

**Diagnóstico de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en
Mycobacterium tuberculosis mediante el empleo de metodologías
colorimétricas en Colombia.**

LILIANA ANDREA GONZÁLEZ CARREÑO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial
para optar al título de
Magister en Ciencias Biológicas**

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad De Ciencias
Maestría En Ciencias Biológicas
Bogotá, Diciembre 2009**

**Diagnóstico de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en
Mycobacterium tuberculosis mediante el empleo de metodologías
colorimétricas en Colombia.**

Director

Wellman Ribón

Instituto Nacional de Salud

Consultor Internacional

Juan Carlos Palomino

Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica.

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad De Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas

Bogotá, Diciembre 2009

DEDICATORIA

A Dios, por colmarme de bendiciones cada día y por darme la oportunidad de conservar mi vida y mi integridad para poder concluir esta etapa tan importante.

A mi familia, que con su amor, dedicación y buen ejemplo han hecho de mí quien soy...

A mi madre quien ha sido mi motor, mi amiga, mi inspiración...sin ella no habría sido posible llegar hasta donde he llegado.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Wellman Ribón, mi director de tesis y amigo quien fue mi apoyo incondicional en este periodo tan importante de mi vida.

Al Instituto Nacional de Salud y al CCITB por darme la oportunidad de realizar este trabajo con ellos y adquirir la experiencia que hoy me hace mejor profesional y mejor persona.

A la Pontificia Universidad Javeriana, por proporcionarme los conocimientos para culminar esta fase de mi vida.

A todos y cada uno de aquellos que con su colaboración hicieron de este proyecto una realidad.

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946.

NOTA DE APROBACIÓN

El trabajo de grado titulado “**Diagnóstico de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en *Mycobacterium tuberculosis* mediante el empleo de metodologías colorimétricas en Colombia**” presentado por la estudiante Liliana Andrea González Carreño, para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas fue revisado y calificado como:

APROBADO

Wellman Ribón
Director de tesis

Hugo Díez
Jurado 1

Freddy Gamboa
Jurado 2

Salim Mattar
Jurado 3

Bogotá, Diciembre de 2009

**Diagnóstico de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en
Mycobacterium tuberculosis mediante el empleo de metodologías
colorimétricas en Colombia.**

Liliana Andrea González Carreño

Ingrid Shuler García

Decana Académica Facultad de Ciencias

Manuel Antonio Franco Cortés

Director del Programa Maestría en Ciencias Biológicas

Diagnóstico de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en *Mycobacterium tuberculosis* mediante el empleo de metodologías colorimétricas en Colombia.

Resumen

A pesar del panorama que representa a nivel mundial la tuberculosis y sus variantes resistentes, en muchos países como Colombia, aún no se conoce el porcentaje de resistencia a medicamentos de segunda línea. Uno de los puntos más importantes contemplados en las estrategias de control de la tuberculosis es el diagnóstico de susceptibilidad, haciendo necesario buscar metodologías diagnósticas que permitan detectar eficazmente aislamientos resistentes con el fin de evitar su diseminación. Algunos investigadores en la búsqueda constante de nuevas alternativas diagnósticas han propuesto el uso de técnicas rápidas y sencillas, entre las cuales se destacan las metodologías colorimétricas, consideradas opciones rápidas y económicas entre las de su clase. En este estudio se demostró la utilidad y eficacia de estas metodologías en el diagnóstico oportuno de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*. Se realizó un trabajo de investigación utilizando dos metodologías colorimétricas REMA y TEMA, con el fin de determinar su utilidad y eficacia en la detección de multidrogorresistencia y resistencia extensiva; el trabajo se ejecutó en tres etapas en las que se analizaron 100 aislamientos de *M. tuberculosis*. Se determinó el rendimiento de las pruebas en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor

predictivo negativo, punto de corte y área bajo la curva, los cuales fueron obtenidos con análisis con curvas ROC utilizando el programa MedCalc para Windows. En la primera fase se analizaron por TEMA 70 aislamientos de *M. tuberculosis* colombianos, 60 multidrogorresistentes y 10 sensibles; en la segunda fase se analizaron por TEMA y REMA, 30 aislamientos de *M. tuberculosis* del Instituto de Medicina Tropical de Bélgica; en la tercera fase se realizó el análisis del perfil de multidrogorresistencia y resistencia extensiva a los 60 aislamientos multidrogorresistentes analizados en la primera fase. Se encontraron porcentajes de sensibilidad que oscilan entre el 80 y 100% para los medicamentos incluidos en los ensayos, y áreas bajo la curva por encima de 0,8 lo cual indica que las pruebas son una buena opción para el diagnóstico temprano de resistencia. En la tercera fase del estudio se determinó que el 5% de los aislamientos de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes presentaba también un perfil de resistencia extensiva. Los resultados se obtuvieron en 7 días luego del montaje de las pruebas. De acuerdo a los datos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y área bajo la curva, además de la rapidez en la obtención de los resultados, se puede decir que TEMA y REMA son metodologías eficaces en la detección temprana de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en *M. tuberculosis* que pueden ser fácilmente implementadas y de esta manera contribuir al diagnóstico de resistencia en el país, donde no se han implementado aún este tipo de pruebas en condiciones programáticas impactando en acortar la cadena de transmisión y controlando el punto más álgido de la enfermedad

como lo son los casos con poca probabilidad de cura. **Palabras clave.**

Tuberculosis, diagnóstico de susceptibilidad, medicamentos, multidrogorresistencia, resistencia extensiva, área bajo la curva.

**Diagnosis of multidrug resistance and extensive resistance in
Mycobacterium tuberculosis by using colorimetric methods in
Colombia.**

Abstract

Despite the outlook that represents worldwide the tuberculosis and its resistant variants, in many countries like Colombia is not yet known the percentage of resistance to second-line drugs. One of the most important topics covered in the strategies of tuberculosis control is the diagnosis of susceptibility, making necessary the research for diagnostic methods to detect resistant isolates effectively in order to prevent its spread. Some researchers in the constant search for new alternatives have proposed diagnostic techniques using fast and simple methods, among which highlights the colorimetric methods, which are considered faster and cheaper options among its class. This study demonstrated the usefulness and effectiveness of these methodologies in the diagnosis of multidrug resistance and extensive drug resistance in isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. A research work was carried out using two colorimetric methods REMA and TEMA, to determine its relevance and effectiveness in the detection of multidrug resistance and extensive drug resistance, the work was implemented in three stages which were analyzed 100 isolates of *M. tuberculosis*. We determined the test performance in terms of sensitivity, specificity, positive predictive

value, negative predictive value and area under the curve, which were obtained by ROC curve analysis using MedCalc for Windows program. In the first phase 70 colombian isolates of *M. tuberculosis* were analyzed by TEMA, 60 with a multidrug resistant profile and 10 with a sensitive profile, in the second phase 30 isolates of *M. tuberculosis* of the Institute of Tropical Medicine in Belgium were analyzed by TEMA and REMA, in the third phase we made the analysis of multidrug resistant and extensively drug resistant profile to 60 multidrugresistant isolates analyzed in the first phase. We found sensitivity rates ranging between 80 and 100% for drugs included in the trials, and areas under the curve above 0.8 indicating that the tests are a good choice for early diagnosis of resistance. In the third phase of the study we found that 5% of the isolates of *M. tuberculosis* also had an extensively drug resistance profile. The results were obtained within 7 days after the test assembly. According to data of sensitivity, specificity, predictive values and areas under the curve, as well as the speed in obtaining results, we can say that TEMA and REMA are effective methodologies in the early detection of multidrug resistance and extensive drug resistance in *M. tuberculosis* and they can be easily implemented contributing to the diagnosis of resistance in the country, where this kind of testing is not yet implemented in programmatic conditions, impacting in decreasing the chain of transmission and controlling the peak of the disease just like the cases with little chance of cure.

Keywords. Tuberculosis, diagnosis of susceptibility, drugs, multidrug resistance, extensive drug resistance, area under the curve.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEORICO	7
1.1 TRATAMIENTO DE LA TB	7
1.1.1 Medicamentos de primera línea.....	8
1.1.2 Medicamentos de Segunda Línea	11
1.2 RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS	15
1.2.1 Diagnóstico de susceptibilidad.....	17
1.2.2 Métodos fenotípicos.....	18
1.2.3 Métodos genotípicos.....	20
1.2.4 Métodos fenotípicos no convencionales	21
2. OBJETIVOS	26
2.1 GENERAL	26
2.2 ESPECÍFICOS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 PRIMERA FASE DEL ESTUDIO	28
3.1.1 Cepas.....	28
3.1.2 Aislamientos clínicos.....	28
3.1.3 Cultivo inicial	29
3.1.4 Obtención del inóculo	29
3.1.5 Medicamentos.....	30

3.1.6 Preparación del indicador de crecimiento	30
3.1.7 Montaje de las placas	31
3.1.8 Metodología	31
3.1.9 Lectura del ensayo.....	34
3.1.10 Prueba de las Proporciones múltiples.....	35
3.1.11 Preparación del inóculo.....	36
3.1.12 Montaje de la prueba de susceptibilidad.....	37
3.1.13 Lectura e interpretación de resultados	37
3.2 SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO	38
3.2.1 Aislamientos.....	38
3.2.2 Obtención del inóculo	39
3.2.3 Medicamentos.....	40
3.2.4 Preparación del indicador de crecimiento	42
3.2.5 Montaje de las placas	42
3.2.6 Metodología	43
3.2.7 Lectura del ensayo.....	44
3.3 TERCERA FASE DEL ESTUDIO	45
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
3.4.1 Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic curve).....	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1 PRIMERA FASE	50
4.1.1 Análisis de susceptibilidad a rifampicina e isoniazida	50
4.2 SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO	56
4.3 TERCERA FASE	71

5. DISCUSIÓN GENERAL	74
6. CONCLUSIONES	796
7. BIBLIOGRAFÍA	84
8. ANEXOS	97

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: concentraciones de las soluciones stock y de trabajo para cada uno de los medicamentos utilizados en los esquemas de TEMA y REMA.	42
Tabla 2: tabla de contingencia utilizada en el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de resistencia y valor predictivo de sensibilidad.	49
Tabla 3: tabla de contingencia para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de resistencia y valor predictivo de sensibilidad de TEMA respecto al análisis de rifampicina.	50
Tabla 4: Tabla de contingencia para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de resistencia y valor predictivo de sensibilidad de TEMA respecto al análisis de isoniazida.....	50
Tabla 5: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina.....	52
Tabla 6: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida.	54
Tabla 7: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida durante la segunda fase del estudio	57
Tabla 8: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina durante la segunda fase del estudio.	61

Tabla 9: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a ofloxacina.....	63
Tabla 10: tabla 10. Análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a kanamicina.	65
Tabla 11: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a amikacina.....	68
Tabla 12: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a capreomicina.....	69
Tabla 13: resultados de la tercera etapa del estudio. R: Resistente; S: sensible.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: esquema de placa utilizado para evaluar MDR en aislamientos de M. tuberculosis. RMP: rifampicina. INH: isoniazida.....	31
Figura 2: esquema de placa utilizado en TEMA y REMA para la evaluación de aislamientos MDR y XDR. RMP: rifampicin; INH: isoniazida; OFL: ofloxacina; KAN: kanamicina; AMK: amikacina; CAP: capreomicina.....	42
Figura 3: curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina.....	51
Figura 4: curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida.....	54
Figura 5: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida en la segunda fase del estudio.....	57
Figura 6: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina en la segunda fase del estudio.....	60
Figura 7: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a ofloxacina en la segunda fase del estudio.....	62
Figura 8: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a kanamicina en la segunda fase del estudio.....	65
Figura 9: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a amikacina en la segunda fase el estudio.....	67
Figura 10: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a capreomicina en la segunda fase del estudio.....	69

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: comparación de resultados obtenidos en el INS para TEMA y REMA con los obtenidos por el ITM por proporciones múltiples.....	97
ANEXO 2: comparación de resultados obtenidos por TEMA y REMA en INS con los obtenidos para REMA por el ITM en el estudio de TB MDR y TB XDR.	98
ANEXO 3: fotografías correspondientes a las placas procesadas por TEMA para la segunda fase del estudio.	99
ANEXO 4: Fotografías correspondientes a las placas procesadas por REMA para la segunda fase del estudio.	102
ANEXO 5: fotografías de las placas procesadas por TEMA para la tercera fase del estudio en que se realizó el análisis de 60 aislamientos MDR de M. tuberculosis colombianos.....	105

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infectocontagiosas con mayor morbilidad a nivel mundial. No obstante los esfuerzos realizados por las entidades de salud pública en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) para controlar la enfermedad, se observa anualmente el aumento en el número de casos, tanto así que para el año 2007 se presentaron 9,27 millones de casos nuevos de TB y 1,3 millones de muertes a causa de la enfermedad en el mundo (85). En Colombia, el total de casos reportados al Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVIGILA) desde el año 2003 al año 2006 fue de 45.142 pacientes tuberculosos (15). Sin embargo, las estimaciones de la OMS señalan que el número de casos esperados estaría alrededor de 50 por cada cien mil, lo que indica que probablemente el subregistro actual esté alrededor del 50% (50).

Con el aumento de casos de TB también se ha observado un aumento en la aparición de casos de pacientes con aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes, representando actualmente un grave problema de salud pública a nivel mundial (39), debido a que el desarrollo de estas cepas resistentes de *M. tuberculosis*, sumado al aumento de la asociación de la TB con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) hace más difícil el control de la enfermedad (10, 85).

La TB multidrogorresistente (TB MDR), definida como resistencia combinada a los medicamentos de primera línea isoniazida y rifampicina, representa un problema emergente con la aparición anual de aproximadamente 400.000 casos (84). La OMS calculó para el 2007 un estimado de 500.000 casos de TB MDR, de los cuales el 85% se encuentran concentrados en 27 países, dentro de los que se destacan la India con 131.000 casos, China con 112.000, la Federación Rusa con 43.000, Sudáfrica con 16.000 y Bangladesh con 15.000 (85). En Colombia, de acuerdo al informe realizado en el 2008 en el estudio de “Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los medicamentos, Colombia 2004-2005”, la TB MDR en casos no tratados y antes tratados fue de 2,38% y del 31,44%, respectivamente (30). Por otro lado, según los casos reportados en Colombia y publicados por la OMS, en el año 2007 se confirmaron 111 casos de TB MDR, de los cuales el 7.2% corresponden a casos antes tratados (85).

La aparición de aislamientos resistentes a los medicamentos antimicobacterianos puede ser la consecuencia de la inadecuada administración del tratamiento ya sea por irregularidad en la ingesta del mismo, mala absorción o por uso de un esquema inadecuado, de ello deriva la importancia de la estricta supervisión del mismo. En casos de aparición de resistencia a los medicamentos de primera línea como la isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida, la OMS recomienda

esquemas de tratamiento que incluyen medicamentos de segunda línea, entre ellos aminoglucósidos, cicloserina, capreomicina, fluoroquinolonas y ácido paraaminosalicílico, sin embargo el tratamiento con estos medicamentos requiere tiempo más prolongado que el tratamiento de primera línea, implica aumento de los costos y es más tóxico, por lo que generalmente la población presenta poca adherencia a este esquema. (81, 83). En casos en que el esquema de tratamiento de segunda línea no se administre de forma adecuada, es probable que aparezca la TB extensivamente drogorresistente (TB XDR), que se expresa en micobacterias que presentan un patrón de resistencia igual a MDR más resistencia a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres medicamentos inyectables (amikacina, kanamicina o capreomicina) (70, 84).

Uno de los puntos más importantes contemplados dentro de las estrategias de control de la TB es la determinación del patrón de susceptibilidad a los medicamentos antituberculosos, especialmente en los aislamientos clínicos de aquellas personas que no presentan una respuesta favorable frente al tratamiento, haciéndose necesario ejecutar planes que incluyan la implementación de metodologías diagnósticas que permitan a su vez detectar eficazmente aislamientos resistentes con el fin de evitar su diseminación. Para contribuir a la identificación de aislamientos resistentes se está realizando la búsqueda de alternativas diagnósticas más rápidas y económicas que las disponibles en la actualidad y que además permitan

determinar susceptibilidad tanto a agentes antimicobacterianos de primera como de segunda línea (62, 80).

A pesar del panorama que representa a nivel mundial la TB y sus variantes resistentes, en algunos países aún no se realiza diagnóstico de susceptibilidad a medicamentos de segunda línea. Colombia actualmente hace frente a la TB mediante las acciones realizadas por el Programa Nacional de Tuberculosis dirigido por el Ministerio de Protección Social, en el cual sólo en casos especiales se tiene acceso a pruebas de susceptibilidad a agentes antimicobacterianos de segunda línea y en general se determina la susceptibilidad a medicamentos de primera línea en los casos establecidos en la Guía de Atención de la Tuberculosis Pulmonar y Extrapulmonar del Ministerio de Protección Social (49). Es pertinente mencionar que el desconocimiento del patrón de susceptibilidad de un aislamiento clínico puede inducir la administración de esquemas de tratamiento no eficientes y posteriormente la generación de aislamientos con resistencia a los medicamentos (83).

Algunos investigadores han propuesto la implementación de técnicas rápidas y sencillas, entre las cuales se pueden destacar las metodologías colorimétricas basadas en la oxidorreducción de sales de tetrazolio, las cuales han sido previamente utilizadas para evidenciar el crecimiento del microorganismo como lo son TEMA (Tetrazolium Microplate Assay) y REMA (Rezaurin Microplate Assay), reconocidas dentro de las opciones más

rápidas y económicas entre las metodologías disponibles para el desarrollo de pruebas de susceptibilidad (67).

En este estudio se adaptaron TEMA y REMA para realizar de forma simultánea el diagnóstico de MDR y XDR de manera eficaz, obteniendo resultados confiables y en menor tiempo en comparación con la metodología de las Proporciones Múltiples que es actualmente uno de los métodos de referencia a nivel mundial. El propósito de implementar las metodologías colorimétricas en el diagnóstico de susceptibilidad en Colombia, es contribuir en la rápida detección de pacientes infectados con cepas resistentes y así mismo interrumpir la cadena de transmisión. Adicionalmente, con la implementación de estas metodologías se contribuye a la evaluación y mejoramiento de los esquemas de manejo de la TB, especialmente en la instauración del tratamiento adecuado con base en sus perfiles de resistencia.

1. MARCO TEORICO

1.1 TRATAMIENTO DE LA TB

El tratamiento contra la TB difiere del tratamiento para otras infecciones bacterianas debido a algunas particularidades del *M. tuberculosis* como por ejemplo su tiempo de generación y su capacidad de entrar en largos períodos de latencia con una actividad metabólica limitada (22, 79). Existen poblaciones de bacilos que se diferencian de acuerdo a su localización y actividad, de manera que sus condiciones de vida varían dependiendo de su localización, cuando se ubican en las cavidades pulmonares, se multiplican de forma activa, a diferencia de cuando se encuentran en el interior de macrófagos donde la disminución de pH y del oxígeno inducen su estado de latencia; o si se encuentran dentro del foco de necrosis, tienen ocasionalmente un ciclo replicativo (31). Estas condiciones hacen necesario que el tratamiento prescrito sea activo frente a todos los estados en que pueda estar el bacilo en determinado momento de la infección (31). Por otro lado, los bacilos tuberculosos poseen una pared compleja, hidrófoba, con permeabilidad reducida, esto implica que el tratamiento utilizado para combatir la TB debe tener componentes que actúen contra diversos blancos y que afecten la viabilidad y crecimiento del microorganismo (23, 63).

El tratamiento efectivo de la TB se basa en la aplicación de un esquema acortado estrictamente supervisado que asegura una alta tasa de curación en casos de pacientes infectados con aislamientos sensibles. El hecho de

que el tratamiento en un paciente sea o no efectivo está basado en la combinación de fármacos que no hayan sido empleados en dicho paciente, además de un manejo correcto del esquema de tratamiento y la adecuada administración de cada uno de los medicamentos (22).

La isoniazida, rifampicina, estreptomycin, el etambutol y la pirazinamida están contemplados actualmente dentro del grupo de los medicamentos de primera línea por la eficacia en su actividad bactericida o bacteriostática, y por tener menos efectos adversos que otros medicamentos antimicobacterianos, a diferencia de los fármacos de segunda línea, siendo los principales grupos los aminoglucósidos, polipéptidos, fluoroquinolonas, etionamida, cicloserina y ácido para-aminosalicílico (18).

1.1.1 Medicamentos de primera línea

Isoniazida

Fármaco sintético de administración oral que actúa como bactericida contra bacilos metabólicamente activos y como bacteriostático contra los inactivos (22). Requiere de la catalasa peroxidasa bacteriana para ser activado; una vez esto sucede, se produce la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos, componentes esenciales de la pared celular de la micobacteria haciéndolo efectivo contra *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. kansasii* (21). Los aislamientos susceptibles de *M. tuberculosis* muestran una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre 0.02 y 0.2 mg/L. La

isoniazida es en general bien tolerada a dosis recomendadas, sin embargo a altas concentraciones puede producir efectos adversos a nivel hepático, neurológico y hematológico, además de reacciones de hipersensibilidad (60).

Rifampicina

Antimicrobiano semisintético de administración oral, activo “*in vitro*” contra un amplio grupo de microorganismos, incluida Chlamydia y las micobacterias. En estas últimas actúa como bactericida tanto en las que se encuentran en fase de multiplicación como en las metabólicamente inactivas inhibiendo la transcripción genética, por interacción con la subunidad β de la enzima RNA polimerasa de la bacteria (22, 24, 38). Los aislamientos de *M. tuberculosis* susceptibles presentan una CMI de 0.1-2 mg/L (62). La rifampicina es bien tolerada pero puede provocar efectos adversos durante terapias intermitentes o cuando se restablece un tratamiento interrumpido. Dichos efectos pueden ser alteraciones a nivel gastrointestinal, del riñón, sistema nervioso y en la piel. También puede presentarse trombocitopenia y un aumento en los niveles de la fosfatasa alcalina (38).

Pirazinamida

Medicamento de administración oral que actúa como bactericida únicamente contra *M. tuberculosis* (no se ha observado actividad “*in vitro*” contra otros microorganismos). Este medicamento requiere de la acción de las pirazinamidasa presentes en las micobacterias para activarse, luego de

esto se produce una acumulación de ácido en el citoplasma afectando el potencial de membrana, que ocasiona la muerte del microorganismo (86). Los aislamientos susceptibles a pirazinamida presentan CMI de 20 mg/L a pH 5.6, cuando el pH es neutro, el medicamento se inactiva. Este medicamento actúa contra bacilos persistentes y contra los inactivos, incluso contra aquellos que se encuentran ubicados intracelularmente (32). La pirazinamida puede ser hepatotóxica y puede producir hiperuricemia que evoluciona a gota (62).

Etambutol

Es un compuesto sintético de administración oral, que actúa como bacteriostático y se usa en el tratamiento contra *M. tuberculosis* en fase de multiplicación, y contra algunas micobacterias no tuberculosas tales como *M. kansasii*. Su acción se basa principalmente en impedir o afectar la biosíntesis de la pared celular, contribuyendo a que la micobacteria sea más susceptible a los otros medicamentos antituberculosos (22). La CMI para aislamientos sensibles de *M. tuberculosis* va de 0.5 a 8 mg/L. Dentro de los efectos adversos de este medicamento se encuentran problemas a nivel visual (80).

Estreptomycin

Es un aminoglucósido de administración parenteral producido por algunas cepas de *Streptomyces griseus*, que actúa contra microorganismos gram negativos y contra micobacterias. Interfiere en la síntesis proteica

bloqueando la traducción del ARNm tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica (22). Presenta una CMI de 1 - 8 mg/L (62). Las reacciones adversas a la estreptomicina se pueden clasificar como alérgicas y tóxicas, no sólo a nivel hepático, sino también a nivel gastrointestinal, neurológico y renal (72).

1.1.2 Medicamentos de Segunda Línea

Acido Paraaminosalicílico

Compuesto que se administra por vía oral. Es un agente bacteriostático que actúa como antagonista en la síntesis de folatos de las micobacterias, especialmente en *M. tuberculosis*. Inhibe el crecimiento de las micobacterias con una CMI de 1mg/L (22, 36). Es bien asimilado a nivel gastrointestinal, sin embargo su distribución es pobre en el fluido cerebroespinal, lo cual implica una desventaja para el tratamiento de la TB meníngea. El ácido paraminosalicílico puede producir efectos adversos a nivel gastrointestinal como náuseas, vómito, diarrea y reacciones de hipersensibilidad (22)

Capreomicina

Polipéptido de administración parenteral, que actúa como bacteriostático contra algunas micobacterias incluyendo *M. tuberculosis*; los aislamientos susceptibles son inhibidos por 10 mg/L de capreomicina (78). Las dosis de 1000 mg usualmente deben ser administradas con precaución en pacientes con disfunción renal, hepática o auditiva. Comúnmente, la capreomicina

afecta la frecuencia de la micción y la cantidad de orina, incrementa la sensación de sed y puede producir pérdida del apetito, náuseas y vómito. Debido a sus efectos tóxicos, no debe administrarse en combinación con kanamicina o estreptomina (78).

Cicloserina

Es un antibiótico de amplio espectro administrado por vía oral, el cual actúa como bacteriostático inhibiendo varios microorganismos, entre ellos a *M. tuberculosis*. Las CMI para *M. tuberculosis* oscilan entre 5 y 20 mg/L (22). Se administra en dosis de 500 mg a 1000 mg de medicamento en dosis divididas dos veces al día (62). Puede producir una gran cantidad de efectos adversos que comprometen el sistema nervioso central y está contraindicado en pacientes con epilepsia, depresión o ansiedad. También se puede presentar hipersensibilidad a nivel de piel (22).

Aminoglicósidos

La amikacina y la kanamicina son aminoglicósidos que se administran por vía intramuscular, los cuales actúan como bactericidas contra un amplio rango de microorganismos incluyendo a *M. tuberculosis* (66). La amikacina es el antibiótico más potente de los aminoglicósidos, tanto *in vitro*, como en el modelo animal, con una CMI frente a *M. tuberculosis* de 1 µg/ml (22). Al igual que la estreptomina, la amikacina y la kanamicina deben ser administradas usualmente en dosis de 0.5-1 g. Aunque son considerados

medicamentos antituberculosos, es preferible utilizar otros medicamentos menos tóxicos. Al igual que la mayoría de los aminoglicósidos, afectan la función auditiva, también son nefrotóxicos y pueden producir algunos efectos a nivel gastrointestinal (66).

Tioamidas

Son medicamentos de administración oral que actúan como bactericidas contra *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M.kansasii*, y algunos aislamientos del complejo *M. avium* (36). Dentro de la familia de las tioamidas utilizadas en el tratamiento contra la TB se encuentran la etionamida y la protionamida (8). Los aislamientos clínicos susceptibles de *M. tuberculosis* son inhibidos por 0.6 - 2.5 mg/L de etionamida (36). Para el tratamiento de TB, se administran dosis de 15 - 20 mg/kg de peso. Los efectos adversos están relacionados con desórdenes a nivel gastrointestinal, también causa algunas reacciones a nivel mental como depresión, ansiedad, psicosis, mareo, adormecimiento y dolor de cabeza (66).

Fluoroquinolonas

La ciprofloxacina y la ofloxacina se administran por vía oral. Son agentes bactericidas débiles de la familia de las fluoroquinolonas que actúan contra varios microorganismos dentro de los cuales están el *M. tuberculosis* y algunas micobacterias no tuberculosas (22, 26). Las fluoroquinolonas son la única clase de agentes antimicrobianos de uso clínico que actúan como

inhibidores directos de la síntesis de ADN bacteriano (26). La CMI de ciprofloxacina frente a *M. tuberculosis* oscila entre 0,25 y 3 g/ml y la de ofloxacina entre 0,5 y 2,5 g/ml, habiéndose sugerido 2 g/ml como punto de corte para la sensibilidad (36). Estos medicamentos son bien tolerados; los efectos adversos incluyen desórdenes del tracto gastrointestinal, sistema nervioso e hipersensibilidad. El uso de las fluoroquinolonas no es recomendado en niños o mujeres embarazadas (66).

Rifamicinas

Los miembros de esta familia son administrados por vía oral. La rifabutina y la rifapentina son análogos de la rifampicina por lo tanto comparten su actividad bactericida, y debido a sus características similares presentan también resistencia cruzada (66). La rifabutina puede ser utilizada para el tratamiento de TB a dosis de 150 - 450 mg diarios. En contraste con la rifampicina, la rifabutina es mal absorbida por el tracto gastrointestinal y produce artritis a dosis por encima de 1 g diario; además reduce la concentración plasmática de muchos medicamentos antirretrovirales (74). La rifapentina tiene una acción prolongada, por lo tanto puede ser administrada por vía oral a dosis de 600 mg dos veces por semana o incluso una sola vez durante la fase inicial del tratamiento. Los efectos adversos de la rifapentina son similares a los de rifampicina, excepto por la hiperuricemia. Este medicamento no ha sido aprobado para ser usado en niños y no se

recomienda en pacientes infectados con el VIH por el riesgo de desarrollar resistencia a las rifamicinas en general (4).

Tiacetazona

Este medicamento de administración oral actúa como bacteriostático del *M. tuberculosis*, inhibiendo los aislamientos clínicos susceptibles con una CMI de 1 mg/L. Puede ocurrir resistencia cruzada con tioamidas. La tiacetazona puede ser utilizada en el tratamiento contra la TB, sin embargo no es tan efectiva como los medicamentos de primera línea. Dentro de los efectos adversos se encuentran desórdenes gastrointestinales y reacciones de hipersensibilidad, frecuentes en pacientes VIH (19). Otros efectos adversos incluyen conjuntivitis, vértigo, necrosis epidérmica tóxica, dermatitis exfoliativa, anemia hemolítica y hepatotoxicidad con ictericia. En algunos países de bajos recursos este medicamento es utilizado por su bajo costo (66).

1.2 RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS

En TB se habla de resistencia cuando al menos un medicamento de actividad antimicobacteriana, no afecta la viabilidad de los microorganismos; los pacientes infectados con bacilos de esta clase presentan baja respuesta al tratamiento y se convierten en fuentes potenciales de infección que contribuyen a la diseminación de la resistencia, provocando además la aparición de variantes de la enfermedad en las que se requiere la

administración de medicamentos más tóxicos y un aumento representativo del tiempo de tratamiento comparado con el requerido normalmente para un paciente infectado con un microorganismo susceptible (87). La resistencia a los agentes antituberculosos se presenta por la aparición de mutaciones en el genoma del microorganismo producidas generalmente por exposición previa a algún fármaco, aunque también pueden surgir como rearrreglos en regiones restringidas del genoma del microorganismo que se dan de forma intrínseca independientemente de si se ha presentado o no contacto con algún tipo de medicamento; este tipo de mutaciones generalmente conllevan a la aparición de resistencia del microorganismo a un sólo medicamento (56, 69).

La posibilidad que *M. tuberculosis* desarrolle resistencia espontánea a dos agentes no relacionados es el producto de la suma de probabilidades; por ejemplo, para que se presente una resistencia combinada a isoniazida y rifampicina existe una probabilidad de 1 en $10^6 + 1$ en 10^8 , esto es igual a una probabilidad de 1 en 10^{14} (41). Debido a que el número total de bacilos posibles en el paciente, incluso en casos avanzados de enfermedad cavitaria, raramente alcanza este número (10^{14}), la evolución espontánea de bacilos resistentes a dos medicamentos es muy rara, razón por la cual se adjudica este tipo de resistencia a la previa exposición a los medicamentos (41).

Existen actualmente varios tipos de resistencia dentro de los que se destacan la TB MDR y la TB XDR. Existe una gran preocupación por la posible expansión de los aislamientos resistentes haciéndose imperante la necesidad de implementar medidas de control adicionales a las existentes, como nuevos métodos diagnósticos, nuevos medicamentos y vacunas más efectivas (62, 87). Lo anterior implica la toma de medidas de carácter urgente para identificar los pacientes que no están respondiendo al tratamiento y así evitar la diseminación de aislamientos clínicos resistentes, mediante el diagnóstico temprano de TB y la rápida detección de la resistencia a los medicamentos (28, 83).

1.2.1 Diagnóstico de susceptibilidad

Se han utilizado varios métodos para evaluar la susceptibilidad a los medicamentos entre los cuales se destaca el uso de técnicas fenotípicas basadas principalmente en la evidencia de crecimiento del microorganismo, como lo son el método de las proporciones múltiples y el BACTEC MIGHT 960, consideradas como metodologías de referencia a nivel mundial (12, 13, 37, 52, 66, 73, 75). Por otra parte se encuentran los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR, llamados métodos genotípicos como los microarreglos de ADN, métodos de hibridación en fase sólida y *rifoligotyping* (61). Algunas de las anteriores metodologías manejan altos porcentajes de sensibilidad y especificidad, sin embargo existen inconvenientes tales como tiempo de emisión de resultados, costos y

complejidad en las técnicas, que hacen que todas estas propuestas no hayan podido suplantar al método de las proporciones múltiples, principalmente en países de bajos recursos en donde las pruebas de susceptibilidad a los medicamentos se basan en métodos convencionales de cultivo en medio sólido.

Recientemente se han propuesto las metodologías colorimétricas como opciones de diagnóstico de susceptibilidad a medicamentos antimicobacterianos. Estas metodologías aparecen como soluciones potenciales a los inconvenientes de costo y complejidad que presentan otros métodos, además disminuyen el tiempo de emisión de resultados, principal desventaja de los métodos fenotípicos de referencia. Estos métodos usan indicadores fácilmente reducibles como las sales de tetrazolio y presentan resultados de 7 a 9 días (1, 60).

1.2.2 Métodos fenotípicos

Consisten en cultivar aislamientos de *M. tuberculosis* obtenidos de muestras clínicas en medios de cultivo a base de huevo o agar con antibióticos, los cuales son utilizados para la determinación de forma directa o indirecta del crecimiento del microorganismo en presencia de medicamentos antituberculosos (34, 62). Existen tres métodos fenotípicos convencionales: el método de las proporciones múltiples, el cociente de resistencia y las concentraciones absolutas; algunos métodos más recientes

están basados en el cultivo en medio líquido como el método radiométrico BACTEC y el tubo indicador de crecimiento (64, 65).

Recientemente se ha implementado una adaptación del BACTEC llamado BACTEC MGIT960, el cual se basa en el principio del consumo de oxígeno y la señal de fluorescencia emitida como producto de esta reacción, lo cual es detectado y controlado desde el interior del equipo (6). Actualmente, el BACTEC MGIT960 y el método de las proporciones múltiples, son consideradas como “Pruebas de Oro o *Gold Standard*” para el diagnóstico de susceptibilidad a medicamentos de primera y segunda línea (66, 75).

Método de las Proporciones Múltiples

Se basa en la determinación del número de mutantes resistentes a un medicamento observando la relación entre el número de bacilos que crecen en medio sólido con antibiótico y el número de bacilos que crecen en medio libre o sin antibiótico. La técnica se realiza en medio sólido para evaluar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a medicamentos de primera y segunda línea (12, 13, 34, 82).

La prueba se efectúa realizando inóculos con suspensiones bacilares que van de una concentración de 10^{-3} mg/ml a 10^{-5} mg/ml, los cuales son sembrados en tubos con y sin medicamento, siendo estos últimos los controles de la prueba. La concentración de los antimicobacterianos utilizados en esta metodología es la mínima capaz de inhibir el crecimiento

de una cepa de *M. tuberculosis*; esta concentración varía para cada medicamento siendo para isoniazida de 0.2µg/ml, rifampicina 40µg/ml, estreptomina 4µg/ml y etambutol 2µg/ml. Al final del periodo de incubación (3 a 4 semanas), una de las diluciones realizadas debe producir un número de colonias que se pueda contar, a partir de las cuales se calcula la proporción de mutantes resistentes (12). El método normalmente utiliza como medio de cultivo el Löwenstein Jensen (LJ). La primera lectura de la prueba se realiza a los 28 días de incubación a 37°C. Si la proporción de bacterias resistentes es más alta de 1 % para la isoniazida, rifampicina, estreptomina y ácido paraminosalicílico, o del 10% para los otros medicamentos antituberculosos, el aislamiento se considera resistente, de lo contrario la prueba se lee nuevamente a los 42 días de incubación (27). Si el método se realiza en agar Middlebrook 7H10/11, este se incuba en atmósfera de 10% de CO₂, los resultados se interpretan luego de 21 días o antes si hay señal de crecimiento lo que indica resistencia del microorganismo ante el medicamento probado (27).

1.2.3 Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos para la evaluación de la resistencia a los medicamentos del *M. tuberculosis* son opciones de diagnóstico que buscan los determinantes genéticos de resistencia. El desarrollo de estos métodos implica dos pasos básicos: amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los segmentos conocidos del

genoma de *M. tuberculosis*; y la determinación de mutaciones específicas en los productos amplificados, correlacionándolas con la resistencia a los medicamentos (61, 76).

Estas metodologías tienen como ventaja frente a los métodos fenotípicos que no requieren del crecimiento previo del microorganismo, por lo tanto se pueden obtener resultados en 24 a 48 horas. Dentro de estas metodologías se destacan la secuenciación de ADN, los métodos de hibridación en membrana, PCR en tiempo real, microarreglos de ADN. Su principal desventaja es la complejidad y el aumento de costos que implicaría su aplicación sólo a nivel de laboratorios de referencia en países en vía de desarrollo (62).

1.2.4 Métodos fenotípicos no convencionales

Son técnicas que constan de gran variedad de estrategias con principios prácticos y económicos, que en los últimos años han logrado posicionarse como posibles alternativas diagnósticas frente a las metodologías convencionales. Algunos de los métodos fenotípicos no convencionales diseñados para la realización de pruebas de susceptibilidad a los medicamentos utilizados en el tratamiento contra el *M. tuberculosis* son:

E-Test: consiste en el uso de tiras impregnadas con diferentes concentraciones de los medicamentos que se ponen sobre placas de agar

Middlebrook 7H10, previamente inoculado e incubado con el aislamiento de interés (25, 33).

Métodos basados en fagos: se fundamenta en la habilidad de *M. tuberculosis* de albergar un micobacteriófago infectante y de permitirle replicarse. El número de fagos endógenos viables, representa el número original de bacilos de *M. tuberculosis*, que luego es determinado en micobacterias de rápido crecimiento como *M. smegmatis* (3, 58).

Métodos colorimétricos: basados en reacciones colorimétricas, estos métodos utilizan sales de tetrazolio como indicadores de oxido-reducción para evidenciar el crecimiento de las micobacterias (62). La resistencia a los medicamentos es detectada directamente por un cambio en el color del indicador añadido al cultivo después del proceso de incubación, el cual es directamente proporcional al número de micobacterias viables en el medio (53). Entre los métodos colorimétricos más usados se encuentran REMA, TEMA y la versión en microplaca del alamar azul (MABA), los cuales se diferencian básicamente en el tipo de indicador que son sales de alamar azul en el caso REMA y MABA, y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-i)-2,5-difeniltetrazolio o MTT en el caso de TEMA (17, 59, 60, 80).

TEMA: Basada en la oxido-reducción del MTT, compuesto de color amarillo que cuando es reducido por células metabólicamente activas, produce cristales insolubles de formazán de color púrpura que pueden ser medidos

por espectrofotometría o simplemente por el cambio de color que permite la observación de la reducción del compuesto. El MTT fue introducido en el año 1983 en trabajos de proliferación celular y posteriormente fue utilizado para experimentos de viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (55).

Recientemente el MTT ha sido propuesto por Abate y Mshana para la detección rápida de la resistencia a rifampicina, obteniéndose resultados en tan sólo 7 a 9 días empleando TEMA (1).

Con el propósito de mejorar la detección de la resistencia a los medicamentos, se ha aplicado TEMA a muestras clínicas en la realización de ensayos directos sobre muestras de esputo para la detección de la resistencia a rifampicina con sensibilidades y especificidades que oscilan entre el 90% y 100% (80). En los últimos años se han realizado estudios donde se utiliza esta técnica para la detección de resistencia a casi la totalidad de los medicamentos antituberculosos en las cuales se ha visto una alta correlación con el método de las proporciones múltiples (53, 54, 68). Esta es una metodología fácil de implementar, rápida y económica, lo que la posiciona como candidata para la detección de MDR y XDR, especialmente en países con bajos recursos económicos (68).

REMA: Metodología de óxido-reducción que utiliza el resazurín como indicador. La prueba al igual que en TEMA, se basa en el incremento de las

tasas de NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN y NADH/NAD durante la proliferación de los bacilos. Compuestos como el MTT, alamar azul y en este caso el resazurín, son reducidos por dichos metabolitos permitiendo la observación de la viabilidad del microorganismo mediante el cambio de color que para el resazurín en estado oxidado es azul y en estado reducido es rosado (11, 44, 57).

La correlación de este método con el de las proporciones múltiples presenta sensibilidad del 100% y especificidad de más del 90% en pruebas para rifampicina e isoniazida (53, 60, 71). En pruebas realizadas con medicamentos de segunda línea, se han obtenido especificidades del 100% y sensibilidades entre 85 y 95% (45, 60). Esta prueba ha mostrado ser útil en la detección de la resistencia a medicamentos de primera y segunda línea, sin embargo, pese a su aparente sencillez en la lectura visual de los resultados, se ha reportado que se presenta cierta dificultad y confusión en la interpretación de estos (45).

Método de la nitrato reductasa: se basa en la capacidad que tienen las micobacterias de reducir nitratos a nitritos; esto se puede constatar mediante la adición de reactivos específicos que evidencian la aparición de un cambio de color en el medio de cultivo (5, 62). La prueba se realiza en medio LJ con nitrato de potasio y fármacos antimicobacterianos; en estos medios se inocula la solución bacilar a escala 1 de Mc Farland. Simultáneamente se inoculan otros tubos con medio de cultivo sin antibiótico con una dilución 1:10

de la solución anterior, los cuales serán utilizados como control de crecimiento. De acuerdo al fundamento de la prueba se dice que un aislamiento de *M. tuberculosis* es resistente cuando el color que aparece en el medio de los tubos con medicamento, es más intenso que el que aparece en los tubos control (5, 40).

Observación microscópica: existen actualmente tres técnicas que permiten evidenciar rápidamente el crecimiento de la micobacteria, la observación microscópica de susceptibilidad a medicamentos o MODS (microscopic-observation drug-susceptibility), la cual es visualizada microscópicamente con el uso de un microscopio invertido (16). Por otro lado están el método de agar en capa delgada y el método de agar HSTB (Heifets y Sanchez *et al*), que utilizan medios de cultivo sólidos especiales y transparentes que permiten visualizar de forma temprana el crecimiento del microorganismo con la ayuda de un microscopio convencional (35, 47).

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- Adaptar metodologías colorimétricas en Colombia para realizar el diagnóstico simultáneo de multidrogorresistencia y resistencia extensiva en *M. tuberculosis*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Evaluar la eficiencia de TEMA en la determinación de susceptibilidad de aislamientos de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes frente al método de las proporciones múltiples, en términos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y área bajo la curva.
- Realizar la comparación entre TEMA y REMA con el fin de evaluar las ventajas y desventajas de cada metodología y determinar la eficacia de cada protocolo en la evaluación de multidrogorresistencia y resistencia extensiva.
- Determinar el patrón de susceptibilidad por TEMA de 60 aislamientos clínicos colombianos multidrogorresistentes de *M. tuberculosis* frente a agentes antimicobacterianos de primera y segunda línea utilizando proporciones múltiples como método de referencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en tres fases que permitieron evaluar y adaptar el protocolo de dos metodologías colorimétricas para la evaluación de MDR y XDR en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. En la primera fase se elaboró y evaluó un esquema de placa que permitió el análisis de los dos medicamentos de primera línea contemplados en el concepto de MDR mediante TEMA. En la segunda fase se realizaron ensayos de susceptibilidad a medicamentos de primera y segunda línea de aislamientos de *M. tuberculosis* con un patrón definido de susceptibilidad, en un estudio ciego mediante el uso de REMA y TEMA. En la última fase del estudio se realizó el análisis de aislamientos colombianos MDR mediante la metodología de TEMA con el objetivo de realizar entre ellos la búsqueda de XDR y determinar su prevalencia en la muestra analizada.

Para determinar en una sola prueba la susceptibilidad de un aislamiento de *M. tuberculosis* se diseñó un esquema de distribución de aprovechamiento de la placa que permitiera evaluar los medicamentos empleados en el concepto MDR (isoniazida y rifampicina) y XDR (ofloxacina, kanamicina, amikacina, capreomicina)

3.1 PRIMERA FASE DEL ESTUDIO

Se basó en el concepto de TB MDR, evaluando TEMA en términos de sensibilidad y especificidad en la determinación de susceptibilidad a rifampicina e isoniazida. De las metodologías colorimétricas disponibles se escogió TEMA para esta fase del trabajo, debido a que previamente fue estandarizada en el laboratorio del grupo de Micobacterias por Porras *et al* en el año 2005 para medicamentos de primera línea. Para el desarrollo de esta fase se utilizaron 3 cepas de referencia, 10 cepas de *M. tuberculosis* sensibles a medicamentos de primera línea y 60 aislamientos de *M. tuberculosis* MDR. Los datos de cada aislamiento fueron consultados en la base de datos del cepario del INS al concluir la primera fase con el propósito de evaluar la eficiencia de TEMA frente al método de referencia.

3.1.1 Cepas

Las cepas empleadas para el control de calidad de los procedimientos fueron cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (sensible), H37Rv ATCC 35822 (resistente a isoniazida) y H37Rv ATCC 35838 (resistente a rifampicina).

3.1.2 Aislamientos clínicos

Se incluyeron en el estudio 70 aislamientos de *M. tuberculosis*, 60 MDR y 10 sensibles. Los aislamientos procesados pertenecen a la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis* realizada por la Red Nacional de Laboratorios (RNL) en Colombia. El patrón de susceptibilidad a medicamentos de primera

línea de cada aislamiento fue previamente determinado por la RNL mediante el método de las proporciones múltiples.

3.1.3 Cultivo inicial

Cada una de las cepas y aislamientos fueron sembrados en medio LJ por 2 semanas. A partir del crecimiento obtenido de cultivos con crecimiento masivo, se tomó por raspado toda la masa bacilar de la superficie del medio y se diluyó en 2000 µl de agua destilada en un frasco de perlas. De la solución obtenida luego de homogenizar el contenido del frasco, se tomaron 200 µl y se sembraron en medio LJ nuevamente. Los cultivos se incubaron a 37°C por 15 días.

3.1.4 Obtención del inóculo

Terminado el tiempo de incubación se tomó por raspado todo el contenido de la superficie del medio y se homogenizó con agua destilada en frasco de perlas, de allí se tomaron 200 µl y se adicionaron a 4000 µl de agua destilada estéril para obtener una solución de turbidez 1 en la escala de McFarland (10^6 – 10^7 unidades formadoras de colonia aproximadamente). Se debe mencionar que algunos aislamientos presentan un mejor crecimiento que otros, por lo tanto en los casos que se obtuvo una solución por encima de la escala 1 de McFarland, fue necesario ajustarla adicionando agua destilada a los 4,2 ml de solución bacilar hasta obtener la turbidez requerida. El inóculo utilizado en el montaje de las placas se preparó tomando 150 µl de la solución bacilar a escala 1 de Mc Farland, y se adicionó a 2850 µl de

medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (Acido oleico, Albúmina, Dextrosa, Catalasa) al 10%, para obtener finalmente una dilución del inóculo de 1:25.

3.1.5 Medicamentos

Se emplearon los dos medicamentos de la definición de MDR: rifampicina (R3501) e isoniazida (I3377). La preparación de la solución de almacenamiento de isoniazida se realizó a una concentración de 1mg/ml en agua destilada estéril. La rifampicina, por su naturaleza hidrofóbica fue preparada en dimetilsulfóxido a una concentración de 10mg/ml para su almacenamiento. Posterior a su preparación los medicamentos fueron esterilizados con filtros de 0,22 μ m y dispensados en viales de 2ml de capacidad para su almacenamiento a -20°C por un tiempo no mayor a 30 días. Las concentraciones evaluadas para cada medicamento fueron las siguientes:

- Isoniazida: 1 – 0,5 – 0,25 – 0,13 – 0,063 – 0,031 μ g/ml
- Rifampicina: 2 – 1 - 0,5 – 0,25 – 0,13 – 0,063 μ g/ml.

3.1.6 Preparación del indicador de crecimiento

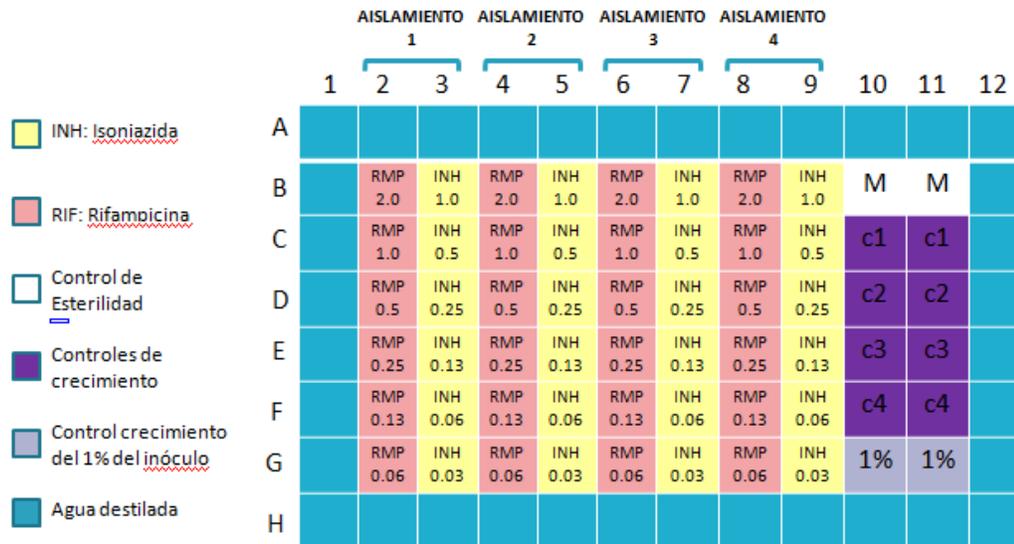
Como indicador de crecimiento se utilizó MTT, que fue preparado en agua destilada a una concentración de 5mg/ml. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C. La solución de MTT es estable por largos periodos de tiempo si se encuentra bien sellada y protegida de la luz, sin

embargo si llega a presentar alguna variación en su color amarillo original es conveniente descartar la solución.

3.1.7 Montaje de las placas

La distribución de la placa fue la siguiente:

Figura 1: esquema de placa utilizado para evaluar MDR en aislamientos de *M. tuberculosis*. RMP: rifampicina. INH: isoniazida



3.1.8 Metodología

Paso 1

En la figura 1 se muestra la distribución de la placa de 96 pozos donde se ilustra el contenido de cada pozo. Los pozos de la periferia que aparecen en azul claro corresponden a los pozos que contienen 200µl de agua destilada estéril para evitar la evaporación de los pozos del interior de la placa.

Paso 2

Se adicionaron 100µl de rifampicina a los pozos B2, B4, B6 y B8. Posteriormente se adicionaron 100µl de isoniazida a los pozos B3, B5, B7 y B9 como se ilustra en la figura 1. Para el desarrollo de cada uno de los ensayos se utilizaron todos los pozos de la placa exceptuando los de la periferia y los pozos B-10 y B-11, que corresponden a los controles de esterilidad del medio, y a los pozos G-10 y G-11 que son utilizados como controles del 1% de crecimiento del microorganismo.

Paso 3

Se adicionaron 100µl de medio de cultivo a cada uno de los pozos comprendidos entre las filas B a la G y las columnas 2 a la 9, además de los pozos C10, C11, D10, D11, E10, E11, F10 y F11. Luego se adicionaron 200 µl de medio de cultivo a los pozos B10 y B11 que son los pozos correspondientes a los controles negativos y a su vez a los controles de esterilidad del medio de cultivo.

Paso 4

Se realizaron diluciones seriadas 1:2 de cada uno de los pozos con medicamento desde la fila B hasta la fila G, descartando los 100µl producto de la última dilución.

Paso 5

Se inoculó el aislamiento 1 en los pozos correspondientes a las columnas 2 y 3, el aislamiento 2 en los pozos de las columnas 4 y 5, el aislamiento 3 en las columnas 6 y 7, y el aislamiento 4 en las columnas 8 y 9. Es preciso aclarar que se realizó el inóculo de cada aislamiento sólo en los pozos que contenían las diferentes diluciones de medicamentos.

Paso 6

Los pozos que se muestran en el esquema como C-10, C-11, D-10, D-11, E-10, E-11, F-10 y F-11 son los pozos correspondientes a los controles de crecimiento del inóculo micobacteriano, los cuales llevaron un volumen total de 200µl, 100µl de medio y 100µl de inóculo micobacteriano. Cada uno de los aislamientos evaluados en la placa tuvo dos controles de crecimiento, distribuidos de manera que el aislamiento I tendría sus controles en los pozos C-10 y C-11, el aislamiento II en los pozos D-10 y D-11, el aislamiento III en los pozos E-10 y E-11, y el aislamiento VI en los pozos F-10 y F-11. Estos pozos deben incluirse en cada uno de los ensayos realizados principalmente por dos razones: 1) permite evidenciar si los aislamientos que se están evaluando son viables, y 2) indican el momento justo en que debe ser revelada la placa luego de cumplirse el tiempo determinado para la incubación de las placas.

Paso 7

El control de crecimiento del 1% es una dilución 1:100 del inóculo de trabajo (escala 1 de McFarland), que muestra un cambio de color del indicador cuando hay crecimiento del 1% del inóculo. Este control se realizó tomando 200 µl de la dilución 1:100 del inóculo de la cepa H37Rv utilizada como cepa control y se adicionó a los pozos G10 y G11.

Paso 8

Se sellaron las placas en su empaque original, se almacenaron dentro de una cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 5 días.

3.1.9 Lectura del ensayo

El revelado y lectura de las placas se realizó de la siguiente manera:

Paso 1

Cumplidos 5 días de incubación de las placas, se reveló el primer pozo de control de crecimiento. Se adicionaron 10µl de MTT mezclados con 12µl de Tween 80 al 20%. Las placas fueron incubadas nuevamente por 24 horas a 37°C.

Paso 2

Después de 24 horas de incubación se evidenció que en los pozos de control de crecimiento hubo viraje del indicador (MTT) de amarillo a púrpura, se

reveló la placa en su totalidad de la misma forma como se reveló el pozo control. En los casos en los que no se observó cambio de color en el primer control de crecimiento se reveló el segundo pozo y se incubó nuevamente por una noche.

Lectura de la prueba: los resultados fueron interpretados de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Se consideró un aislamiento sensible cuando no se observó cambio de color de amarillo a púrpura en los pozos que contenían el inóculo. Este resultado indica que la concentración del medicamento que se encuentra en el pozo que no cambió de color es capaz de inhibir el crecimiento del bacilo tuberculoso.
- Se consideró un aislamiento resistente cuando se observó cambio de color del medio amarillo a color púrpura. Esto indica que la concentración del medicamento evaluado es incapaz de inhibir el crecimiento del bacilo.

3.1.10 Prueba de las Proporciones múltiples

Los 70 aislamientos objeto de este estudio pertenecen al cepario del Grupo de Micobacterias del INS. Estos aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente mediante el método de las proporciones múltiples para la vigilancia de la resistencia realizada por la RNL. Para este estudio se tuvieron en cuenta los datos de susceptibilidad a rifampicina e isoniazida.

A continuación se describe con fines de documentación de la metodología el proceso realizado por la RNL para la obtención de los datos de susceptibilidad por proporciones múltiples:

El proceso inició con la preparación de medio LJ (29). El volumen total del medio dispensado en cada tubo fue de 8ml incluyendo el volumen de antibiótico. El medio fue coagulado durante 50 minutos a $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las concentraciones de antibiótico utilizadas para la preparación de los medios fueron:

- Isoniazida: $0.2\mu\text{g/ml}$
- Estreptomina: $4\mu\text{g/ml}$
- Etambutol: $2\mu\text{g/ml}$
- Rifampicina: $40\mu\text{g/ml}$

3.1.11 Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo bacteriano a partir de cultivos con 15 días de crecimiento. Se transfirieron 200 μl de inóculo a un tubo seco y se llevaron con agua destilada estéril a una concentración de 1 mg/ml, equivalente a la turbidez número 3 de la escala de McFarland. A partir de la solución anterior se realizaron 6 diluciones seriadas con base 10.

3.1.12 Montaje de la prueba de susceptibilidad

De las 6 diluciones anteriormente preparadas, se tomaron las correspondientes a: 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} mg/ml. Estas concentraciones bacilares permiten calcular la proporción bacilar presente en los medios con los diferentes antibióticos garantizando la obtención del 1% de bacilos naturalmente resistentes.

Para evaluar la susceptibilidad, en cada uno de los tubos con antibiótico se dispensaron 200 μ l de las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} mg/ml de cada aislamiento. De acuerdo al protocolo de esta técnica se deben procesar controles para garantizar el crecimiento del aislamiento, de manera que por cada dilución de las anteriores se inocularon dos tubos de medio sin antibiótico. Todos los tubos fueron almacenados a 37° durante 6 semanas y las lecturas se realizaron a los 28 y 42 días de incubación.

3.1.13 Lectura e interpretación de resultados

La proporción de bacterias resistentes a determinado fármaco, es el producto de la razón entre el número de unidades formadoras de colonia presentes en el tubo con antibiótico y las presentes en el tubo control de la misma dilución. Cuando el resultado de esta operación es superior o igual al 1%, se considera al aislamiento como resistente.

3.2 SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO

Durante este periodo de trabajo se evaluó la eficiencia de dos metodologías colorimétricas en la determinación de susceptibilidad a los medicamentos de primera y segunda línea contemplados dentro de los conceptos de TB MDR y TB XDR. Para llevar a cabo este objetivo se analizaron aislamientos de *M. tuberculosis* en un estudio a ciegas mediante dos metodologías: REMA y TEMA. A cada uno de los procedimientos se le realizaron 3 réplicas.

El protocolo que se desarrolló en este trabajo tanto para REMA como para TEMA, fue el propuesto por el *Institute of Tropical Medicine (ITM), Antwerp*, Bélgica. En este protocolo se evalúa la susceptibilidad en placa a 6 medicamentos simultáneamente: rifampicina, isoniazida, ofloxacina, kanamicina, amikacina y capreomicina.

El análisis de los resultados se realizó al final del estudio comparando los datos obtenidos para TEMA y REMA con datos proporcionados por el *ITM* quien procesó los mismos aislamientos bajo el mismo protocolo utilizando REMA teniendo como método de referencia el método de las proporciones múltiples.

3.2.1 Aislamientos

Se realizó el análisis de 30 aislamientos de *M. tuberculosis* enviados por el Dr. Juan Carlos Palomino del *Institute of Tropical Medicine Antwerp*,

Bélgica. El patrón de susceptibilidad de estos aislamientos previamente obtenido por proporciones múltiples, se desconoció durante la realización de las pruebas y fue revelado hasta el momento de la entrega de resultados.

La cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (sensible a todos los medicamentos antituberculosos) fue utilizada como control de calidad de todos los experimentos realizados durante el proceso de estandarización de la técnica.

3.2.2 Obtención del inóculo

Para obtener el inóculo mediante este protocolo es importante tener un cultivo fresco en medio LJ (15 – 28 días aproximadamente), ya que cultivos con un tiempo de incubación mayor podrían dar origen a falsos negativos en los ensayos.

La suspensión bacteriana o inóculo tuvo una concentración de 0,1mg/ml. Se raspó la superficie del medio con espátula de madera para tomar parte del cultivo y la cantidad de masa bacilar obtenida en esta acción se pesó en una balanza analítica. Una vez se obtuvo el peso en miligramos para cada aislamiento, se adicionó por cada miligramo de masa bacilar, 1ml de agua destilada, con el fin de obtener una concentración bacilar de 1mg/ml, a partir de la cual se realizó una dilución 1:10 en medio líquido Middlebrook 7H9 con OADC al 10%. La solución producto del procedimiento anterior fue la utilizada como inóculo de las placas.

3.2.3 Medicamentos

De los medicamentos de primera línea se incluyeron en esta fase del trabajo la isoniazida (I3377) y la rifampicina (R3501). De los medicamentos de segunda línea disponibles, se incluyeron la ofloxacina (O8757), amikacina (A3650), kanamicina (K4000) y capreomicina (C4142), todos obtenidos de Sigma®. Los medicamentos utilizados en este esquema fueron los planteados en el protocolo de REMA propuesto por el *ITM*.

En el esquema utilizado para esta fase se estudiaron los medicamentos que definen la TB XDR. Es importante mencionar que para la definición de MDR se evaluaron rifampicina e isoniazida, y que para XDR se evaluaron 3 medicamentos pertenecientes al grupo de los aminoglicósidos y sólo uno de las fluoroquinolonas. La necesidad de evaluar tres aminoglicósidos, en lugar de uno radica en la necesidad de ver si se presenta resistencia a los tres o a uno solo de ellos ya que el concepto de XDR dice: “resistencia a alguno de los aminoglicósidos utilizados en el tratamiento de segunda línea”, de manera que si sólo se evalúa uno de ellos y es sensible al fármaco evaluado, existe la posibilidad de que exista resistencia a otro fármaco de este grupo, lo que llevaría a la emisión de un resultado inconcluso y por lo tanto se podría clasificar de forma errada un caso XDR como polirresistente. En cuanto a la inclusión de la ofloxacina en el esquema utilizado en este estudio es evaluar un medicamento que pertenezca al grupo de las fluoroquinolonas de acuerdo a lo contemplado en el concepto de resistencia extensiva que dice que un

aislamiento de *M. tuberculosis* se considera XDR cuando es resistente al menos a una de las fluoroquinolonas”, por lo tanto para la evaluación MDR – XDR es necesario sólo uno de los fármacos pertenecientes a este grupo. Uno de los motivos que tuvo mayor importancia para incluir sólo la ofloxacina y no otro de los medicamentos del grupo de las fluoroquinolonas es que para los demás medicamentos no se ha determinado la CMI y no hay reportes en estudios anteriores por lo que se omitió su evaluación en este estudio evitando así la emisión de juicios parcialmente reales.

La solución de almacenamiento de cada uno de estos medicamentos se preparó en agua destilada estéril a una concentración de 1mg/ml, exceptuando la rifampicina que se preparó en una mezcla de metanol- agua y la ofloxacina que se preparó en NaOH al 0.1N. Las soluciones fueron esterilizadas con filtros de 0,22µm, servidas en alícuotas de 0,5ml y almacenadas a -20°C. Las soluciones de trabajo fueron preparadas durante la realización del ensayo diluyendo la solución madre en medio líquido Middlebrook 7H9. Las concentraciones preparadas para cada medicamento se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: concentraciones de las soluciones stock y de trabajo para cada uno de los medicamentos utilizados en los esquemas de TEMA y REMA.

Solucion stock	Solución de trabajo	Concentración final
RMP 1mg/ml	4 µg/ml	1 µg/ml
INH 1mg/ml	2 µg/ml	0.5 µg/ml
OFLO 1mg/ml	16 µg/ml	4 µg/ml
KAN 1mg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml
AMK 1mg/ml	40 µg/ml	10 µg/ml
CAP 1mg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml

3.2.4 Preparación del indicador de crecimiento

Se preparó la solución de resazurín a una concentración 0,02% en agua destilada, se esterilizó con filtro de 0,22µm y se almacenó a 4°C protegido de la luz. La solución de MTT fue preparada a 5mg/ml y de la misma manera que se hizo durante la primera fase del estudio.

3.2.5 Montaje de las placas

Figura 2: esquema de placa utilizado en TEMA y REMA para la evaluación de aislamientos MDR y XDR. RMP: rifampicin; INH: isoniazida; OFL: ofloxacina; KAN: kanamicina; AMK: amikacina; CAP: capreomicina.

		Control +						Control -					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A												
CEPA A	B	A	RMP 1.0	INH 0.5	OFL 4.0	KAN 5.0	AMK 10	CAP 5.0	A				
	C	A	RMP 0.5	INH 0.25	OFL 2.0	KAN 2.5	AMK 5.0	CAP 2.5	A				
CEPA B	D	B	RMP 1.0	INH 0.5	OFL 4.0	KAN 5.0	AMK 10	CAP 5.0	B				
	E	B	RMP 0.5	INH 0.25	OFL 2.0	KAN 2.5	AMK 5.0	CAP 2.5	B				
CEPA C	F	C	RMP 1.0	INH 0.5	OFL 4.0	KAN 5.0	AMK 10	CAP 5.0	C				
	G	C	RMP 0.5	INH 0.25	OFL 2.0	KAN 2.5	AMK 5.0	CAP 2.5	C				
	H												

3.2.6 Metodología

Paso 1

Se adicionaron 100µl de medio líquido Middlebrook 7H9 a las columnas comprendidas desde la columna 2 hasta la 8, desde la fila B hasta la G.

Paso 2

Luego de adicionar el medio se adicionaron 100µl de cada uno de los medicamentos como se indica a continuación:

- Rifampicina: Pozos B-3, D-3, F-3.
- Isoniazida: Pozos B-4, D-4, F-4.
- Ofloxacina: Pozos B-5, D-5, F-5.
- Kanamicina: Pozos B-6, D-6, F-6.
- Amikacina: Pozos B-7, D-7, F-7.
- Capreomicina: Pozos B-8, D-8, F-8.

Paso 3

Se realizaron diluciones 1:2 de cada uno de los medicamentos desde la fila B a la fila C y se descartaron los 100µl restantes luego de mezclar en la fila C. Se repitió el procedimiento en las filas D y F.

Paso 4

Se adicionaron 200µl de medio líquido Middlebrook 7H9 a los pozos de la columna 9 comprendidos entre las filas B y G. Estos pozos correspondieron a los controles de esterilidad del medio o controles negativos de la prueba.

Paso 5

Se adicionaron 200µl de agua destilada estéril a los pozos restantes de la placa como se muestra en la figura 2, con el fin de prevenir la evaporación del medio durante la incubación de la placa.

Paso 6

Se realizaron los inóculos correspondientes a las filas B-C, D-E y F-G, desde la columna 2 hasta la columna 8.

Paso 7

La placa fue sellada en su empaque original, se almacenó en cámara húmeda y se incubó a 37°C durante 7 días.

3.2.7 Lectura del ensayo

Las placas fueron reveladas en su totalidad luego de 7 días de incubación. Para REMA se adicionó un volumen de 30µl de rezasurín a cada uno de los pozos de trabajo. En los ensayos realizados con TEMA, las placas fueron reveladas de la misma manera, excepto que el volumen

indicador fue 22 μ l de una mezcla de 10 μ l de MTT más 12 μ l de Tween 80 al 20%. Las placas fueron almacenadas nuevamente por 24 horas a 37°C.

Los resultados del análisis de las placas fueron interpretados de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Se consideró un aislamiento resistente cuando se observó cambio del color original del indicador, de manera que cuando se presentó viraje de amarillo a púrpura en el caso con el MTT, o de azul a rosado con resazurín, se consideró que el microorganismo era viable. Este resultado indica que la concentración del medicamento presente en ese pozo no tiene actividad contra el aislamiento correspondiente.
- Se consideró un aislamiento sensible cuando no se observó cambio de color. Esto indica que la concentración del medicamento evaluado es activo y por ende capaz de inhibir el crecimiento del bacilo.

3.3 TERCERA FASE DEL ESTUDIO

El objetivo de esta parte del estudio fue aplicar el protocolo establecido por el *ITM* al análisis de 60 aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes colombianos, que por proporciones múltiples muestran un patrón de MDR, pero de los cuales se desconoce su perfil de resistencia a medicamentos de segunda línea, debido a que esta parte del diagnóstico no se realiza actualmente en el laboratorio nacional de referencia.

Una vez evaluada la sensibilidad y especificidad del protocolo establecido por *ITM*, aplicado a la metodología de TEMA, se pretendió evaluar resistencia extensiva mediante este procedimiento en los 60 aislamientos de *M. tuberculosis* MDR previamente analizados para rifampicina e isoniazida. El procedimiento necesario para cumplir con este objetivo, se realizó de forma idéntica al realizado durante la segunda fase del estudio, debido a que el protocolo permite evaluar la presencia de TB MDR y TB XDR en una sola placa, además permite evaluar la actividad de los medicamentos más representativos para 3 aislamientos simultáneamente.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación de la metodología TEMA se realizó teniendo en cuenta los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de resistencia, valor predictivo de sensibilidad y eficiencia en la determinación de los patrones de susceptibilidad de tres cepas de referencia y 100 aislamientos clínicos.

- **Sensibilidad:** es la capacidad de una prueba de caracterizar como resistente a un aislamiento o cepa realmente resistente.
- **Especificidad:** es la capacidad de una prueba de detectar cepas verdaderamente sensibles.
- **Valor predictivo de sensibilidad:** relación entre el número de resultados verdaderamente sensibles y el total de resultados sensibles.

- **Valor predictivo de resistencia:** relación entre el número de resultados verdaderamente resistentes y el total de resultados resistentes.
- **Eficiencia o exactitud:** relación entre el número de resultados correctos y el número total de resultados obtenidos en una prueba de susceptibilidad.

El análisis de los datos a cotejar con la metodología de referencia o se realizó mediante curvas ROC utilizando el programa MedCalc 7.0 para Windows.

3.4.1 Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic curve)

La curva ROC es un método ampliamente utilizado para determinar la calidad diagnóstica, la cual a través de un sistema de coordenadas representa gráficamente la sensibilidad y especificidad de determinada prueba, mostrando la exactitud de esta última mediante la determinación del mejor punto en el cual la prueba tiene la capacidad de discriminar entre sensible y resistente (7, 46).

Las curvas ROC se dibujan sobre un eje de coordenadas donde en el “eje Y” se ubica la sensibilidad y en el “eje X” la tasa de falsos negativos o 100-especificidad. Los dos ejes oscilan entre 0 y 100. El punto de la curva con mayor rendimiento conjunto de sensibilidad y especificidad estará en el extremo superior e izquierdo de la curva, es decir será el punto tangencial que le permita a la curva tener mayor área bajo ella, lo cual se refiere a los

resultados verdaderamente resistentes y verdaderamente sensibles. El área sobre la curva es el equivalente al número de desaciertos de la prueba (7, 88).

Mediante la aplicación de las curvas ROC se determinó la eficiencia de TEMA respecto al método de las proporciones múltiples. El análisis de las curvas también permitió realizar una comparación entre las dos metodologías colorimétricas utilizadas durante la fase dos del estudio.

Los puntos de corte empleados en la elaboración de las curvas ROC para el análisis de la eficiencia de las metodologías colorimétricas bajo estudio, fueron determinados mediante análisis de material bibliográfico reportado (60, 68, 76). Se definió que los aislamientos eran resistentes a rifampicina cuando crecieron a una concentración $\geq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$, y por debajo de esta concentración se consideraron sensibles. En relación al punto de corte de la isoniazida, se determinó que un aislamiento de *M. tuberculosis* era resistente cuando crecía a una concentración $\geq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$ y si crecía por debajo de esta concentración se consideraba sensible (60, 68). Los parámetros utilizados para la determinación de la eficiencia de las pruebas se basaron en valores estimados para el área bajo la curva, utilizados en estudios previos (42, 76), los cuales se definen a continuación:

- Se determinó que la eficiencia de la prueba fue excelente para un medicamento cuando el área bajo la curva estuvo entre 1 - 0.9.

- Se consideró que la prueba fue buena cuando el área bajo la curva estuvo entre 0.9 - 0.8.
- Se consideró la eficiencia de la prueba como regular cuando el área bajo la curva estuvo entre 0.8 - 0.7.
- Se consideró la eficiencia de la prueba mala cuando el área bajo la curva se encontró entre 0.7 – 0.6
- Se consideró que la eficiencia de la prueba para determinado medicamento fue deficiente cuando el área bajo la curva estuvo entre 0.6 - 0.5. (7, 42).

La correlación entre TEMA y el método de las proporciones múltiples, y TEMA y REMA se obtuvo mediante el análisis de una curva ROC. Los valores predictivos de resistencia y sensibilidad fueron calculados mediante tablas de contingencia (ver tabla 2).

Tabla 2: tabla de contingencia utilizada en el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de resistencia y valor predictivo de sensibilidad.

		PROPORCIONES MÚLTIPLES	
		RESISTENTE	SENSIBLE
TEMA	RESISTENTE	Verdadero Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
	SENSIBLE	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)
		VP+FN	FP+VN

Sensibilidad: $VP/(VP + FN)$
 Especificidad: $VN/(VN + FP)$
 Valor predictivo de resistencia: $VP/(VP+FP)$
 Valor predictivo de sensibilidad: $VN/(FN+VN)$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRIMERA FASE

De acuerdo a los criterios de sensibilidad y resistencia planteados para esta fase, se clasificaron los 70 aislamientos según TEMA, como se muestra en las tablas 3 y 4.

4.1.1 Análisis de susceptibilidad a rifampicina e isoniazida

Tabla 3: tabla de contingencia para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de resistencia y valor predictivo de sensibilidad de TEMA respecto al análisis de rifampicina.

RIFAMPICINA		PROPORCIONES MÚLTIPLES	
		RESISTENTE	SENSIBLE
TEMA	RESISTENTE	57	0
	SENSIBLE	3	10
		VP+FN	FP+VN

Sensibilidad: 0,95

Valor predictivo de resistencia: 1

Especificidad: 1

Valor predictivo de sensibilidad: 0,77

ISONIAZIDA		PROPORCIONES MÚLTIPLES	
		RESISTENTE	SENSIBLE
TEMA	RESISTENTE	60	0
	SENSIBLE	0	10
		VP+FN	FP+VN

Sensibilidad: 1

Valor predictivo de resistencia: 1

Especificidad: 1

Valor predictivo de sensibilidad: 1

Tabla 4: Tabla de contingencia para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de resistencia y valor predictivo de sensibilidad de TEMA respecto al análisis de isoniazida

Las tablas de contingencia muestran que de 60 aislamientos resistentes para rifampicina por el método de referencia, 57 fueron clasificados como sensibles por TEMA. De acuerdo al análisis los porcentajes de sensibilidad y de especificidad de la prueba oscilan entre el 95% y 100% para rifampicina. En el caso de la isoniazida se observó una excelente concordancia de TEMA con el método de las proporciones múltiples, los 60 aislamientos fueron clasificados como resistentes por las dos metodologías, obteniéndose una sensibilidad y una especificidad del 100%. Los 10 aislamientos sensibles incluidos en esta fase del estudio también fueron clasificados como sensibles a rifampicina e isoniazida por TEMA. Los valores predictivos de resistencia y sensibilidad hallados en el análisis de TEMA frente al método de las proporciones múltiples fueron de 1 y 0,77, respectivamente.

CURVA ROC RIFAMPICINA

Figura 3: curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina.

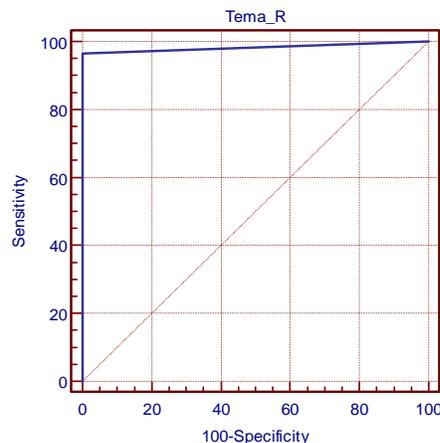


Tabla 5: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina.

Variable	Tema_R
Variable de clasificación	Pm_R

Grupo positivo	
Pm_R	=1
Tamaño de muestra	60
Grupo negativo	
Pm_R	=0
Tamaño de muestra	10

Area bajo la curva ROC	0,983
Error estándar	0,0133
Intervalo de confianza 95%	0,919 a 0,998
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	0,0001

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI
$\geq 0,063$	100	94 - 100	0	0,0 - 31,0
$>0,063^*$	96,67	88,4 - 99,5	100	69,0 - 100
$>0,125$	95	86,1 - 98,9	100	69,0 - 101
$>0,25$	90	79,5 - 96,2	100	69,0 - 102
>2	0	0,0 - 6,0	100	69,0 - 103

La sensibilidad y especificidad de TEMA frente al método de las proporciones múltiples, estuvieron por encima del 90% y junto con el nivel de concordancia que se presentó entre las dos técnicas, postulan a TEMA como una buena candidata para el diagnóstico de susceptibilidad a rifampicina.

Se encontraron 3 aislamientos que por el método de las proporciones múltiples fueron resistentes a rifampicina y por TEMA fueron clasificados como sensibles, sin embargo se puede decir que en general hubo una buena correlación entre la prueba bajo estudio y la prueba de referencia, además se halló un área bajo la curva que de acuerdo a los parámetros planteados en la metodología, clasifican a TEMA como una metodología “excelente” en la detección de resistencia a rifampicina.

La discrepancia encontrada en esta fase del estudio para rifampicina respecto a los tres aislamientos mencionados, puede obedecer a varios factores que van desde fallas en el momento de montaje de la placa u otras eventualidades que pueden influir en los resultados de TEMA, hasta condiciones innatas al método de las proporciones múltiples, que hayan podido crear la discordancia de datos, tanto así que existe la misma probabilidad de que haya ocurrido algo que pudo haber afectado la integridad del aislamiento, el medio y los medicamentos, o que la misma naturaleza de cada procedimiento haya afectado significativamente los resultados del estudio, tal como lo han manifestado otros autores (20, 43, 48, 51, [porras](#))

CURVA ROC ISONIAZIDA

Figura 4: curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida.

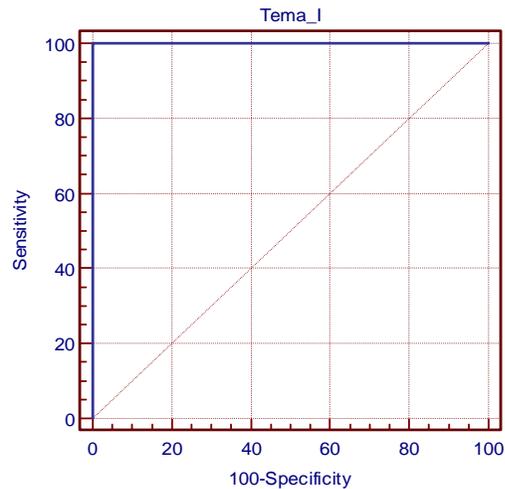


Tabla 6: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida.

Variable	Tema_I
Variable de clasificación	Pm_I

Grupo positivo	
Pm_R	=1
Tamaño de muestra	60
Grupo negativo	
Pm_R	=0
Tamaño de muestra	10

Area bajo la curva ROC	1
Error estándar	0
Intervalo de confianza 95%	0,948 a 1
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	0

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI
$\geq 0,06$	100	94 - 100	0	0,0 - 31,0
$>0,06^*$	100	95 - 100	100	69,0 – 100
>2	0	0,0 - 6,0	100	69,0 – 103

Los datos de sensibilidad y especificidad obtenidos para isoniazida muestran claramente en la curva ROC que hay un 100% de concordancia de TEMA con el método de las proporciones múltiples.

Como se planteó en la metodología del estudio, a cada uno de los aislamientos se les realizó 3 réplicas con el fin de observar la variabilidad entre un ensayo y otro. Se observó que en las tres repeticiones realizadas bajo las mismas condiciones, se obtuvo el mismo resultado.

En cuanto al tiempo de obtención de resultados se pudo observar que para TEMA se requirió de un máximo de 7 días para la lectura de las pruebas. Por otro lado el tiempo necesario para obtener resultados por el método de las proporciones múltiples está entre 28 y 42 días de acuerdo al protocolo utilizado en el INS (29). El análisis del tiempo requerido para la obtención de resultados contando el día de montaje e incubación de las pruebas como día 1, demuestra que el tiempo de emisión de resultados se estaría acortando como mínimo en 21 días y por ende el tiempo en que se puede iniciar un nuevo esquema de tratamiento en pacientes con cepas

MDR, contribuyendo de esta manera al mejoramiento de los programas de control de TB en el país.

En el análisis de las curvas ROC para rifampicina por el método TEMA se obtuvo un área bajo la curva de 0,983 y para isoniazida de 1. Estos resultados y las observaciones realizadas durante esta primera fase dejan ver la capacidad diagnóstica de TEMA y la posicionan como una opción válida para el diagnóstico temprano de TB MDR, incluso se podría decir que de acuerdo a la buena concordancia con el método de referencia podría posicionarse como candidata a método “gold estándar”, en especial en países de bajos recursos o en vía de desarrollo donde se hace cada vez más apremiante un diagnóstico oportuno y eficaz de TB MDR.

4.2 SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO

La segunda fase del estudio se realizó con el objetivo de analizar dos metodologías colorimétricas simultáneamente, TEMA y REMA, para determinar la eficiencia de estas en el diagnóstico de TB MDR y TB XDR, y se realizó la comparación para establecer cuál de las dos es más viable en el diagnóstico de susceptibilidad bajo las condiciones de este laboratorio (Anexos 1 y 2). Los resultados obtenidos para isoniazida, rifampicina, ofloxacina, kanamicina, amikacina y capreomicina se muestran en curvas ROC y tablas que contienen los parámetros de eficiencia de las pruebas.

CURVA ROC ISONIAZIDA

Figura 5: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida en la segunda fase del estudio.

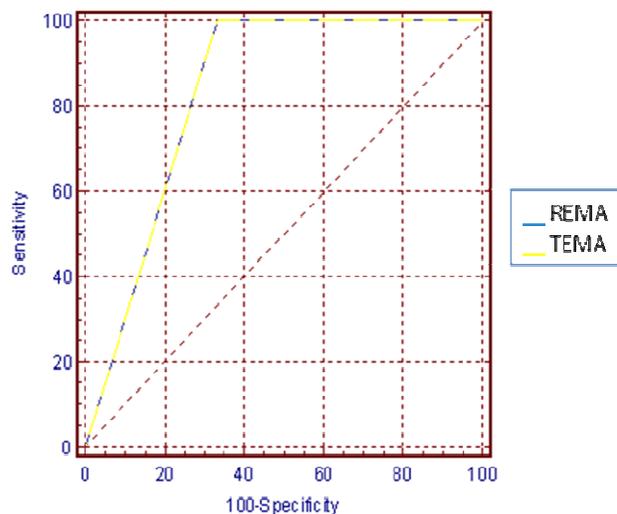


Tabla 7: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a isoniazida durante la segunda fase del estudio

Variable	Tema_I Rema_I
Variable de clasificación	Pm_I

Grupo positivo	
Pm_I	=1
Tamaño de muestra	24
Grupo negativo	
Pm_I	=0
Tamaño de muestra	6

Area bajo la curva ROC	0,833
Error estándar	0,08
Intervalo de confianza 95%	0,653 a 0,943
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	0,0001

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	VPP	VPN
$\geq 0,063$	100	94 - 100	0	0,0 - 31,0	80	
$>0,063^*$	100	95 - 100	100	69,0 - 100	92,3	100
$>0,5$	0	0,0 - 6,0	100	69,0 - 103		20

El área bajo la curva obtenida para TEMA y REMA en el diagnóstico de resistencia a isoniazida fue de 0,83. La sensibilidad sigue siendo del 100%, mientras que la especificidad cayó a un 66,67% en comparación con los resultados de la primera fase. Los valores predictivos positivo y negativo se mantuvieron por encima 90 indicando que la prueba es eficiente a pesar de presentar una baja especificidad.

En contraste con los resultados obtenidos en la primera fase del estudio, en esta segunda parte se encontró que la especificidad de la prueba disminuyó drásticamente, mientras que la sensibilidad de la prueba sigue siendo del 100%. Estos datos pueden resultar contradictorios y se podría pensar que la prueba no es eficiente en la determinación de susceptibilidad a isoniazida como se concluyó en la primera fase, sin embargo es necesario analizar que los dos falsos positivos encontrados en esta segunda fase afectan la especificidad de la prueba debido a que el número total de aislamientos que fueron estudiados es de 30 y sólo 6 de estos muestran un patrón sensible frente a isoniazida (Anexo 1), esto hace que la discrepancia

que se presenta entre el método de las proporciones múltiples y las metodologías bajo estudio parezca un grave problema.

Pese a los resultados obtenidos en esta fase es preciso examinar otros aspectos del análisis, no sólo la especificidad, debido a que no es el único parámetro que define la eficiencia de una prueba diagnóstica, también se deben tener en cuenta otros aspectos como los valores predictivos que en este caso están por encima del 90%; estos valores a diferencia de la especificidad y la sensibilidad, varían de acuerdo a la prevalencia de la enfermedad, que en nuestro caso es un factor importante y pudo influir en los resultados (2, 7). No obstante, el hecho de que se tengan valores predictivos entre 90 y 100 y un área bajo la curva por encima de 0,80, permiten incluir a TEMA y REMA dentro de las metodologías más eficientes en el diagnóstico de susceptibilidad a isoniazida sumando el tiempo de entrega de resultados es de 7 días y su fácil interpretación.

Por otro lado, es posible considerar que el diagnóstico errado no se presenta de forma unilateral, sino que existe la posibilidad de que se hayan clasificado a dos aislamientos resistentes como sensibles y que el error se haya presentado por alguna circunstancia ocurrida durante el análisis de estos por el método de las proporciones múltiples, debido a que aunque la metodología es la prueba de oro a nivel de diagnóstico de susceptibilidad en TB, eventualmente pueden presentarse fallas o incluso problemas innatos al procedimiento que influyan en los resultados y en la realización de este tipo

de estudios (20, 43). En este caso se recomienda que en estudios posteriores se aclaren este tipo de discrepancias utilizando herramientas moleculares que permitan determinar genéticamente que metodología está más cercana al perfil de resistencia del microorganismo, o si hay presencia de factores como mutaciones o deleciones que pudieran haber generado un cambio en el fenotipo de resistencia, el cual puede verse afectado por el entorno e incluso por mutaciones espontaneas producto de procesos intrínsecos del microorganismo y que pudieron ocurrir en el espacio entre la realización de la prueba de referencia y las pruebas bajo estudio.

Figura 6: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina en la segunda fase del estudio.

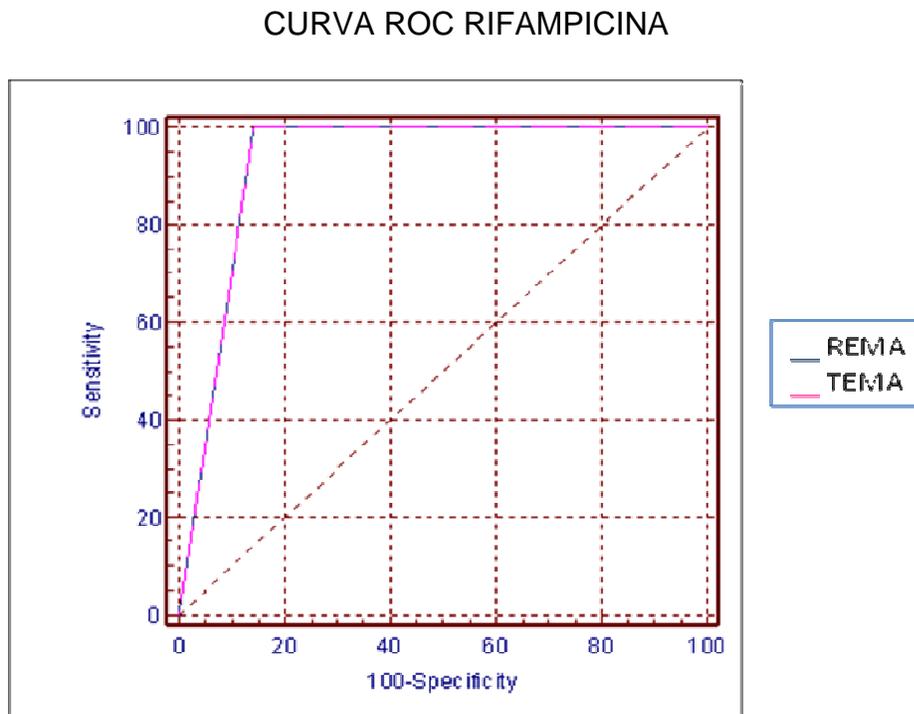


Tabla 8: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a rifampicina durante la segunda fase del estudio.

Variable	Tema_R Rema_R
Variable de clasificación	Pm_R

Grupo positivo	
Pm_R	=1
Tamaño de muestra	23
Grupo negativo	
Pm_R	=0
Tamaño de muestra	7

Area bajo la curva ROC	0,929
Error estándar	0,047
Intervalo de confianza 95%	0,772 a 0,988
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	0,0001

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	VPP	VPN
$\geq 0,125$	100	85 - 100	0	0,0 - 41,1	76,7	
$> 0,125^*$	100	85 - 100	85,71	42,2 - 97,6	95,8	100
> 1	0	0,0 - 15,0	100	58,9 - 100		23,3

La sensibilidad y especificidad de la prueba fueron del 100% y 85,7%, respectivamente, con el hallazgo de un sólo aislamiento resistente a rifampicina por TEMA-REMA y sensible por proporciones múltiples. El área bajo la curva fue de 0,93 y los valores predictivos estuvieron por encima del 95%. La evaluación de la susceptibilidad a rifampicina por las dos metodologías colorimétricas arrojó los mismos resultados en las tres réplicas.

De acuerdo a estos resultados se podría decir que por su especificidad la prueba no tiene el suficiente poder de discriminación entre falsos positivos y verdaderos negativos, sin embargo el resultado del área bajo la curva y los valores predictivos demuestran que en términos de eficiencia las pruebas colorimétricas son confiables en la determinación de susceptibilidad a medicamentos. Al igual que en el caso de la isoniazida sería necesario realizar análisis molecular de la cepa que genera la discrepancia entre las metodologías bajo estudio y el método de referencia, con el fin de determinar la presencia de mutaciones que podrían estar generando un comportamiento heterogéneo en esta cepa.

Figura 7: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a ofloxacina en la segunda fase del estudio.

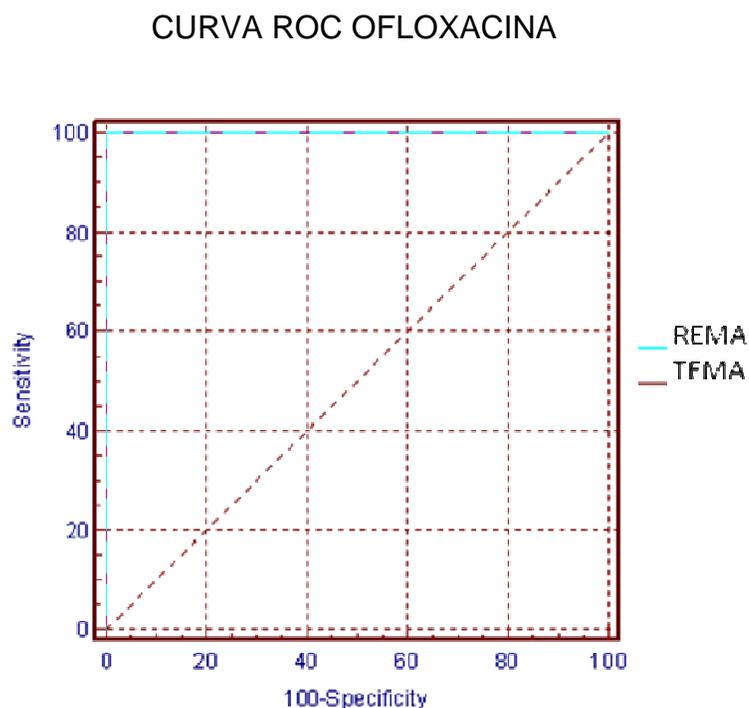


Tabla 9: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a ofloxacina.

Variable	Tema_O Rema_O
Variable de clasificación	Pm_O

Grupo positivo	
Pm_O	=1
Tamaño de muestra	12
Grupo negativo	
Pm_O	=0
Tamaño de muestra	18

Area bajo la curva ROC	1
Error estándar	0
Intervalo de confianza 95%	0,883 a 1
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	0

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	VPP	VPN
>=1,5	100	73,4 - 100	0	0,0 - 18,7	40	
>1,5*	100	73,4 - 100	100	81,3 - 100	100	100
>2	91,67	61,5 - 98,6	100	81,3 - 100	100	94,7
>4	0	0,0 - 26,6	100	81,3 - 100		60

Durante el análisis de los resultados obtenidos por TEMA y REMA se encontró que en tres de las treinta cepas procesadas no hubo una correlación total con los datos de REMA enviados por el *ITM* (Anexo 2).

Las tres cepas mencionadas corresponden a las cepas identificadas con los códigos 103, 110 y 122 (Anexo 1). Cada una de ellas presentó un perfil de resistencia frente a ofloxacina en contraste con lo reportado por el *ITM*, en

la concentración correspondiente a 4,0 $\mu\text{g/ml}$, la mayor de las dos concentraciones evaluadas, sin embargo esto no afectó drásticamente el resultado global, ya que de igual manera se encontró que por las dos metodologías y por proporciones múltiples las cepas exhibieron un perfil de resistencia frente a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ de ofloxacina, concentración que se encuentra por encima del punto de corte contemplado en el estudio (Anexo 1).

A pesar del análisis individual de las cepas realizado con cada metodología, el análisis semicuantitativo de las curvas ROC muestra una sensibilidad y especificidad del 100% de REMA y TEMA con el método de las proporciones múltiples, manifestando un área bajo la curva de 1; esto indica que las dos metodologías son eficientes en la determinación de susceptibilidad a ofloxacina. Lo mismo se pudo verificar con los valores predictivos positivo y negativo que fueron del 100%. Se observó que las tres réplicas realizadas a los treinta aislamientos arrojaron los mismos resultados.

Figura 8: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a kanamicina en la segunda fase del estudio.

CURVA ROC KANAMICINA

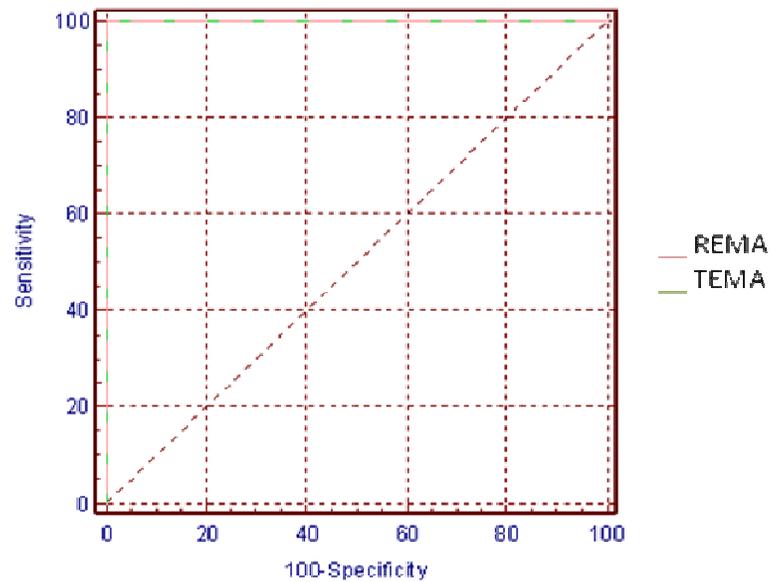


Tabla 10: tabla 10. Análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a kanamicina.

Variable	Tema_K Rema_K
Variable de clasificación	Pm_K

Grupo positivo	
Pm_K	=1
Tamaño de muestra	11
Grupo negativo	
Pm_K	=0
Tamaño de muestra	9

Area bajo la curva ROC	1
Error estándar	0
Intervalo de confianza 95%	0,833 a 1
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	0

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	VPP	VPN
>= 2	100	71,3 – 100	0	0,0 -17,8	36,7	
>2*	100	71,3 – 100	100	82,2 - 100	100	100
>5	0	0,0 - 28,7	100	82,2 - 100		63,3

En el análisis de los resultados se pudo determinar que de 11 aislamientos resistentes para kanamicina por proporciones múltiples, 11 fueron clasificados como resistentes por las dos metodologías colorimétricas bajo estudio. Igualmente se determinó por TEMA y REMA la presencia de 9 aislamientos sensibles a kanamicina, los cuales muestran un patrón de sensibilidad a este medicamento por proporciones múltiples indicando que existe una concordancia total entre las dos metodologías bajo estudio y el método de referencia.

Los resultados obtenidos mediante TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a kanamicina mostraron que las pruebas son eficientes, debido al resultado obtenido del área bajo la curva que fue de 1, observándose una sensibilidad y especificidad del 100% de las pruebas frente al método de referencia.

Figura 9: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a amikacina en la segunda fase el estudio

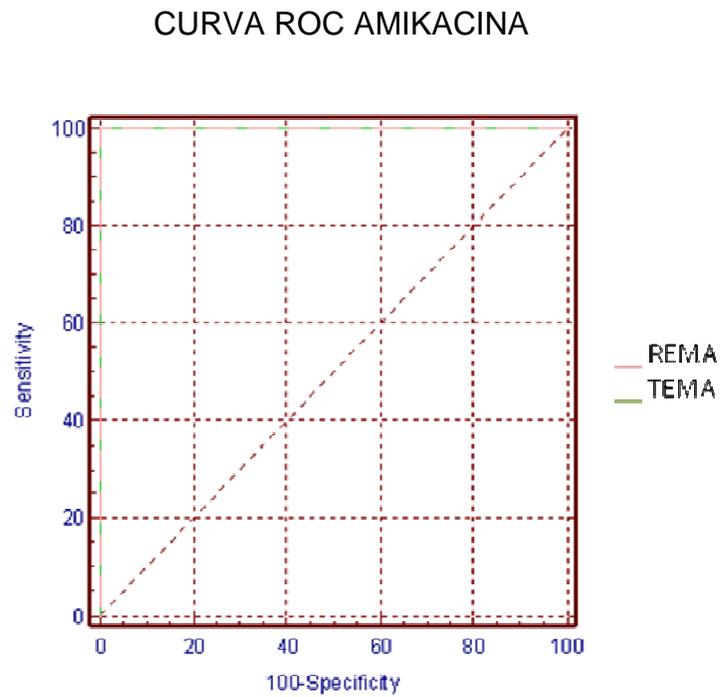


Tabla 11: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a amikacina

Variable	Tema_A Rema_A
Variable de clasificación	Pm_A

Grupo positivo	
Pm_A	=1
Tamaño de muestra	10
Grupo negativo	
Pm_A	=0
Tamaño de muestra	20

Area bajo la curva ROC	1
Error estándar	0
Intervalo de confianza 95%	0,833 a 1
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	0

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	VPP	VPN
>= 2	100	69,0 - 100	0	0,0 - 17,0	33,3	
>2*	100	69,0 - 100	100	83,0 - 100	100	100
>10	0	0,0 - 31,0	100	83,0 - 100		66,7

Los resultados obtenidos mediante TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a amikacina mostraron que las pruebas son excelentes debido al resultado obtenido del área bajo la curva que fue de 1, observándose una sensibilidad y especificidad del 100% de las pruebas frente al método de referencia.

Figura 10: curva ROC de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a capreomicina en la segunda fase del estudio.

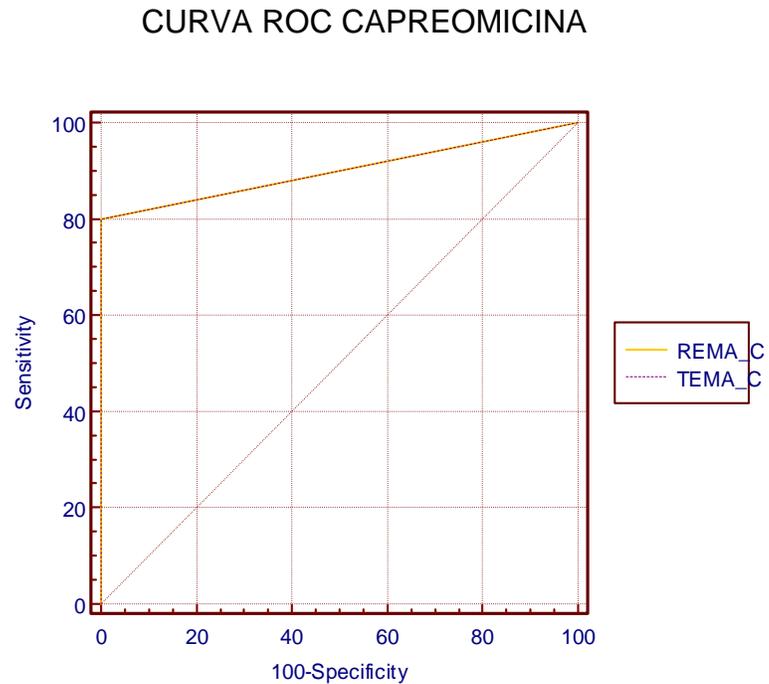


Tabla 12: análisis obtenido por MedCalc para la curva ROC de TEMA en la determinación de susceptibilidad a capreomicina.

Variable	Tema_C	Rema_C
Variable de clasificación	Pm_C	

Grupo positivo	
Pm_C	=1
Tamaño de muestra	10
Grupo negativo	
Pm_C	=0
Tamaño de muestra	20

Area bajo la curva ROC	0,9
Error estándar	0,07
Intervalo de confianza 95%	0,734 a 0,978
Nivel de significancia P (Area = 0.5)	1E-04

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	VPP	VPN
>= 2	100	69,0 – 100	0	0,0 - 17,0	33,3	
>2*	80	44,4 - 96,9	100	83,0 - 100	100	90,9
>2,5	40	12,4 - 73,6	100	83,0 - 100	100	76,9
>5	0	0,0 - 31,0	100	83,0 - 100		66,7

En el análisis de TEMA y REMA en la determinación de susceptibilidad a la capreomicina se encontró que el perfil de resistencia de cuatro de las treinta cepas analizadas durante esta fase no fue compatible con el proporcionado por el *ITM* (anexo 2). Las dos primeras, identificadas con el código 111 y 112, presentaron por TEMA-REMA un perfil sensible frente a capreomicina, mientras que los resultados obtenidos por REMA y el método de referencia, proporcionados por el *ITM* mostraron un perfil de resistencia al medicamento. Las otras dos cepas, identificadas como 122 y 127, no coincidieron en una de las dos concentraciones evaluadas para capreomicina por REMA en los ensayos realizados por el *ITM*, sin embargo por el método de referencia se pudo determinar que son resistentes, de manera que no alteraron de forma significativa la eficiencia de TEMA-REMA en el diagnóstico a capreomicina (Anexos 1 y 2). En el análisis de la curva ROC se obtuvo una sensibilidad del 80%, una especificidad del 100% y un área

bajo la curva de 0,90. Los datos obtenidos en esta fase del estudio sugieren que tanto TEMA como REMA son pruebas eficientes en la evaluación de susceptibilidad a capreomicina.

De acuerdo al análisis de capreomicina, kanamicina y amikacina se puede declarar a TEMA y REMA como excelentes opciones diagnósticas para los aminoglicósidos utilizados como opciones de segunda línea en el tratamiento de la TB.

En cuanto a la comparación de metodologías se determinó una concordancia total de los resultados obtenidos para TEMA y REMA por el INS; sin embargo es preciso mencionar que la lectura de las placas por observación es más complejo en REMA debido a las tonalidades que se presentan entre el azul-violeta del estado reducido y el rosado del estado oxidado del rezasurín. En contraste, la lectura de las placas reveladas con MTT, fue más sencilla y no dio lugar a confusiones gracias a la claridad con que se puede diferenciar entre un aislamiento resistente y sensible por esta técnica (Anexos 3 y 4).

4.3 TERCERA FASE

Se evaluaron 60 aislamientos de *M. tuberculosis* clasificados por la RNL como MDR. Se tomó el protocolo adaptado de TEMA con las modificaciones que permiten evaluar TB MDR y TB XDR con el objetivo de poder estudiar el

perfil de resistencia a medicamentos de segunda línea de estos aislamientos y poder determinar cuántos de ellos eran XDR (Anexo 5).

El evaluar TB MDR y TB XDR permitió evidenciar que los resultados obtenidos en el nuevo esquema de placa en cuando a la determinación de resistencia a rifampicina e isoniazida fueron iguales a los obtenidos en la primera fase del estudio. Para rifampicina se obtuvo un área bajo la curva de 0,983 y para isoniazida un área bajo la curva de 1. En términos generales el que se haya realizado nuevamente la determinación de MDR por TEMA utilizando otro protocolo y que se hayan obtenido los mismos resultados que en la primera fase, es un hecho que garantiza que TEMA es una prueba eficiente en la determinación de TB MDR. En la tabla que se muestra a continuación se observan discriminados los resultados obtenidos para cada uno de los aislamientos incluidos en la tercera fase del estudio frente a los 6 medicamentos incluidos en el esquema propuesto por el ITM.

Tabla 13: resultados de la tercera etapa del estudio. R: Resistente; S: sensible.

CODIGO	RESULTADOS											
	Rifampicina		Isoniazida		Ofloxacina		Kanamicina		Amikacina		Capreomicina	
	1,00	0,50	0,50	0,25	4,00	2,00	5,00	2,50	10,00	5,00	5,00	2,50
1	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
5	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
6	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S

8	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
9	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
10	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
11	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
13	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
15	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
16	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
17	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
18	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
19	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
20	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
21	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
22	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
23	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
24	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
25	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
26	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
27	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
28	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
29	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
30	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
31	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
32	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
33	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
34	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
35	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
36	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
37	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
38	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
39	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
40	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
41	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
42	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
43	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
44	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
45	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
46	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
47	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S

48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
49	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
51	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S
52	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
53	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
54	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
55	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
56	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
57	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
58	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
59	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
60	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

En la tabla 13 se observan los resultados del análisis de susceptibilidad expresados en forma cualitativa de acuerdo al fenotipo de resistencia mostrado por cada aislamiento en las dos concentraciones evaluadas para los medicamentos incluidos en el estudio.

Se pudo evidenciar en esta fase del proceso una resistencia extensiva entre los aislamientos MDR del 5% de la muestra bajo estudio, hallándose tres aislamientos que presentan resistencia a la rifampicina, isoniazida, ofloxacina, kanamicina o amikacina, estos son el 44, 45 y el 48 (Tabla 13). Se observó también que el aislamiento 51 aunque no presenta el patrón necesario para ser clasificado como XDR, exhibe una polirresistencia significativa destacándose la resistencia a aminoglicósidos, fármacos de gran importancia en el tratamiento para TB resistentes a agentes de primera línea.

5. DISCUSIÓN GENERAL

La tuberculosis, siendo una enfermedad con alta probabilidad de cura, sigue representando un grave problema a nivel de salud pública, y no obstante los avances alcanzados en el diagnóstico de la susceptibilidad a los medicamentos, la incidencia de la enfermedad aumenta anualmente así como la aparición de formas resistentes, lo cual se ve reflejado en la problemática actual en donde se teme que se puedan llegar a tener comunidades con TB difícil de tratar (30).

La aparición de aislamientos resistentes a fármacos antimicobacterianos, en especial la aparición de TB MDR, crea la necesidad de recurrir a los medicamentos de segunda elección (62). El uso de estos medicamentos trae consigo varias implicaciones como lo son una baja efectividad en comparación con los medicamentos de primera línea, sin mencionar otras desventajas relacionadas con su alto costo, difícil acceso y efectos secundarios (77). Debido al problema que representa esto para los programas de control y vigilancia de la enfermedad, es necesario tomar medidas al respecto como lo son la creación de vacunas, nuevos medicamentos y nuevas herramientas diagnósticas que permitan la detección temprana de aislamientos resistentes a medicamentos de primera y segunda línea, con el propósito de disminuir la carga de la enfermedad, cortando la cadena de transmisión de aislamientos MDR y XDR (60, 62, 83).

Como ya se discutió previamente, existen diferentes metodologías que permiten determinar la susceptibilidad a los medicamentos tanto de primera como de segunda línea, sin embargo la mayoría de estas metodologías presentan problemas de complejidad, tiempo, costos y eficacia, lo cual las pone en desventaja frente al problema de farmacorresistencia que se vive en la actualidad (62).

La implementación de una metodología para la determinación de susceptibilidad debe ser evaluada por cada país de acuerdo a sus necesidades y recursos; los métodos propuestos en los últimos años para tal fin incluyen estudios fenotípicos y genotípicos, siendo los primeros bastante económicos y de fácil realización en comparación con los que manejan material genético, ya que aunque tienen la ventaja de ser rápidos y de aplicación directa a muestras clínicas, suelen requerir personal y equipos especializados lo que aumenta los costos, además no todos los mecanismos moleculares de resistencia a los medicamentos son conocidos, lo cual los pone en desventaja con las demás metodologías (60).

De acuerdo a la situación actual de la TB y la aparición de MDR y XDR en todas las regiones del mundo, es pertinente tratar de reemplazar las metodologías convencionales por otras que disminuyan el tiempo de emisión de resultados y que además no sean complejas y ni costosas. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que los métodos colorimétricos se presentan como un panorama prometedor en el campo del diagnóstico de

susceptibilidad, teniendo como sus principales ventajas la buena concordancia con los métodos de referencia (53, 54, 59, 60, 68), la rápida emisión de resultados y la disminución de costos en comparación con otras metodologías como las genotípicas, lo cual hace de las pruebas MABA, TEMA y REMA, buenos candidatos especialmente para los países en vía de desarrollo. Dentro de los métodos colorimétricos, TEMA y REMA podrían representar una respuesta ante la problemática de farmacorresistencia ya que está respaldada por varios estudios que muestran altos porcentajes de sensibilidad y especificidad, lo cual traería aportes representativos para los programas de control de la tuberculosis, sobre todo en países en vía de desarrollo donde aún se utiliza el método de las proporciones múltiples como “Prueba de Oro”.

Para efecto de lo anterior, REMA y TEMA fueron propuestas en este estudio para el diagnóstico de TB MDR y TB XDR, de tal manera que se les realizó las pruebas que para nosotros fueron pertinentes realizar en función de determinar la eficacia de las pruebas y su utilidad en el país. Durante las primeras dos fases del estudio se pudo determinar que TEMA y REMA son metodologías eficientes y versátiles en cuanto a la detección de TB MDR y TB XDR. No obstante, para llevar a cabo esta tercera fase, la decisión de realizar los ensayos utilizando TEMA obedeció a que TEMA fue la metodología utilizada en la primera fase para la evaluación de concordancia del método colorimétrico con el método de referencia utilizado en el país,

arrojando excelentes resultados y TEMA a diferencia de REMA, permite determinar con mayor certeza cuándo un aislamiento es sensible o resistente, debido a que es más fácil distinguir el cambio de color del MTT que el del resazurín que da tonalidades intermedias, y que en algunos casos podría dar origen a falsos positivos, poco convenientes para este estudio puesto que se pretende emitir datos formales que se tomen en cuenta y que generen inquietud en las autoridades nacionales e internacionales en resistencia en TB.

Dentro de las grandes expectativas de este trabajo no sólo estaba buscar una manera eficiente de realizar diagnóstico de susceptibilidad sino también el poder generar datos significativos que puedan contribuir con los programas de control de la enfermedad en el país. Colombia en la actualidad no cuenta con un número exacto de casos XDR y con este estudio aunque no se pudo obtener un dato preciso, al estudiar parte de la población MDR se podría decir que el dato estimado de XDR en los aislamientos MDR de Colombia es del 5%, e incluso extrapolar esta cifra a la situación de TB XDR que podría estar viviendo actualmente el país. Con lo anterior se contribuye no sólo a los datos nacionales de resistencia sino también se está realizando un aporte importante a la documentación XDR del mundo.

7. CONCLUSIONES

El protocolo de TEMA empleado en la primera fase del estudio para el diagnóstico de resistencia a isoniazida y rifampicina en aislamientos de *M. tuberculosis* colombianos, mostró una buena eficiencia frente al método de las proporciones múltiples en términos de sensibilidad, especificidad, y rapidez demostrando que TEMA es una buena respuesta a la necesidad de detección temprana de TB MDR en el país y podría utilizarse para el diagnóstico de susceptibilidad en pacientes que no respondan al esquema de tratamiento de primera línea, lo que permitiría la administración a tiempo de un esquema ajustado, evitando de esta manera la dispersión de aislamientos resistentes.

Durante la segunda fase del estudio, se determinó que las pruebas colorimétricas TEMA y REMA permiten con calidad y oportunidad la detección de resistencia a isoniazida, rifampicina, ofloxacina, kanamicina, amikacina y capreomicina, contribuyendo en la detección temprana y confiable de TB MDR y TB XDR. En la segunda etapa también se realizó la comparación de la eficiencia de las dos metodologías colorimétricas REMA y TEMA, determinando una concordancia absoluta entre ellas (Anexos 3 y 4). La adaptación de los protocolos de TEMA y REMA son opciones viables para la detección de MDR y XDR en *M. tuberculosis*.

Se concluye de esta segunda fase que TEMA y REMA representan una alternativa con gran potencial para la detección de resistencia en Colombia y en áreas geográficas similares que no contemplan el diagnóstico de susceptibilidad a medicamentos de primera y segunda línea como procedimientos de rutina, permitiendo la realización del diagnóstico de manera continua y descentralizada, para lograr de esta manera un mayor impacto en el manejo oportuno de los pacientes y en las medidas a tener en cuenta para el control de la diseminación de casos resistentes en cada país.

Es preciso resaltar que la lectura de las placas de TEMA es menos compleja que la lectura de los ensayos de REMA debido a que estos últimos presentan coloraciones intermedias que en algunos casos pueden dar origen a confusiones mientras que en el caso de TEMA, la variación de un color amarillo a un púrpura es bastante evidente y no hay colores intermedios lo que permite expresar con mayor certeza cuándo un aislamiento es sensible o resistente. El protocolo de TEMA para la evaluación de TB MDR y TB XDR, es bastante promisorio en el ámbito del diagnóstico de susceptibilidad en TB, incluso podría convertirse en una de las primeras opciones de diagnóstico temprano de resistencia a ser utilizado no sólo en los laboratorios de referencia sino también en laboratorios departamentales e incluso municipales.

En la tercera fase del estudio se estableció un patrón de susceptibilidad a medicamentos de primera y segunda línea en aislamientos de *M.*

tuberculosis basado en los conceptos de TB MDR y TB XDR. En los ensayos realizados durante esta etapa se determinó la presencia de un 5% de resistencia extensiva en los aislamientos bajo estudio. Estos hallazgos permiten decir que de la población de pacientes MDR del país, cerca de un 5% también está presentando un perfil de TB XDR. Es importante aclarar que los anteriores resultados no fueron corroborados por el método de referencia debido a que en el país no se realiza susceptibilidad a medicamentos de segunda línea, sin embargo, estos permiten tener una visión global de la situación de XDR a nivel nacional y con esto se espera llamar la atención de las autoridades en el tema con el fin de que se implementen medidas frente a esta situación tales como la introducción de nuevas alternativas diagnósticas como TEMA y REMA, permitiendo la detección temprana de casos XDR para quienes actualmente las alternativas de tratamiento son reducidas, pues las micobacterias han ido desarrollado mecanismos de resistencia a los medicamentos disponibles y en general a los más efectivos.

Las metodologías de REMA y TEMA han sido ampliamente estudiadas durante los últimos años (23). Los estudios realizados para las dos pruebas tanto en medicamentos de primera como de segunda línea han demostrado la eficiencia de las dos pruebas en el diagnóstico de susceptibilidad, demostrando en términos de sensibilidad, especificidad y concordancia que pueden llegar a utilizarse en el área diagnóstica en TB. La introducción del

nuevo esquema de placa planteado para las dos metodologías bajo estudio, es un paso importante en la generación y contribución a la solución de un problema mundial con la implementación de metodologías sencillas y versátiles, ya que permite obtener resultados en tan sólo 7 días, permite evaluar tres aislamientos por placa y es de fácil interpretación.

Los resultados obtenidos en la primera y segunda fase que muestran la eficiencia de TEMA y REMA, en conjunto con los obtenidos durante la tercera etapa de la tesis, nos permiten realizar un llamado de atención a las autoridades nacionales en resistencia en TB, para que contemplen la posibilidad de realizar pruebas piloto o tomar las medidas necesarias que permitan confirmar los datos de XDR hallados en la población MDR bajo estudio. Asimismo, mediante la publicación de los resultados se está aportando nueva información y nuevos datos, para que TEMA y REMA sean propuestos como posibles métodos de referencia en la búsqueda de metodología eficaces para el diagnóstico de susceptibilidad en TB.

Por último se recomienda continuar con varios estudios de este tipo incluyendo en lo posible todos los casos MDR hallados en el estudio de resistencia mediante el uso de estas técnicas colorimétricas pero también implementando el método de las proporciones múltiples, no sólo para determinar la veracidad y eficacia de las metodologías objeto de este estudio, sino también con el propósito de conocer un dato más aproximado

de TB XDR en el país y así tomar medidas frente este problema, sobre todo a nivel de la detección temprana de resistencia.

El principal aporte de este trabajo fue la adaptación de las metodologías colorimétricas TEMA y REMA a un esquema que permite determinar en una sola prueba la susceptibilidad de un aislamiento de *M. tuberculosis* a rifampicina e isoniazida, agentes antimicobacterianos de primera línea y a amikacina, kanamicina, ofloxacina y capreomicina, agentes de segunda línea.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abate, G., R. Mshana, and H. Miörner.** 1998. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*; 2(12):1011–6.
2. **Akobeng, A.** 2006. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Pædiatrica*; 96: 338 – 41.
3. **Albert, H., Heyderyde, A., Mole, R., Trollip, A., and Blumberg, L.** 2001. Evaluation of fast plaque TB-RIF TM, a rapid, manual test for the determination of rifampicina resistance from *M. tuberculosis* cultures. *Int J Tuberc Lung Dis*; 5 (10): 906-11
4. **Altet, N.** 2007. Protocolos de Patología respiratoria: Tuberculosis pulmonar: diagnóstico y tratamiento en el 2007. *Bol Pediatr*, 47(2): 29-37.
5. **Angeby, K.A., Klintz, L., and Hoffner, S.E..** 2002. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J Clin Microbiol*; 40: 553-5.
6. **Ardito, F., B. Posteraro, M. Sanguinetti, S. Zanetti, and G. Fadda.** 2001. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*; 39: 4440-4.

7. **Astudillo, V., and I. Cantor.** 1981. El problema de la validez de una prueba diagnóstica para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificación. *Bol. Centro Panamericano Fiebre Aftosa*; 43 -34: 37 - 93.
8. **Banerjee, A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K.S. Um, and T. Wilson, et al.** 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*; 263:227-30.
9. **Beck J. R., and Shultz E. K.** 1986. The use of relative operating characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Arch. pathol. lab. Med*; 110:13-20.
10. **Bentwich, Z., G. Maartens, D. Torten, A.A. Lal, and R.B. Lal.** 2000. Concurrent infections and HIV pathogenesis. *AIDS*.14:2071-81.
11. **BioSource International, Inc.** Alamar blue™ ordering information. Catalog number DAL 1100.
12. **Canetti, G., S. Froman, J. Grosset, P. Hauduroy, M. Langerova, H. T. Mahler, G. Meissner, D. A. Mitchison, and L. Sula.** 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull. W. H. O.*;29:565–78
13. **Canetti, G., W. Fox, A. Khomenko, H. T. Mahler, N. K. Menon, D. A. Mitchison, N. Rist, and N. A. Smelev.** 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. *Bull. W. H. O.*; 41:21–43.

14. **Castiblanco C.A., and W.Ribón.** 2006. Coinfección de tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA: un análisis según las fuentes de información en Colombia. *Infectio*; 10(4): 232-42
15. **Castiblanco CA, Llerena C.** 2008. Tuberculosis en Colombia: análisis de la situación epidemiológica, año 2006. *Infectio*; 12(3): 159-73.
16. **Caviedes, L., Lee, T.S., and Gilman, R.H.** 2000. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol*; 38: 1203-8.
17. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2007. Extensively drug-resistant tuberculosis – United States, 1993-2006. *MMWR*; 56:250-3.
18. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2006a. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs - Worldwide, 2000-2004. *MMWR*; 55:301-8.
19. **Chintu, C., C. Luo, G. Bhat, M. Raviglione, H. DuPont, and A. Zumla.** 1993. Cutaneous hypersensitivity reactions due to thiacetazone in the treatment of tuberculosis in Zambian children infected with HIV-1. *Arch. dis child.*; 68: 665-8.
20. **Cohen, I.** 2002. Caracterización de eventos involucrados en la resistencia a rifampicina de cepas colombianas de *Mycobacterium tuberculosis* (tesis). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

21. **Cohen T, Sommers B, Murray M.** 2003. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis*; 3:13-21.
22. **Coll, P.** 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21:299-308.
23. **De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G.** 2006. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev*; 30: 36-52.
24. **Dickinson, J.M., and D.A. Mitchison.** 1981. Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in the chemotherapy of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*; 123: 367-71.
25. **Djiba, M.L., A.I. Sow, M. Ndiaye, and J.A. Dromigny.** 2004. Evaluation of E-test method in determination of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four antituberculosis drugs. *Dakar Med*; 49(3):185-91.
26. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*;61(3):377-92.
27. **Fisher, M.** 2002. Diagnosis of MDR-TB: a developing world problem on a developed world budget. *Expert Rev. Mol. Diagn*; 2(2): 151-9.
28. **Gandhi, N.R., A. Moll, and A.W. Sturm.** 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*, 368: 1575-

29. **Garzón, M.C., N. Naranjo, C. Sierra, C. Llerena, D. Orjuela.** 2002. Bacteriología del *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas. Manual de procedimientos. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
30. **Garzón, M.C., D.Y. Angée, C. Llerena, D. Orjuela.** 2006. Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los medicamentos. Colombia 2004-2005. Informe final. Instituto Nacional de Salud - Laboratorio de Micobacterias. Ministerio de la Protección Social. Secretarías de Salud Departamentales y Distritales. OPS/OMS. http://www.ins.gov.co/pdf/rnl/informe_final_EVR_2004_2005.pdf
31. **Gillespie SH.** 2002. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*;46:267-74.
32. **Girling, D.J.** 1984. The role of pyrazinamide in primary chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Tubercle*; 65:1-4.
33. **Heifets, L.B., and G.A. Cangelosi.** 1999. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. *Int J Tuberc Lung Dis*; 3: 564-81.
34. **Heifets, L.** 2000. Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Multidrug-resistant Tuberculosis, Ed.: Bastian I, Portaels F. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Use of received operating characteristics curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*; 22: 21-7.

43. **Madison, B., B. Robinson-Dunn, George I, W. Gross, H. Lipman, B. Metchock, et al.** 2002. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3976-9.
44. **Maeda H., S. Matsu-Ura, Y. Yamauchi, and H. Ohmori.** 2001. Resazurin as an electron acceptor in glucose oxidase-catalyzed oxidation of glucose. *Chem. Pharm. Bull.*; 49(5):622-5.
45. **Martin, A., M. Camacho, F. Portaels, and J.C. Palomino.** 2003. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(11): 3616–9
46. **Martínez-Cambor P.** 2007. Comparación de pruebas diagnósticas desde la curva ROC. *Rev Colomb Estad*; 30(2): 163-76.
47. **Mejía, G.I., Guzmán, A., Agudelo, C.A., Trujillo, H., and Robledo, J.** 2004. Cinco años de experiencia con el agar de capa delgada para el diagnóstico rápido de tuberculosis. *Biomédica*; 24(1)
48. **Mengatto, L., Y. Chiani and M. Susana.** 2006. Evaluation of rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 101: 535-42.

49. **Ministerio de la Protección Social.** 2006. Actualización Análisis de la Situación de la Tuberculosis en Colombia. Noviembre de 2006. Resultados e Indicadores en Salud Pública. www.minproteccionsocial.gov.co
50. **Ministerio de la Protección Social.** 2007. Guía de Atención de la Tuberculosis Pulmonar y Extrapulmonar. Tomo II. Guías de promoción de la salud y prevención de las enfermedades en la salud pública.
51. **Miranda, J., R. Ríos, S. Mattar y N. Alvis.** 2008. Concordancia de métodos para susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Montería, Córdoba: tubo indicador de crecimiento micobacteriano vs. método de las proporciones múltiples. *Colomb Med*; 39: 147-53.
52. **Mitchison, D.A.** 2005. Drug resistance in tuberculosis. *Eur Respir J*; 25: 376–9
53. **Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A., Portaels, F., and Palomino, J.C.** 2005. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 55: 500–5
54. **Morcillo, N., B.Di Giulio, B. Testani, M. Pontino, C. Chirico, and A. Dolmann.** 2004. A Microplate Indicator-based method for determining

- Drug-Susceptibility of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. *Int J Tuberc Lung Dis.* 8() 253-259.
55. **Mossman T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65:55-63.
56. **Musser, J.M.** 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:496–514.
57. **O’Brien J., Wilson I., Otor T., and Pognan F.** 2000. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*; 267:5421-6.
58. **Pai, M., and Kalantri, S.P.** 2005. Bacteriophage-Based tests for tuberculosis. *Indian J Med Microbiol*; 23(3):149-50
59. **Palomino, J.C., and Portaels, F.** 1999. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 18: 380-3.
60. **Palomino, J.C., A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, and F. Portaels.** 2002. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 46(8a): 2720–2
61. **Palomino, J.C.** 2005. Non conventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J*; 26:1-12.

62. **Palomino, J.C., S.C Leño, and V. Ritacco.** 2007. Tuberculosis 2007. First Edition. www.Tuberculosisistextbook.com.
63. **Parsons LM, Somoskövi A, Urbanczik R, Salfinger M.** 2004 Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. *Front Biosci*;1:2086-105.
64. **Pfyffer, G.E., H.M. Welscher, and P. Kissling.** 1997. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol*; 35: 364-8.
65. **Pfyffer, G.E., D.A. Bonato, and A. Ebrahimzadeh.** 1999. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. *J Clin Microbiol*; 37: 3179-86
66. **Pino, P.P., C. Gassiot, J.C. Rodríguez, I. Páez, J. Barreto, and J. Gundián.** 1998. Tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples drogas. *Acta médica*;8(1):110-7
67. **Pontino M. V., Di Giulio, B., Fernández, C., Imperiale, B., Bodon, A., and Morcillo, N.** 2006. Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Argent. Microbiol*; 38(3):.145-51.
68. **Porras T.B., C.I. León, M.I. Guerrero, A. Martin, F. Portaels, and J.C. Palomino.** 2005. Evaluación de métodos fenotípicos y

- genotípicos para la detección de farmacoresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica*; 25:22-33.
69. **Quirós-Roldán, E., M. Airoidi, F. Moretti, and G. Carosi.** 2001. Temas de Actualidad. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Diagn Biol*; 50(4): 200-3.
70. **Raviglione, M., and I. Smith.** 2007. XDR Tuberculosis---Implications for Global Public Health. *N. Engl. j. med*; 356(7): 656-9.
71. **Rivoire, N., P. Ravololonandriana, T. Rasolonavalona, A. Martin, F. Portaels, H. Ramarokoto, and V.R. Razanamparany.** 2007. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis*; 11(6):663-88.
72. **Seth, V., S.D. Seth, O.P. Semwal, and V. D'monty.** 1990. Adverse drug reactions to streptomycin-a reappraisal. *Indian Dermatol Venereol Leprol*; 5(4): 273-7.
73. **Siddiqi, S.H., Libonati, J.P., and Middlebrook G..** 1981. Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*; 13:908–12.
74. **Soto, A. and L.S. Zerpa.** 2004. Tuberculosis e Infección por VIH/SIDA. *Revista de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Ricardo Palma*; 4(1): 26-9

75. **Telenti, A., P. Imboden, and F. Marchesi.** 1993a. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341: 647-50.
76. **Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini, and T. Bodmer.** 1993b. Direct, automated detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother*, 37:2054-8.
77. **Tobón, A.** 2001. Tratamiento de la Tuberculosis Multirresistente. *Infectio*; 5(4): 260-265
78. **Wallace, J.** 2000. Antimycobacterial agents. Mandell G, editor. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone; p. 436-48.
79. **Wayne, L.G.** 1974. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*;109:147-51.
80. **WoldeMeskel, D., G. Abate; M. Lakew, S. Goshu, A. Selassie, H. Miorner, and A. Aseffa.** 2005. Evaluation of a direct colorimetric assay for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Ethiop.J.Health Dev* ; 19(1):51-4.
81. **World Health Organization.** 2003. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. 3rd edition. Geneva.

82. **World Health Organization.** 2004. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report n°3, prevalence and trends. Geneva. World Health Organization; WHO/HTM/TB/2004.343.
83. **World Health Organization.** 2006. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; WHO/HTM/TB/2006.361
84. **World Health Organization.** 2007. The Global MDR-TB y XDR-TB Response Plan 2007-2008. WHO/HTM/TB/2007.387.
85. **World Health Organization.** 2009. Global tuberculosis control: Epidemiology, Estrategy and Financing. WHO Report 2009. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2009.411)
86. **Zhan, Y.** 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45:529-64.
87. **Zumia, A., and J. M. Grange.** 2001. Multidrug-resistant tuberculosis—can the tide be turned? *Lancet Infect. Dis*; 1:199–202.
88. **Zweig M. H., Campbell G.** 1993. Receiver-Operative characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*; 39(4):561-77.

8. ANEXOS

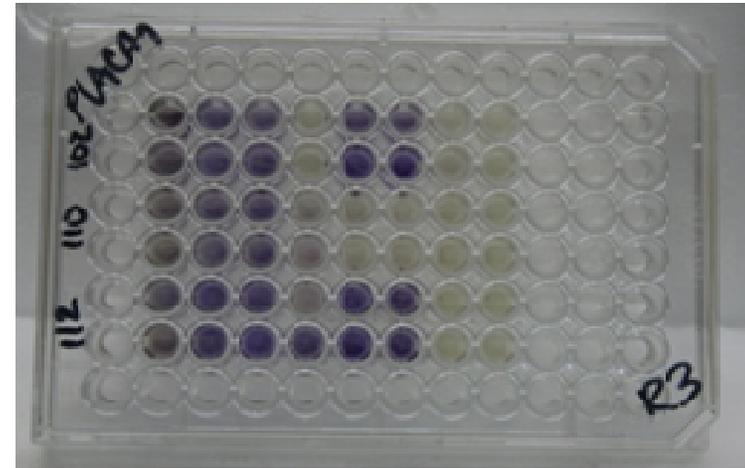
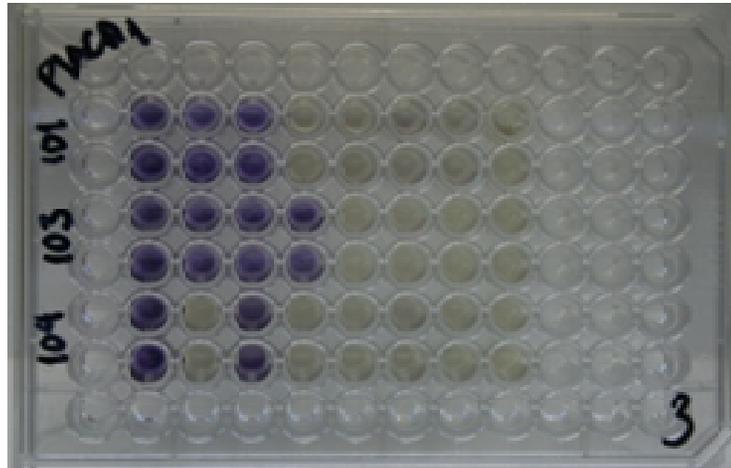
ANEXO 1: comparación de resultados obtenidos en el INS para TEMA y REMA con los obtenidos por el ITM por proporciones múltiples.

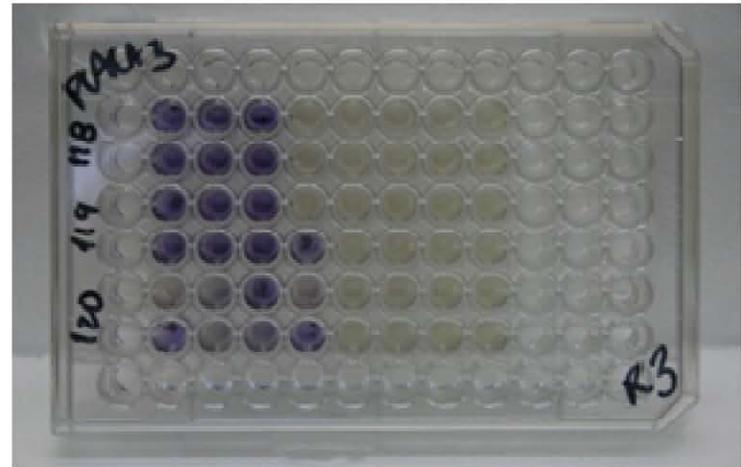
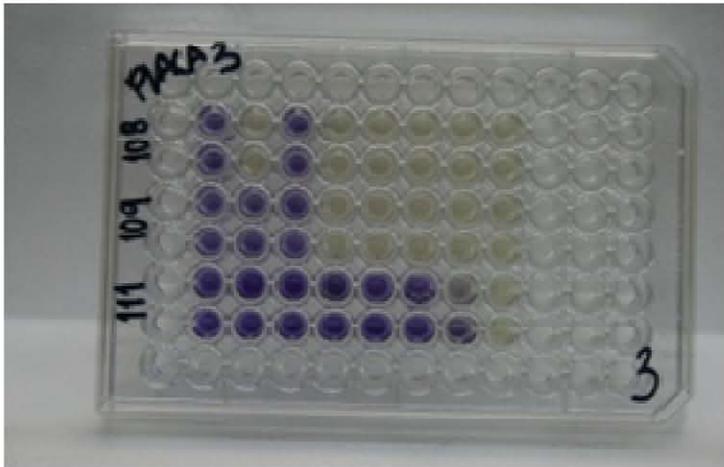
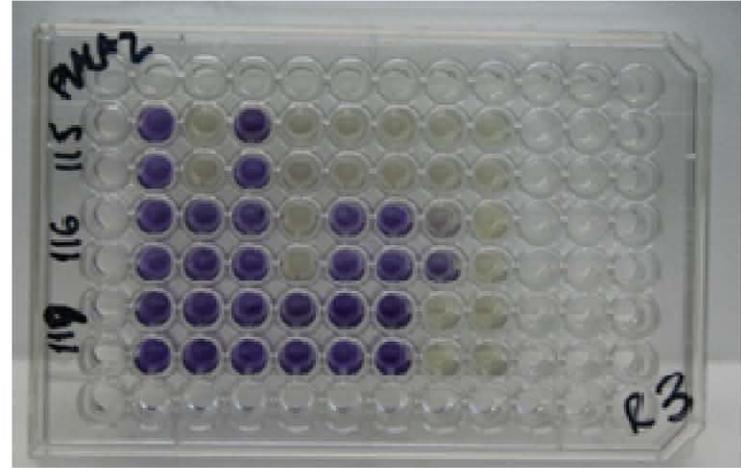
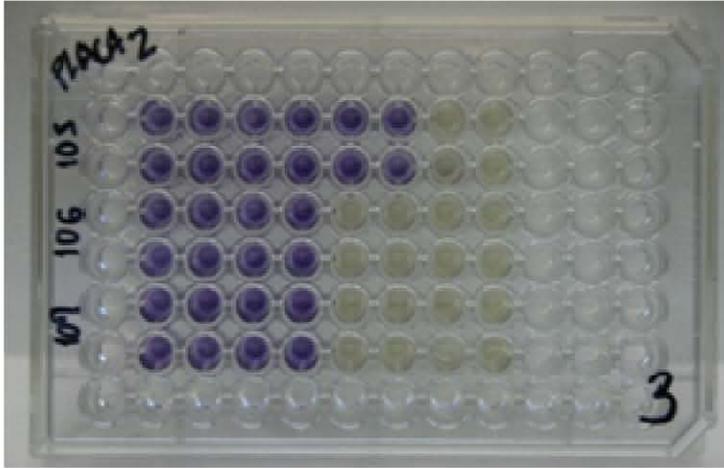
Código	RIF		INH		OFLOX		KAN		AMK		CAP	
	INS	PM	INS	PM	INS	PM	INS	PM	INS	PM	INS	PM
101	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
102	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
103	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
104	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
105	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
106	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
107	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
108	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
109	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
110	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
111	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
112	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
113	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
114	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
115	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
116	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
117	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
118	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
119	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
120	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
121	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
122	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
123	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
124	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
125	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
126	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
127	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
128	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
129	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
130	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

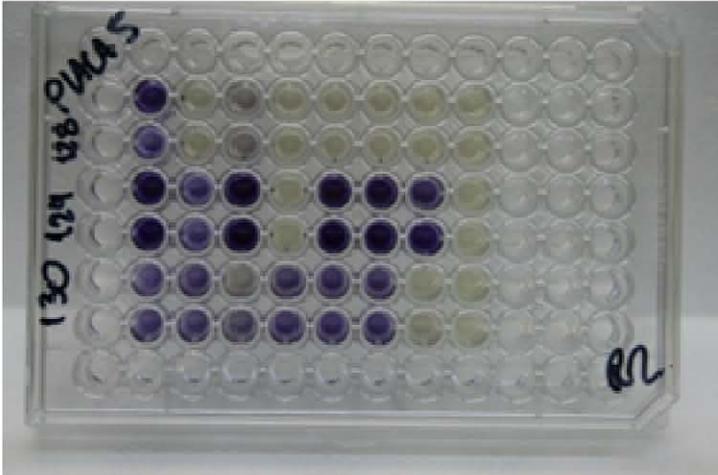
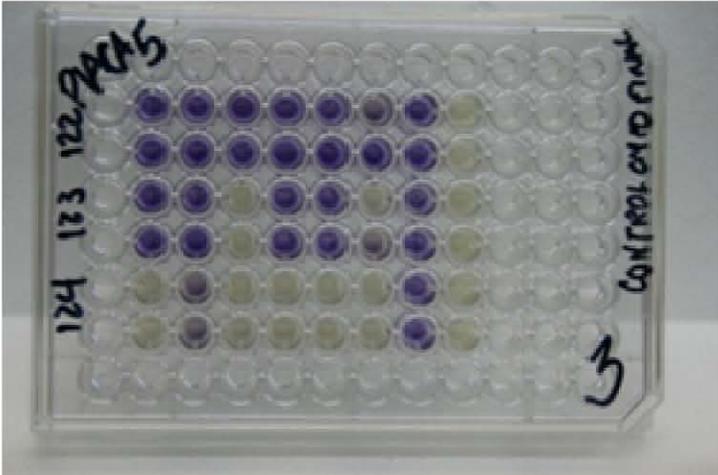
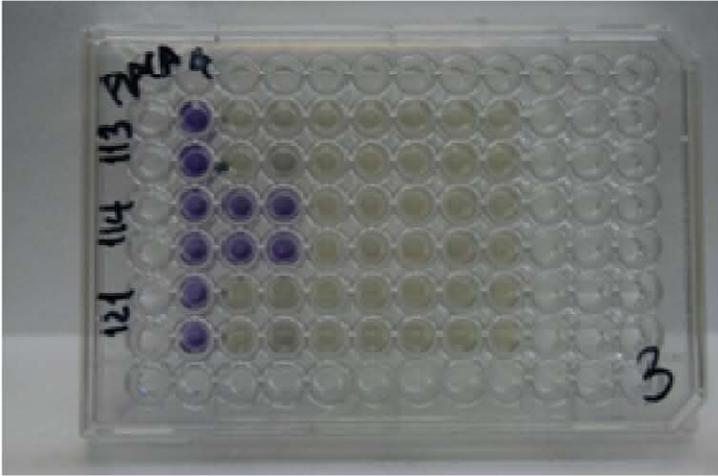
Código	INS		ITM		INS		ITM		INS		ITM		INS		ITM		INS		ITM		INS		ITM	
	RIF (µg/ml)		RIF (µg/ml)		INH (µg/ml)		INH (µg/ml)		OFLO (µg/ml)		OFLO (µg/ml)		KAN (µg/ml)		KAN (µg/ml)		AMK (µg/ml)		AMK (µg/ml)		CAP (µg/ml)		CAP (µg/ml)	
	1,00	0,50	1,00	0,50	0,50	0,25	0,50	0,25	4,00	2,00	4,00	2,00	5,00	2,50	5,00	2,50	10,00	5,00	10,00	5,00	5,00	2,50	5,00	2,50
101	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
102	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
103	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
104	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
105	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
106	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
107	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
108	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
109	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
110	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
111	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
112	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
113	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
114	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
115	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
116	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
117	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
118	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
119	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
120	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
121	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
122	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
123	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
124	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
125	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
126	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
127	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
128	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
129	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
130	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R

ANEXO 2: comparación de resultados obtenidos por TEMA y REMA en INS con los obtenidos para REMA por el ITM en el estudio de TB MDR y TB XDR.

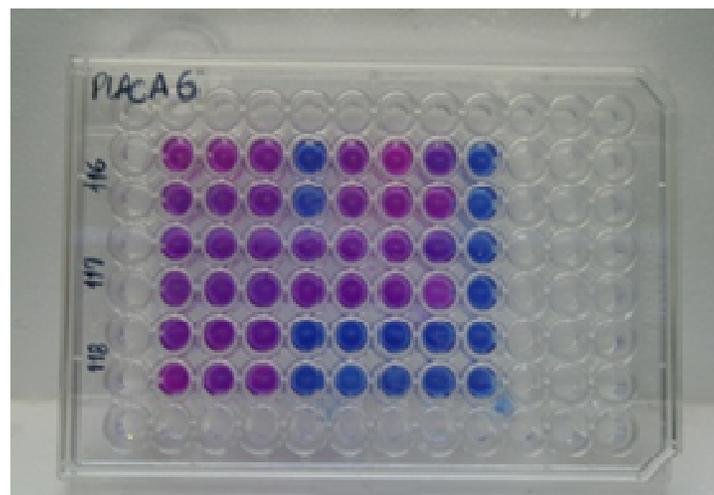
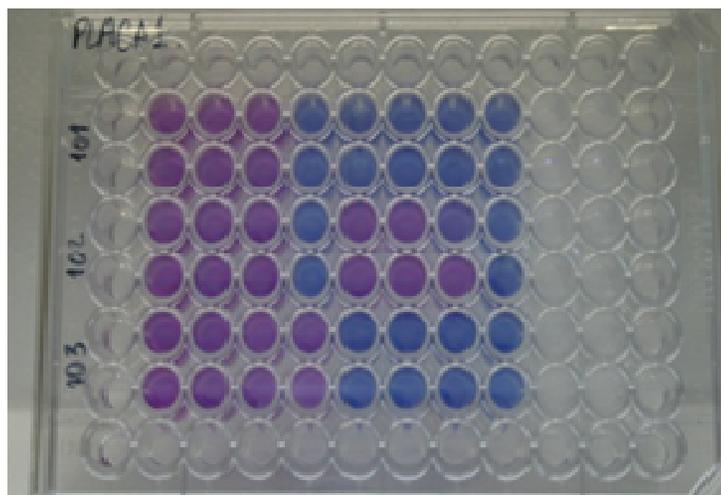
ANEXO 3: fotografías correspondientes a las placas procesadas por TEMA para la segunda fase del estudio.

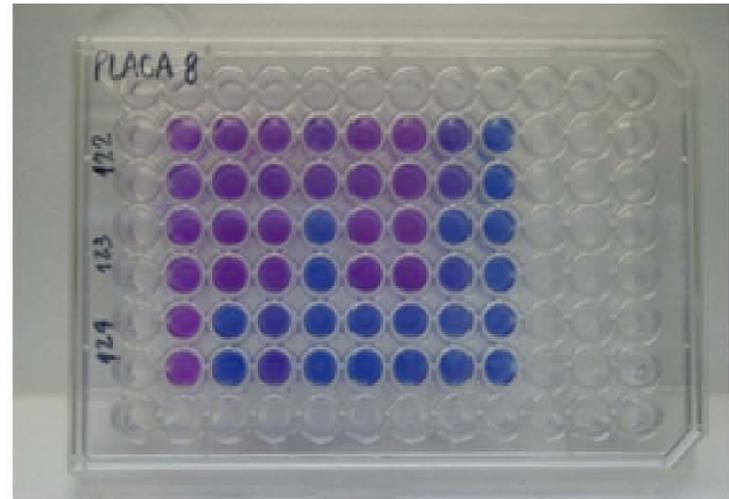
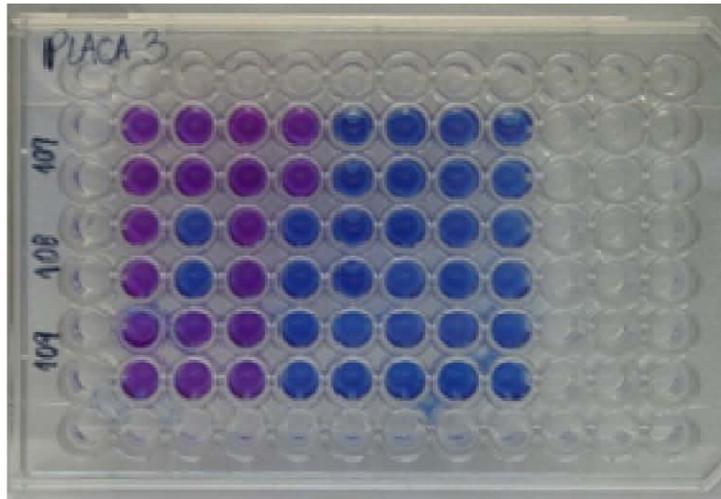
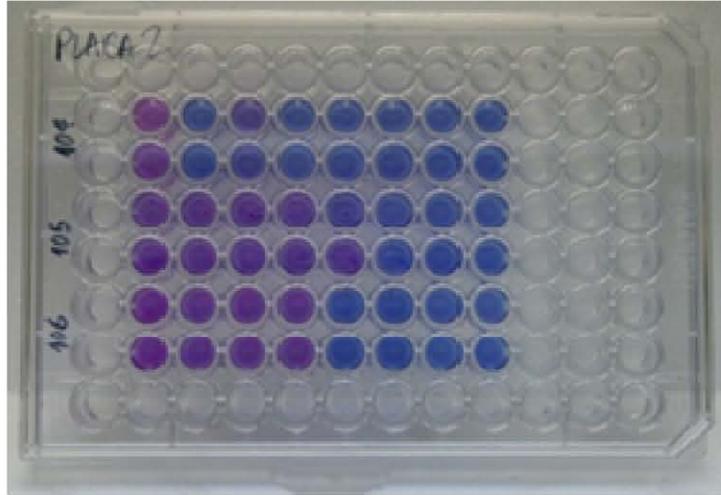


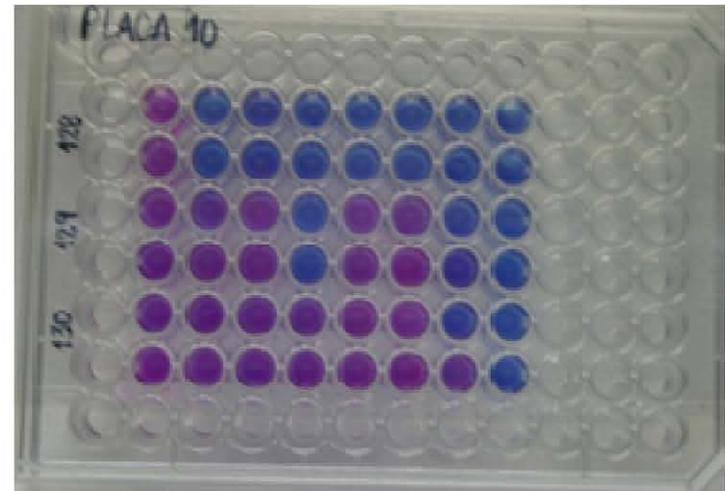
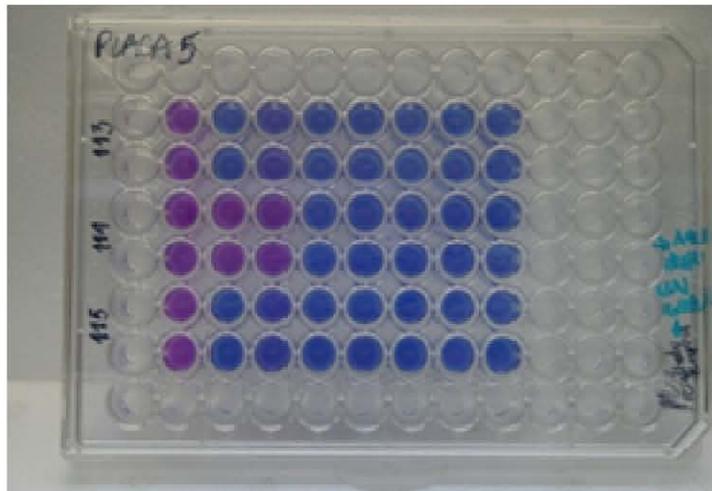
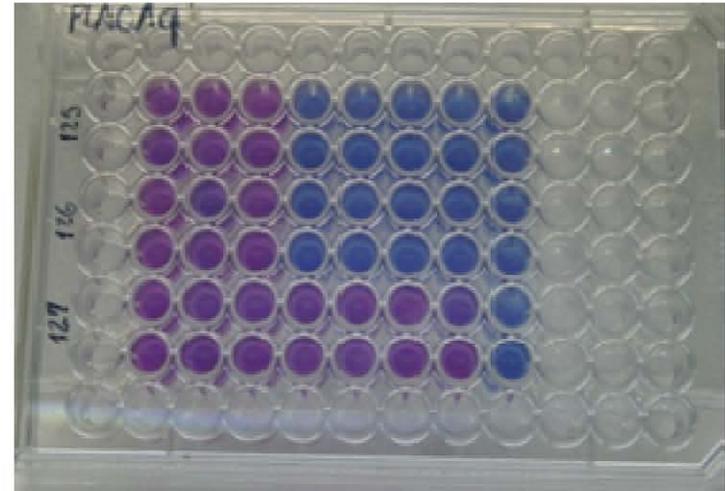




ANEXO 4: Fotografías correspondientes a las placas procesadas por REMA para la segunda fase del estudio.







ANEXO 5: fotografías de las placas procesadas por TEMA para la tercera fase del estudio en que se realizó el análisis de 60 aislamientos MDR de *M. tuberculosis* colombianos.

