATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Fourth global report. WHO/HTM/2008.394.
- Yeager, H., Lacy, J., Smith, L. R., & Lemaistre, C. (1967). Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *American Review of Respiratory Disease*, 95, 998-1004.
- Zhang, Y. (2005). The Magic Bullets and Tuberculosis drug Targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 529-564.

A N E X O S

ANEXO 1. Aval Ético

**COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA**
COMISIÓN DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO

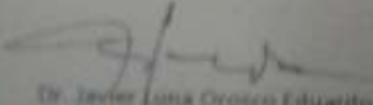
A quien correspondiera:

La Comisión de Ética de la Investigación del Comité Nacional de Bioética (CEI-CNB), tiene a bien informar que fue presentado a la CEI-CNB, para su revisión y aval ético el proyecto "Validación del MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility) para el diagnóstico de la Tuberculosis en La Paz, Bolivia", por el Instituto SELADIS (Servicios de Laboratorio, Diagnóstico e Investigación en Salud) / Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

Dicho proyecto fue evaluado bajo la normativa internacional, que indica los criterios éticos que se toman en cuenta para todo proyecto de investigación que involucra seres humanos:

1. Validez científica (diseño metodológico bien formulado)
2. Selección equitativa de la muestra (tomando en cuenta principalmente a grupos vulnerables)
3. Validez social (pertinencia, urgencia y relevancia del proyecto)
4. Relación Riesgo/Beneficio (viendo que el riesgo sea mínimo y mayor el beneficio para los sujetos de estudio)
5. El Consentimiento informado (documento redactado de una manera clara, comprensible y lo suficientemente informativo para el sujeto de investigación)

Una vez verificadas las correcciones hechas por el Investigador Principal, en base a las observaciones de la CEI, es que se tiene a bien certificar que el mencionado proyecto cumple con todos los requisitos éticos arriba mencionados, por lo que los miembros de la CEI-CNB dan el respectivo AVAL ÉTICO al proyecto "Validación del MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility) para el diagnóstico de la Tuberculosis en La Paz, Bolivia", el mismo que puede proseguir con su ejecución.


Dr. Javier Luna Orozco Eduardo
COORDINADOR
Comité Nacional de Bioética

La Paz, 13 de Agosto 2013

A N E X O 3. Escala de M c Farland N°1.



A N E X O 4. Tam p ó n Fosfato P B S p H 6.8



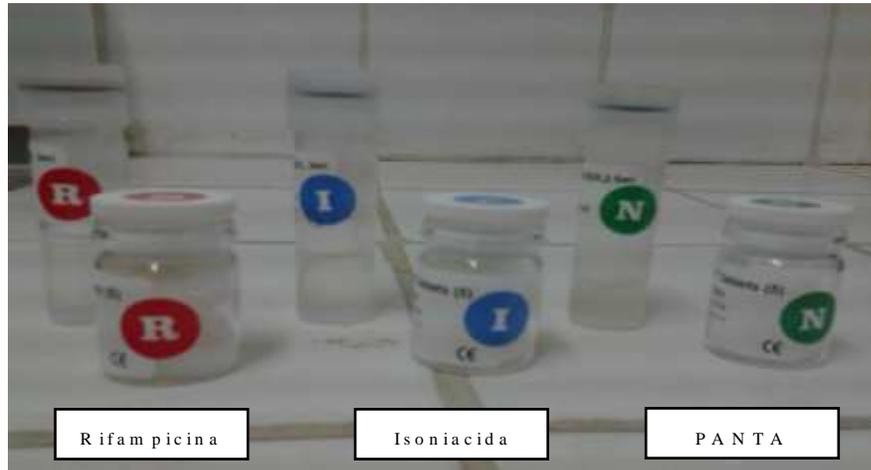
ANEXO 5. Solución digestiva



ANEXO 6. Tubos para preparación de controles positivos.



ANEXO 7. Antibióticos



ANEXO 8. Placas MODS selladas con tapas de silicona y bolsas ziplock incubando a 37°C en una estufa con ventilador.



A N E X O 9 . Observación de las placas M O D S mediante el microscopio de luz invertida.



ANEXO 10. Crecimiento de *M. tuberculosis* resistente a la INH en placas MODS según días de cultivo.

Día 5-7



Día 8-10



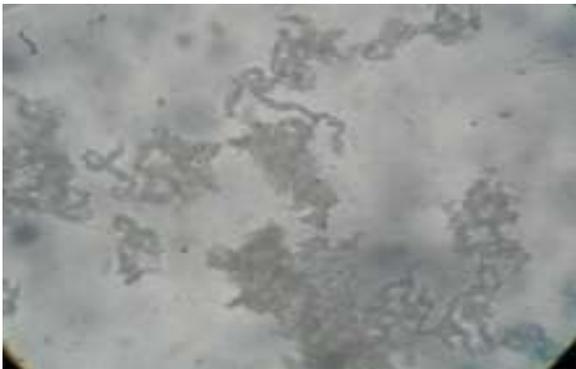
Día 11-13



Día 14-16



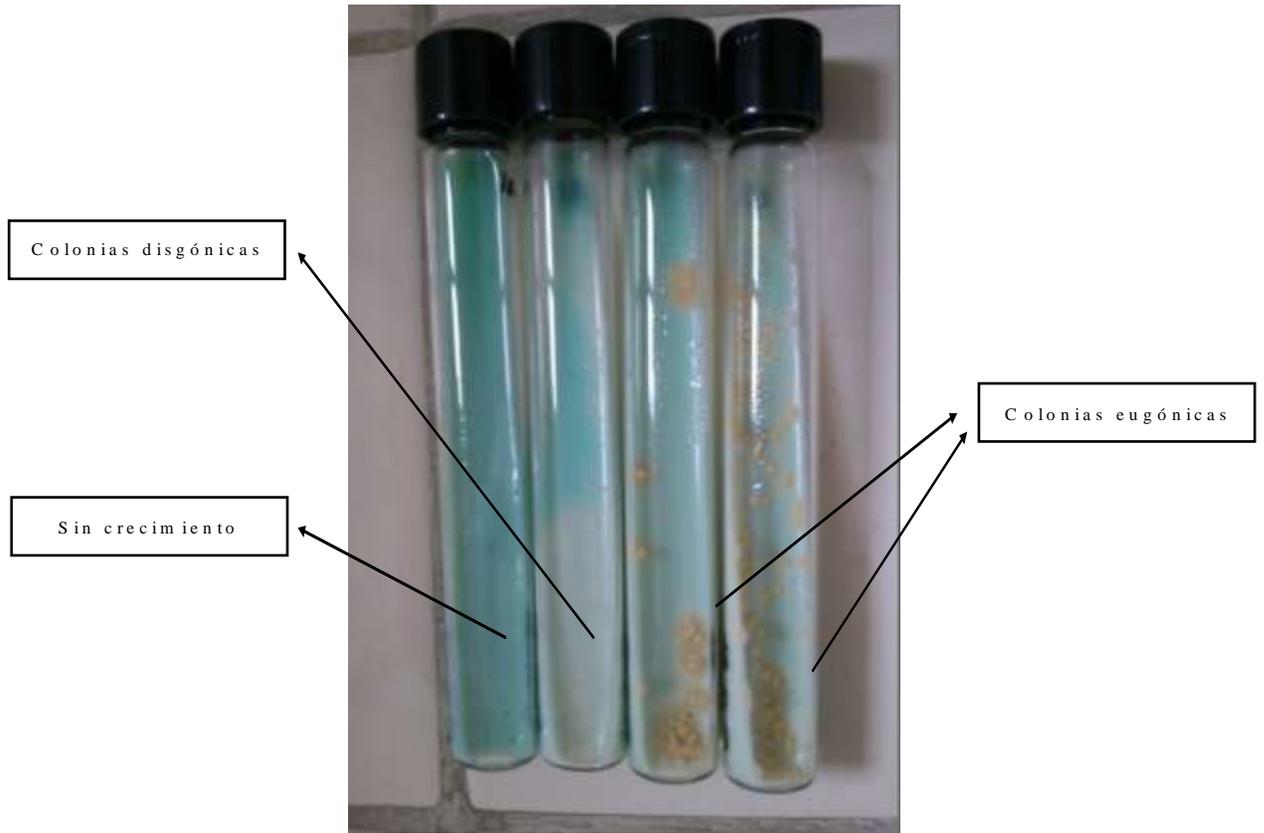
Día 17-19



Día 20-22



ANEXO 11. Método de las proporciones (colonias disgónicas y eugónicas)



ANEXO 12. Método de Wayne (Detección de resistencia a la PZA)

