



Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en
Tuberculosis y Mycobacteria. Centro Colaborador
OPS/OMS

**Nuevos aportes al conocimiento en Cuba de la
resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas
antibacilares.**

*Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Médicas*

Dr. Ernesto H. Montoro Cardoso, MSe

*Ciudad de La Habana
2003*

IPK
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

**Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y
Mycobacteria. Centro Colaborador OPS/OMS**

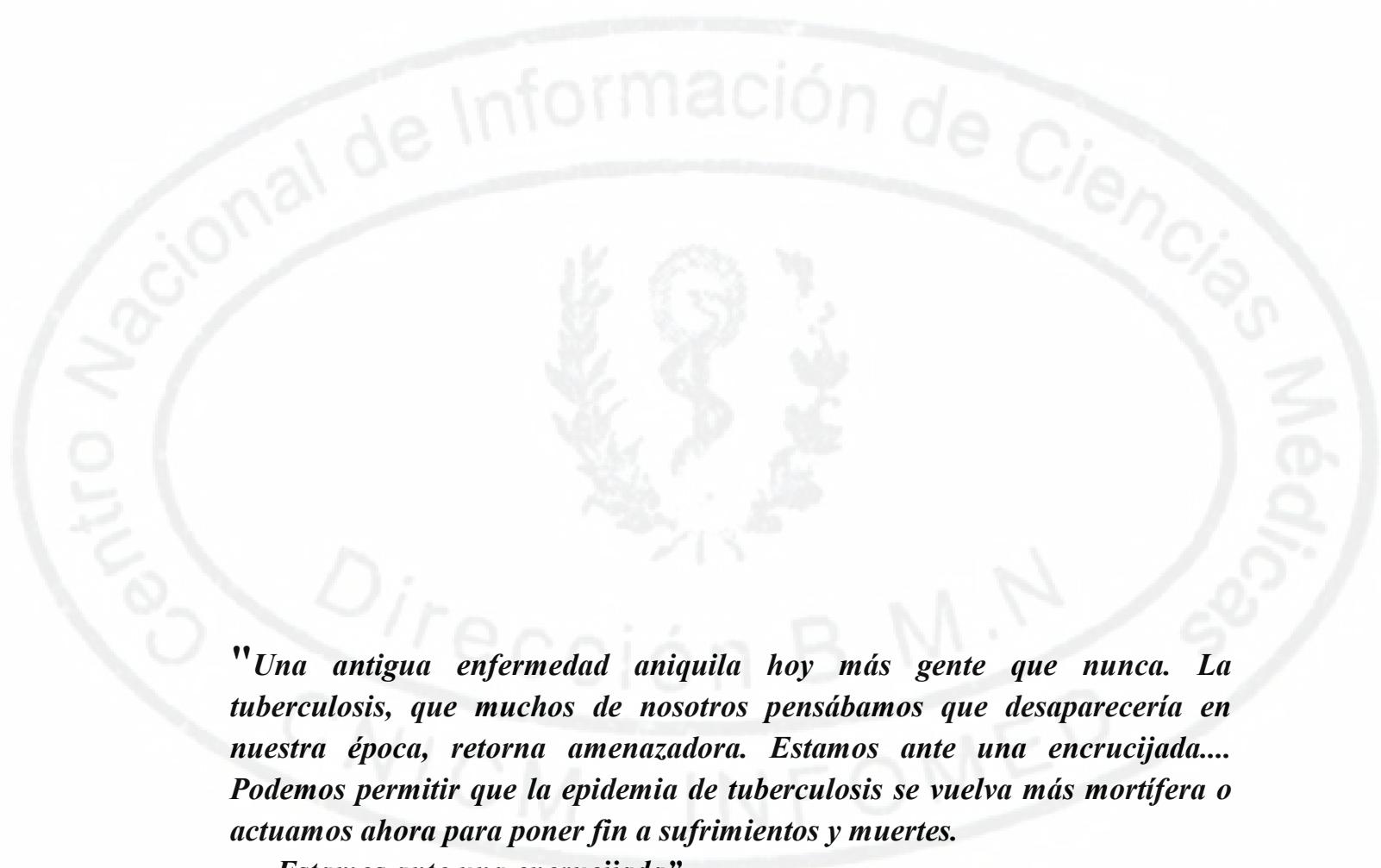
**Nuevos aportes al conocimiento en Cuba de la resistencia
de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antibacilares.**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dr. Ernesto H. Montoro Cardoso, MSe

***Asesores: Dr. José A. Valdivia Alvarez, D Cs
Dr. Edilberto González Ochoa, Dr C
Dr. Juan C. Palomino, Ph D***

*Ciudad de La Habana
2003*



G. "Harlem Brundtland, M.D. Director OMS, 1998.

Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS

La culminación de una Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Medicas lleva implícito el agradecimiento a un número infinito de personas que han contribuido en la formación como profesional e investigador; a todos aquellos que hicieron posible llegar a este momento quisiera expresarles mis más sinceros agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mi asesor el Prof. José A. Valdivia, por haber confiado en mí, por su formación durante todos estos años y por haberme transmitido sus valiosos conocimientos y experiencia en este fascinante tema de la Tuberculosis.

Al Tec. Miguel Echemendía por su incalculable ayuda, amistad y experiencia. Sin su constante y ejemplar labor no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la Dra Alina Llop, por el apoyo recibido en todo momento para contribuir a mi formación, por todos los conocimientos que me ha aportado, por el estímulo impulsor recibido para seguir hacia adelante y por la confianza que ha mostrado en mí.

A los integrantes del Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis del IPK por todos los años juntos de trabajo y en especial a la Lic. Dihadenys Lemus por su ayuda, inteligencia y capacidad para poder enfrentar cualquier tarea.

Al colectivo de investigadores del Dpto de Bacteriología-Micología del IPK por todos los años en que hemos laborado y especialmente para aquellos que han contribuido a mi formación.

Al Prof. Gustavo Kourí, por ser ejemplo de investigador, por el apoyo recibido en mi formación y por sentirme orgulloso de trabajar en un centro tan prestigioso como es el IPK.

A los miembros de RELACTB, por el apoyo recibido para continuar trabajando y por las posibilidades de superación, especialmente quiero agradecer al Dr. Juan C. Palomino, asesor de esta tesis y Coordinador de RELACTB y a los Dres. Iris Estrada, Sylvia Leao y Jorge González con los cuales pude realizar estancias de trabajo.

A los cros. de la Subdirección Docente, especialmente a la Dra. Nereyda Cantelar por todo el apoyo recibido durante los años de la Residencia de Microbiología y durante la realización de esta Tesis Doctoral, también agradezco a la Lic. Maribel Chao y a la Lic. Beatriz Cantelar.

Al Dr. Edilberto González Ochoa por haber aceptado ser asesor de esta Tesis y por las posibilidades de participar en investigaciones conjuntas.

A mis hijos y mi madre, a quien dedico esta tesis.

A mi esposa, por estar a mi lado durante todos estos años, por su apoyo y preocupación para la culminación de este trabajo

Dedicatoria

A mis Hijos: Ernesto y Heydi

A mi madre



SÍNTESIS

Entre las principales causas que ha favorecido el incremento de la Tuberculosis (TB) a nivel *mundial*, se encuentra la aparición y *circulación de cepas multidrogorresistentes* (MDR). Del total de personas que se encuentran infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* (1722 millones), 50 millones lo están con bacilos MDR. Esta situación podría *convertirse en el futuro en una epidemia de TB potencialmente incurable en la gran mayoría del planeta*.

En el presente trabajo se realizó la determinación de las cifras de resistencia (primaria, adquirida, combinada y MDR) a 1379 *cepas de M. tuberculosis procedentes de todo el país* durante el período 1995-1998. Se utilizó el método de las proporciones frente a las drogas antituberculosas de primera línea (isoniacida, rifampicina, estreptomicina y etambutol); *estos resultados forman parte de los dos proyectos mundiales organizados por la OMS/UICTER*. En la primera etapa (1995-96), la Resistencia Primaria (RP) reportada fue de 8,3 % y una MDR de 0,7 %. En el segundo estudio (1997-98) la RP *disminuyó a 6,5 % y la MDR fue de 0 %, sugiriéndose la existencia de una baja circulación de cepas MDR en la comunidad, así como se observó la tendencia descendente de la resistencia en nuestro país*. Como parte de ese proyecto se participó en un proceso de *garantía de la calidad de las pruebas de resistencia*, demostrándose la confiabilidad de las pruebas realizadas.

Se evaluaron dos métodos rápidos (colorimétrico MTT y el Método de la Nitrato *Reductasa*) para la detección de resistencia a las 4 principales drogas *utilizadas en el tratamiento de la TB*. En 38 cepas de *M. tuberculosis* se aplicó el método colorimétrico MTf, determinándose los valores de Concentración Inhibitoria Mínima; los *parámetros de sensibilidad, especificidad y concordancia para el ensayo* se comportaron superior al 90,0 %. En 80 cepas se evaluó el Método de la Nitrato Reductasa, obteniéndose un coeficiente de concordancia de 98,4 %. Los métodos evaluados *resultaron rápidos y de fácil ejecución, recomendándose como métodos alternativos para la detección rápida de resistencia en cepas de M. tuberculosis*.

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. introducción	2
1.2. hipótesis.....	4
1.3. objetivos.....	5
1.4. novedad científica.....	5
1.5. valor teórico	6
1.6. valor práctico	7
CAPÍTULO II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
II.1. situación epidemiológica de la	9
II.2. evolución de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
II.3. taxonomía y características generales de las micobactenias	15
II.4. mecanismo de acción de las principales drogas empleadas en el tratamiento de la TB.....	18
II.5. ¿cómo ocurre la resistencia en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ?	22
II.6. métodos empleados en los estudios de resistencia a las drogas antibacilares.....	24
II.7. diagnóstico de tuberculosis	35
II.8. tratamiento	39
CAPÍTULO III.- MATERIALES Y METODOS.....	42
III. 1. determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de las proporciones	43
III. 2. estudio de garantía de la calidad de las pruebas de resistencia	47
III. 3. análisis y procesamiento estadístico de los resultados	48
III. 4. método colométrico MTT	48
III. 5. determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de la nitrato reductasa	52
CAPÍTULO IV.- RESULTADOS.....	55
IV.1. determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de las proporciones	56
IV.2. estudio de garantía de la calidad de las pruebas de resistencia	60
IV.3. método colométrico MTT	61
IV.4. determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de la nitrato reductasa	65

CAPÍTULO V. - DISCUSIÓN	68
V. 1. determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de las proporciones.....	69
V.2. estudio de garantía de la calidad de las pruebas de resistencia.....	83
V.3 método colorimétricoMTT	86
V.4. determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de la nitrato reductasa	91
CAPÍTULO VI.- CONCLUSIONES.....	94
CAPÍTULO VII- RECOMENDACIONES	97
CAPÍTULO VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
VIII.1. bibiografía	100
VIII.2. bibliografía del autor relacionadas con la tesis.....	123
VIII.3. bibliografía del autor no relacionadas con la tesis	126
VIII.4. presentación en eventos científicos	130
CAPÍTULO IX.- ANEXOS	136

ABREVIATURAS:

- ADN: ácido desoxirribonucleico
CBM: Concentración Bactericida Mínima
ARN: ácido ribonucleico
ATP: trifosfato de adenosina
BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG: Bacilo Calmette-Guérin
BK+: baciloscopía positiva
CBF: Concentración Bactericida Fraccionaria
CC: control de crecimiento
CIF: Concentración Inhibitoria Fraccional
CIM: Concentración Inhibitoria Mínima
CM: control de esterilidad del medio
CPHE: Centro Provincial de Higiene y Epidemiología
DMF: dimetilformamida
DOT: Tratamiento Estrictamente Supervisado
DOTS: Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
ELISA: Ensayo Inmuno-Enzimático Ligado a Enzima
EMB: etambutol
GFP: proteína de fluorescencia verde
HC1: ácido clorhídrico
HDF: Formación Heteroduplex
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
INH: isoniacida
LCDC: Laboratorio Canadiense del Centro para el Control de Enfermedades
LNR: Laboratorio Nacional de Referencia
LNR-TB: Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y
Micobacterias
LRS: Laboratorio de Referencia Supranacional
MAA: Método Colorimétrico Alamar Azul

MDR: multidrogorresistencia
MNR: Método de la *Nitrato Reductasa*
MP: método de las proporciones
MTT: 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil bromuro de tetrazolio
OADC: ácido oleíco-albúmina-dextrosa-catalasa
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPS: Organización Panamericana de la Salud
PAS: ácido para-aminosalicílico
PBS: solución salina fosfato
PCR: Reacción en *Cadena de la Polimerasa*
PIR: pirazinamida
PNC: Programa Nacional de Control
PRA: análisis de restricción de producto de PCR amplificado.
RA: Resistencia Adquirida
RC: Resistencia Combinada
RELACTB: Red Latinoamericana y del Caribe de Tuberculosis
RMP: rifampicina
ROC: Características Operativas para el Receptor
RP: Resistencia Primaria
SDS: duodecil sulfato de sodio
SM: *estreptomicina*
SNS: Sistema Nacional de Salud
SR+14: sintomático respiratorio de más de 14 días
SSCC: Quimioterapia *Estandarizada de Corta Duración*
SSCP: Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena
TB: tuberculosis
TIO: tiocetazona
UICTER-. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
UIT: medio Lowenstein-Jensen Modificado VIH: Virus de la Inmunodeficiencia
Humana
XTT: 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil-2H-tetrazolio-5-carboxinilide

Capítulo I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1.1. introducción

A 120 años del descubrimiento del bacilo de la tuberculosis (TB) por el científico alemán Robert Koch y a pesar de haberse descubierto drogas tan eficaces para combatir a *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) como la isoniacida y la rifampicina, la pandemia de TB sigue aumentando y se ha convertido en mucho más que un problema de salud; exigiendo una acción urgente a escala mundial para evitar que se convierta en una enfermedad incurable.

Vanos factores, entre los que se destacan los socioeconómicos y el abandono de los Programas Nacionales de Control (PNC), así como la crisis económica mundial, el aumento de las condiciones de pobreza y el hacinamiento determinan este fenómeno. El impacto de la pandemia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la multidrogorresistencia (MDR) han agravado esta situación (Enarson *et al* 2000; World Health Organization 2000).

En la actualidad, una tercera parte de la población mundial está infectado por *M. tuberculosis* (1722 millones). Se estima que para el año 2020 alrededor de 1000 millones de personas podrían contraer la infección; 200 millones desarrollar la enfermedad y unos 35 millones morir a causa de esta. En el año 2000, se declararon 8,4 millones de nuevos casos en el mundo (1,5 millones pertenecen al África Subsahariana y 3 millones al Sudeste Asiático); si este incremento continua, se producirán 10,2 millones de casos nuevos en el 2005. Cada año mueren 2 millones de personas, estas defunciones representan en los países en desarrollo el 25 % del total de muertes evitables en adultos. Noventa y cinco por ciento de los casos y el 98 % de las defunciones causadas por esta enfermedad, se registran en estos países (Bastían y Portaels 2000; World Health Organization 2000; Rigouts y Portaels 2001; Hopewell 2002).

En 1994, el Programa Mundial de Tuberculosis de la OMS y la UICTER, inició un proyecto mundial con el propósito de medir la prevalencia de la resistencia a las drogas antituberculosas, basado en la existencia de una red de laboratorios de referencia en diferentes países que utilizan métodos estandarizados para este fin. Según este estudio, se ha estimado que existen en el mundo 50 millones de personas infectadas por bacilos tuberculosos multidrogorresistentes. Esta situación se considera tan sólo el comienzo de un problema de consecuencias impredecibles, ya que este importante reservorio puede ser el futuro de una epidemia de TB potencialmente incurable (Caminero 2001; Borgdorff 2002).

En ausencia de una vacuna realmente eficaz, el tratamiento de los casos activos de TB constituye el componente más importante del PNC. Por tanto, contar con métodos diagnósticos que brinden resultados confiables de resistencia es de gran utilidad para evaluar la calidad del tratamiento (Heifets 2000; Palomino 2000, Schluger 2001).

Los métodos de susceptibilidad *in vitro*, juegan un papel fundamental en la vigilancia de la resistencia de las cepas que circulan y en la selección de la terapia adecuada en pacientes infectados con cepas MDR (Heifets y Cangelosi 1999). Las técnicas convencionales como el Método de las Proporciones, el Método de las Concentraciones Absolutas y el Método del Cociente de Resistencia, se basan en el crecimiento de las micobacterias en medios de cultivo que contienen los antimicrobianos y usualmente demoran varias semanas para que se obtengan los resultados (Heifets 2000).

Recientes avances en el campo de la Biología Molecular y progresos en el estudio de las bases moleculares de la resistencia, proveen herramientas útiles para la detección rápida de resistencia a las drogas; estos métodos han mostrado muy buena correlación con los métodos convencionales. Desafortunadamente, debido a los

costos que involucran la implementación de estas técnicas, no se han podido aplicar en la mayoría de los laboratorios de micobacteriología, principalmente en los países de bajos recursos donde la TB constituye un serio problema de salud (Palomino 2000).

En los últimos años, muchas investigaciones se han encaminado hacia el desarrollo de métodos rápidos y económicos, que faciliten la determinación de resistencia como son los métodos colorimétricos. En 1995 fue propuesto el microensayo Alamar Azul (Yajko *et al.* 1995; Franzblau *et al.* 1998) y en la actualidad se están diseñando estudios con el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio (MTT), (Abate *et al.* 1998; Mshana *et al.* 1998).

En el presente trabajo se muestran los resultados de las pruebas de resistencia por el Método de las Proporciones (MP); que forman parte de la participación del Laboratorio Nacional de Referencia en los dos proyectos mundiales realizados por la OMS/UICTER. Además se realizó la evaluación de dos métodos colorimétrico MTT y el Método de la Nitrato Reductasa) para la detección rápida de resistencia de *M. tuberculosis* a las principales drogas antibacilares.

1.2 hipótesis:

> El perfeccionamiento de la vigilancia de la resistencia con la adopción de los criterios internacionales actuales, permiten conocer la circulación de cepas *M. tuberculosis* Multidrogorresistentes en Cuba.

V La introducción de nuevos métodos para la detección de resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antibacilares en el Laboratorio Nacional de Referencia, permiten obtener resultados concordantes con los métodos convencionales de forma simple y rápida.

Para dar respuesta a esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.3 objetivos

- objetivo general:

Contribuir al conocimiento en Cuba de la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antibacilares de primera línea.

- objetivos específicos:

1. - Determinar las cifras de Resistencia Primaria, Resistencia Adquirida, Resistencia Combinada y Multidrogorresistencia a las drogas antibacilares en cepas de *M. tuberculosis* empleando el método de las proporciones.

2. - Comprobar la calidad de las pruebas de resistencia realizadas en el LNR-TB mediante un estudio de garantía de la calidad.

3. - Evaluar el método colorimétrico MTT determinando la Concentración Inhibitoria Mínima a las drogas de primera línea en cepas de *M. tuberculosis* y comparar los resultados con el método de las proporciones.

4. - Introducir el Método de la Nitrato Reductasa (MNR) para la detección de la resistencia y comparar los resultados con el método de referencia.

1.4 La novedad científica consiste en que los resultados de las pruebas de resistencia de *M. tuberculosis* frente a las principales drogas antibacilares realizadas durante el período 1995 - 1998 forman parte de los dos estudios mundiales (1997 y 2000) organizados por la OMS/UICTER, del cual el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Mycobacteria formó parte del grupo mundial de trabajo. Además las cifras aportadas por Cuba, permitieron comparar nuestros resultados con el resto de los países participantes, sugiriéndose la baja transmisión de cepas resistentes en la comunidad y permitiendo realizar el perfeccionamiento en la vigilancia de la resistencia con la adopción de los criterios

internacionales y la obtención de resultados confiables. La introducción de los dos métodos rápidos (colorimétrico MTT y MNR) para la determinación de resistencia constituyen un aporte novedoso a nivel internacional; pues por su simplicidad, bajo costo y capacidad de poder realizar múltiples determinaciones simultáneamente, pueden convertirse en métodos alternativos para el diagnóstico rápido de resistencia en TB.

1.5 El valor teórico del presente trabajo, radica en los aportes que brinda al conocimiento de la Tuberculosis en nuestro país, lo cual trasciende a nivel internacional por el éxito logrado en la lucha contra esta enfermedad- Los resultados presentados en esta tesis han recibido premios, se han publicado en revistas nacionales e internacionales y se han realizado diferentes tesis:

- Logro de la Academia de Ciencias de Cuba, 1995
- Premio de la Crítica Científico - Técnica, 2001
- Premio Anual de la Salud, 2002
- X Forum Nacional de Ciencia y Técnica (Mención Especial), 1996
- XIV Forum Provincial (Relevante) y Nacional de Ciencia y Técnica (Destacado), 2002
- Premio en el XXXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Microbiología, 2002
- Resultados Relevantes Institucionales (4)
- Publicaciones Internacionales: libros y revistas 15

World Health Organization, 1997 (WHO/TB/97.227)

- Journal Clinical Microbiology, 1998 New England

Journal of Medicine, 1998 Enfermedades

Infecciosas y Microbiología, 1998 Rev.

Panamericana de Infectología, 2000

Pan American Health Organization, 2000 (PAHO/HCP/HCT/163/2000).

World Health Organization, 2000 (WHO/TB/2000.278)

Rev. Latinoamericana de Microbiología, 2000

New England Journal of Medicine, 2001

Rev. Latinoamericana de Microbiología (6), 2002

• Publicaciones Nacionales: libros y revistas 4

Rev. Cubana Medicina Tropical, 1999 Avances Biotecnología Moderna, 1999

Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y

Procedimientos, 1999

Libro Microbiología y Parasitología Médicas. Micobactenias Cap. 36, 2001.

• Tutor de 6 Tesis:

3 Tesis de Maestría en Bacteriología - Micología 2 Trabajos de Terminación de
la Residencia en Microbiología 1 Trabajo de Diploma de Licenciatura en
Microbiología

1.6 El valor práctico que se deriva de este estudio queda demostrado con los resultados obtenidos en la vigilancia sistemática de la resistencia por parte del Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Mycobacteria del IPK[^] permitiendo conocer la tendencia de la misma, correspondiéndose con las altas tasas de curación de los pacientes, reconociéndose a nivel mundial la escasa circulación de cepas MDR y el éxito alcanzado por el PNC en Cuba.

Con la introducción de estos métodos novedosos, por la experiencia acumulada en el tema de resistencia, nuestro laboratorio como Centro Colaborador OPS/OMS para la Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Mycobacteria cuenta con poderosas herramientas útiles tanto para el diagnóstico como para investigaciones epidemiológicas, las cuales pueden ser implementadas en otros países de la región, donde la Tuberculosis constituye un importante problema de salud por las altas tasas de morbilidad y mortalidad que presentan.



Capítulo II.
Revisión Bibliográfica

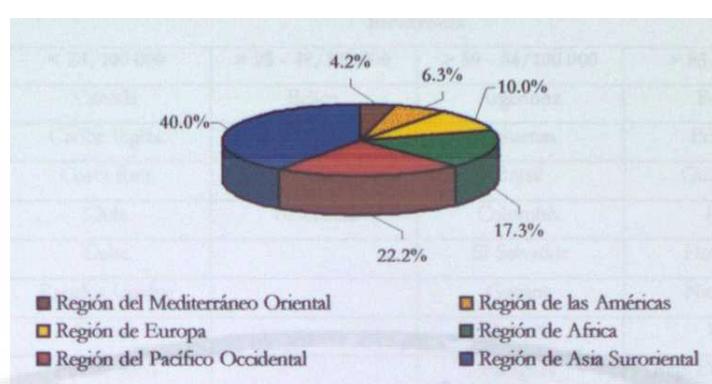
II REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1 situación epidemiológica de la TB

II.1.1 situación mundial

En 1993 la OMS declaró la TB como una emergencia sanitaria mundial. Las metas establecidas para lograr el control de esta enfermedad en el año 2000, (detección del 70 % de los casos con baciloscopía positiva y la curación del 85 % de los mismos) han fracasado, siendo aplazadas para el año 2005; esto obedece principalmente a las siguientes razones (Crofton *et al* 1997; Maher *et al* 1997; Maher y Mikulencak 1999): financiamiento y compromiso político insuficiente, organización inadecuada de los servicios de salud, no hacer todo lo posible para que los enfermos tuberculosos tengan acceso a diagnóstico y tratamiento, usar tratamientos inadecuados, no usar regímenes terapéuticos normalizados y no velar por el cumplimiento del tratamiento en los pacientes y exceso de confianza en la vacuna BCG (Freire y Roscigno 2002).

Producto de esta situación, en Marzo del 2000 se celebró la Asamblea Mundial de Salud para poner en marcha la *“Declaración de Amsterdam Stop TB”* para acelerar la expansión de las medidas de control de la TB reclamando apoyo político y financiero de los gobiernos, sobre todo en los 22 países que aportan mayor carga de TB a nivel mundial (80 %) y poder lograr estos objetivos para el año 2005. La principal estrategia de expansión para el control de esta enfermedad, es el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (*TAES, DOTS* siglas en inglés), trazándose como meta, cubrir al menos el 70 % de todos los casos nuevos con baciloscopía positiva. Esta declaración, además dispone la implementación, monitoreo y evaluación de los PNC usando las normas estándar internacionales adoptadas por la OMS. En la siguiente figura se refleja la distribución de casos de TB por regiones (World Health Organization 2001^{a,b}; Lee *et al*, 2002).



II.1.2 situación en las américa

En la Región de las Américas, *ciertos factores han estado creando* condiciones propicias para el agravamiento del problema. En varios países se asocian el incremento de las condiciones de pobreza que ha acentuado las inequidades de acceso a los servicios de salud, *así como crecimiento* de poblaciones marginales y migraciones en busca de mejor calidad de vida. A este cuadro se suma el debilitamiento de los PNC, que al hacerse menos eficientes en sus acciones, amenaza la posibilidad de controlar la TB en el futuro (Organización Panamericana de la Salud 2000; World Health Organization 2000; World Health Organization 2001^b).

En 1999, el 6,3 % de los casos del mundo correspondió a las Américas, aproximadamente el 50 % lo aportan Brasil (33 %) y Perú (17 %), encontrándose entre los 22 países del mundo con mayor carga de TB. La incidencia en la Región en 1999 fue de 238 000 para una tasa de 29/100 000 habitantes; se estima que anualmente 1/3 parte de los casos no es diagnosticada, ni notificada, existiendo un estimado real de cerca de 400 000 nuevos casos. En la siguiente tabla se muestra las tasas de incidencia estimada en las Américas para el año 2000 (Organización Panamericana de la Salud 2000; World Health Organization 2000; World Health Organization 2001^b).

Incidencia			
< 24/100 000	> 25 - 49/100 000	> 50 - 84/100 000	> 85/100 000
Canadá	Belice	Argentina	Bolivia
Caribe Inglés	México	Bahamas	Ecuador
Costa Rica	Uruguay	Brasil	Guatemala
Chile	Venezuela	Colombia	Haití
Cuba		El Salvador	Honduras
Estados Unidos		Guyana	Nicaragua
Jamaica		Panamá	Perú
Puerto Rico		Paraguay	Rep. Dominicana
		Surinam	

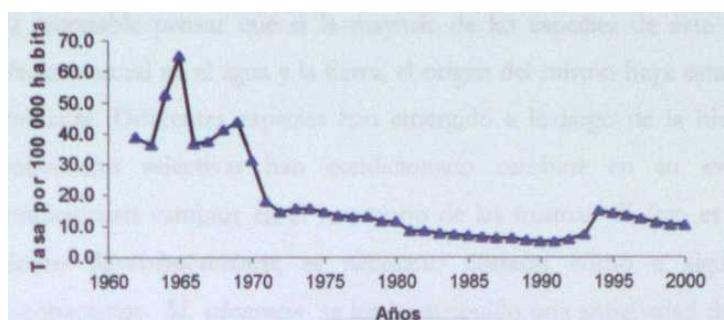
II.1.3 situación en Cuba

La lucha antituberculosa en Cuba ha atravesado 3 etapas, la primera, anterior a 1959; la segunda, desde 1959 hasta 1970; y la última, posterior a 1970 (González *et al* 1993). En la primera etapa se realizaron acciones de atención médica sanatorial y dispensarial a cargo del Consejo Nacional de Tuberculosis con poco apoyo estatal y escasa cobertura. Durante la segunda etapa se inició el PNC (1963), esta se caracterizó por la atención médica gratuita a cargo del Sistema Nacional de Salud (SNS), con cobertura nacional completa de toda la población, en forma de programa vertical con policlínicos, dispensarios, hospitales generales y antituberculosos. El rasgo principal de la tercera etapa consistió en el desarrollo de acciones preventivo- asistenciales completamente integradas dentro de los servicios generales de salud, con cobertura completa de toda la población, basada en la localización de casos a partir de los sintomáticos respiratorios, con confirmación del diagnóstico por baciloscopía o cultivos de *M. tuberculosis* y el tratamiento ambulatorio controlado de manera estricta (Armas y González 1998).

La evolución de la TB de 1971 a 1991 muestra una tendencia descendente como expresión del resultado de la lucha contra la TB, el fortalecimiento del SNS y las transformaciones socioeconómicas operadas en el país. La tendencia de la morbilidad en el período 1982-1991 refleja un descenso del 5,0 %, que nos sitúa entre los países con una baja incidencia (Menéndez *et al* 1981; González *et al* 1995; Marrero y Carreras 1996).

De 1992 a 1994, la incidencia se incrementa de una tasa de 5,0 a 14,3 por 100 000 habitantes. Este incremento nacional ocurre como fenómeno multicausal asociado a las dificultades económicas del país, a reactivaciones endógenas en adultos de la tercera edad y a problemas operacionales del PNC. Por edades los cambios de la morbilidad se producen en la población adulta, fundamentalmente en el anciano masculino. Por forma clínica el aumento fue a expensas de la TB pulmonar, la extrapulmonar presenta un comportamiento estable y aporta entre el 10 y 12 % del total de casos (González *et al* 1995; Marrero y Carreras 1996).

Para contrarrestar esta nueva situación epidemiológica a finales de 1993 se realizó una revisión del programa, lo que permitió un mayor control en la operación de cada uno de sus componentes. En 1995 se obtienen los primeros resultados: se logra detener el incremento de casos, se inicia la recuperación progresiva del programa y la declinación de casos. La tasa registrada en el 2001 fue de 7,9 por cada 100 000 habitantes (MINSAP 2002). La mortalidad por TB en los últimos 5 años no ha tenido variaciones significativas y se ha mantenido en tasas de 1 por cada 100 000 habitantes. A continuación se refleja el comportamiento de las tasas de incidencia en Cuba en el período 1962-2000 (González *et al* 1994; Marrero *et al* 2000).



El fenómeno de coinfección VIH/TB no ha constituido un factor significativo en el incremento de la TB en el país. En el año 2001, esta asociación representó el 1,2 % de los casos reportados en ese año (MINSAP 2002).

Dada la situación epidemiológica y operacional que presenta la TB en el país, por el hecho de cumplir con las metas fijadas por el PNC para la etapa de 1994 - 1997 ("estabilizar el comportamiento de la TB y reducir la incidencia") y haber cumplido las metas de la OMS para el año 2000 en el control de la TB, se tiene como perspectiva futura lograr la eliminación *de la TB como problema de salud* en el país (Marrero *et al* 2000).

II.2 evolución de *Mycobacterium tuberculosis*

El microorganismo productor de la TB es uno de los más fieles exponentes de la presión selectiva a la que han sido sometidas muchas especies y de una capacidad de adaptación a medios adversos realmente insuperable. Aunque las estimaciones le otorgan a *M. tuberculosis* una antigüedad de entre 15 300 a 20 400 años -en atención a su poco frecuente pérdida de diversidad de nucleótidos y a su capacidad de mutación- (Kapur *et al* 1994^a; Rothschild *et al* 2001), cada vez se acepta más que esta especie evolucionó de otros microorganismos más primitivos dentro del propio género *Mycobacterium*.

Es razonable pensar que si la mayoría de las especies de este género tienen su hábitat natural en el agua y la tierra, el origen del mismo haya estado en este medio ambiente. Diferentes especies han emergido a lo largo de la historia y presiones ambientales selectivas han condicionado cambios en su evolución, lo que condicionaría cambios en el reservorio de las mismas. Si esto es así y se aplica al género *Mycobacterium*, es necesario destacar cómo a algunas especies de micobacterias- *M. ulcerans*- se les ha atribuido una antigüedad de 150 millones de años (Hayman 1984), lo que supondría que este género habría precedido incluso al origen de los primates, *Homo sapiens* incluido (Martin y Rothschild 1998; Daniel 2000).

Se puede pensar que, en un momento de la evolución, alguna especie micobacteriana, por presión selectiva natural, pasara a tener su reservorio en animales. Esto quizá dio lugar a un anciano progenitor de *M. bovis*, aceptada por muchos como la más antigua de las especies que actualmente integran el denominado complejo *Mycobacterium*. Siguiendo esta aceptada teoría, un siguiente escalón en la evolución del género *Mycobacterium* sería el paso de *M. bovis* a la especie humana, coincidiendo con la domesticación de los animales por parte del hombre (Stead *et al* 1995; Haas 1996). De aquí, probablemente, pudo surgir *M. tuberculosis* como patógeno humano, demostrándose que, durante los últimos milenios, sigue con una capacidad de adaptación a medios adversos similar a la que demostraron sus posibles ancestros. No en vano sigue siendo, en el nuevo milenio, la enfermedad infecciosa humana más importante que existe en el mundo y el patógeno que mayor número de muertes sigue produciendo (Bates y Stead 1993; Rigouts y Portaels 2001).

II.3 taxonomía y características generales de las micobacterias

Las micobacterias están ubicadas taxonómicamente en el orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*, la cual contiene un solo género: *Mycobacterium*. Dicha familia se incluye dentro del grupo de bacilos aerobios Gram positivos, donde se encuentran además, la familia *Corinebacteriaceae* y las *Nocardioformas* (incluye a los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, entre otros). Estos últimos géneros, poseen cierto número de rasgos en común con las micobacterias: presentan arabinosa y galactosa en la pared celular, poseen un antígeno de pared celular común, y contienen ácido micólico (Grange 1997; Rastogi *et al* 2001).

Este género incluye más de cien especies que se dividen en tres grupos: Complejo Tuberculosis, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG), *M. africanum* y *M. microti*, Complejo Lepra, que incluye *M. leprae* y *M. lepraeumurium*, causantes de la lepra en el hombre y en el ratón respectivamente; y Micobacterias No Tuberculosas (atípicas), donde se ubican todas las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores, las que pueden ser patógenas, patógenas oportunistas o saprofitas. Estos microorganismos pueden existir en el suelo, el agua, los alimentos y en varias clases de animales, donde constituyen un peligro potencial para el hombre (Brooks *et al* 1999).

Las micobacterias, morfológicamente, son bacilos o cocobacilos ligeramente curvos o rectos, en pocas ocasiones ramificados, miden cerca de 0.4 - 3 jam, no esporulan, no poseen cápsula y son inmóviles. Son consideradas BAAR (bacilos ácido alcohol resistente) por presentar resistencia a la decoloración con alcohol ácido al 3 % después de la tinción con fuschina (coloración de Ziehl - Neelsen). Esta resistencia se cree que dependa de la integridad de la cubierta de cera. (Roberts *et al* 1991; Brooks *et al* 1999).

La mayoría de las especies de este género forman más de una clase de colonias. Estas pueden ser rugosas, color hueso crema, elevadas convexas, de bordes irregulares con bacilos densos y compactos (*M. tuberculosis*); o pueden ser lisas y transparentes, con bacilos sin agrupaciones discernibles (*M. intracellulare*), o de aspereza intermedia (*M. kansasi*). En dependencia de la producción de pigmento se dividen en: fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmentos), escotocromógenas (forman pigmento con y sin luz) y no cromógenas (Roberts *et al* 1991; Brooks *et al* 1999).

Las especies pertenecientes a este género se consideran aerobias estrictas y obtienen la energía de la oxidación de compuestos sencillos del carbono. Su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que en la mayoría de las bacterias, *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación de 18 horas, por lo que necesita de 3 - 4 semanas de incubación a 37°C para formar colonias visibles macroscópicamente. Las formas saprofitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan bien entre 22 - 33°C, producen más pigmento y son menos ácido resistentes que las formas patógenas. (Grange 1997; Brooks *et al* 1999).

II.3.1 la envoltura celular de las micobacterias

Las micobacterias, han sido consideradas tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias, debido a la estructura particular y composición química de su pared celular. La envoltura celular de las micobacterias, al igual que la de las bacterias Gram positivas y Gram negativas incluye la membrana citoplasmática que está formada por una bicapa lipídica rodeada por un espacio periplasmático y cantidades variables de peptidoglicano, este último es el responsable de la forma celular (Parsons *et al* 1997).

La estructura más original de la célula mico bacteriana es su pared celular, constituida por múltiples capas de aproximadamente 20 nm de espesor. Químicamente, la pared es muy compleja y bien diferente a la que presentan las bacterias

Gram positivas y Gram negativas. Al igual que en los otros grupos bacterianos está *formada* por cadenas de polisacáridos y *similar a las* bacterias *Gram negativas*, presentan lípidos externos. Contiene, además, abundantes lípidos complejos, algunos de los cuales son exclusivos de las micobacterias y producen marcados efectos biológicos sobre el huésped. Presenta una capa de peptidoglicano, arabinogalactano, (complejo polisacárido covalentemente unido al peptidoglicano, formado por unidades de arabinosa y galactosa) y ácidos micólicos (Draper 1991; Rastogi 1991).

Los ácidos micólicos son largas cadenas de ácidos grasos de 60 - 90 átomos de carbono, perpendiculares a la superficie de la *célula*, *presentan pocos* dobles *enlaces*, lo cual le confiere la hidrofobicidad a la capa y la convierte en una efectiva barrera contra la penetración de nutrientes hidrofílicos y antibióticos En la siguiente figura se puede observar la estructura y composición de la pared celular de las micobacterias (Draper 1991; Rastogi 1991; Parsons *et al* 1997).



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

Los canales en la pared celular micobacteriana son de naturaleza proteica, y constituyen una ruta de entrada de pequeñas moléculas de antibióticos hidrofílicos como la isoniacida. Las moléculas grandes hidrofóbicas como la rifampicina y los macrólidos se disuelven en la fase lipídica y se ponen en contacto con la fase acuosa en el interior de la célula. El paso a través de la bicapa lipídica juega un papel importante en la penetración de solutos debido a que la ruta hidrofílica es ineficiente. Muchas de las drogas efectivas contra micobacterias muestran hidrofobicidad variable, y estudios *in vitro* han demostrado que los derivados hidrofóbicos de aminoglucósidos son más activos contra *M. tuberculosis* que la mayoría de los derivados hidrofílicos (Rastogi y David 1993; Nikaido 1994; Brennan y Nikaido 1995).

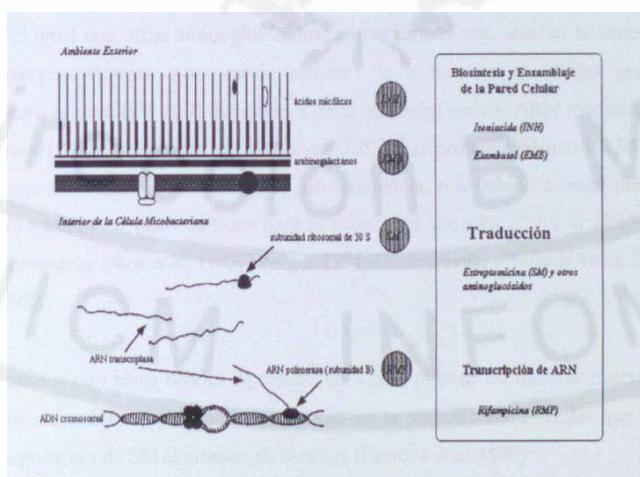
II.4 mecanismo de acción de las principales drogas empleadas en el tratamiento de la TB

El tratamiento efectivo de la TB se basa en la aplicación sistemática de la terapia multidroga directamente supervisada y tiene como objetivos: curar al paciente, evitar que el paciente fallezca de una TB activa o de sus consecuencias, evitar la recaída y disminuir la transmisión a otras personas (Maher *et al* 1997).

II.4.1 isoniacida

Isoniacida (INH) es un antibiótico sintético altamente efectivo contra *M. tuberculosis*, fue introducido en 1952 en el tratamiento de esta enfermedad. Tiene efecto bactericida, es activa mediante la administración oral y produce pocas reacciones adversas (Bastian y Portaels 2000; Cohén *et al.* 2003).

La INH es una predroga que requiere para su activación del complejo *Mycobacterium* catalasa - peroxidasa, siendo la susceptibilidad a esta droga dependiente de la presencia de esta enzima la cual es codificada por el gen *katG* (Heym *et al.* 1995). El modo de acción primario de INH o su derivado, parece ser el bloqueo de los pasos de biosíntesis de ácidos micólicos dependientes de oxígeno. Se ha demostrado que mutaciones en el gen *katG* ofrecen altos niveles de resistencia a INH en más de 90 % de los casos. A continuación se muestra un esquema con el mecanismo de acción de las drogas antibacilares (Zhang y Young 1993; Parsons *et al.* 1997; Somoskovi *et al.* 2001; Cohén *et al.* 2003).



Recientemente fue identificado un nuevo mecanismo de resistencia a INH. Este involucra mutaciones en el gen *ndh* que codifica para la enzima NADH deshidrogenasa. Mutaciones en este gen producen un incremento del cociente NADH/NAD. Estos altos niveles de NADH pueden competitivamente inhibir la unión de INH - NAD al sitio activo de la enzima *InhA* (proteína que adiciona el NADH necesario para la elongación de los ácidos grasos y biosíntesis de ácidos micólicos). Alternativamente como NADH es sustrato de las enzimas *KatG* y *ApbC*, altos niveles de NADH pueden competitivamente inhibir la peroxidación de la INH por *KatG* (Lee *et al.* 2001; Cohén *et al.* 2003).

Existen otros genes involucrados en la resistencia a INH, aunque en menor frecuencia, estos son *inbA*, *apbC*, *oxyR* y *kasA* (Banerjee *et al.* 1994; Deretic *et al.* 1995; Blanchard 1996; Wilson y Collins 1996; Drobniowski y Wilson 1998; Cohén *et al.* 2003).

II.4.2 estreptomicina

estreptomicina (SM) fue introducida en 1944 en el tratamiento de la TB. Esta droga, al igual que otros aminoglucósidos, como kanamicina, afectan la síntesis de proteínas procarióticas provocando errores de lectura en el código genético como son la inhibición de la iniciación y de la transcripción del ARN mensajero. La proteína *S12*, una subunidad del ribosoma 30S, es el principal blanco de SM. Las cepas que muestran resistencia a SM, con frecuencia, son debido a mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* que codifican para la subunidad proteica *S12* y el *ARNr 16S* respectivamente (Nair *et al.* 1993; Bottger 1994; Drobniowski y Wilson 1998; Cohen *et al.* 2003).

Aislamientos con bajos niveles de resistencia a SM, pueden no mostrar mutaciones en estos marcadores y presentar alteraciones en la permeabilidad celular que afecta la incorporación de SM al interior de la célula (Parsons *et al.* 1997).

II.4.3 etambutol

Los primeros tratamientos con etambutol (EMB) datan de 1968. Se piensa que bloquea la incorporación de los ácidos micólicos al arabinogalactano o un paso en la biosíntesis de arabinogalactanos. La inhibición de la síntesis de este componente por el producto de los genes *embA*, *embB* o *embC* podría explicar la acumulación de ácidos micólicos y sus efectos sobre la permeabilidad de la pared celular. El modo exacto de resistencia a EMB todavía es desconocido (Cole 1994; Blanchard 1996; Cohén *et al* 2003).

Se ha demostrado que EMB puede romper la “barrera de exclusión” en especies como *M. avium* y ayudar significativamente a la actividad bactericida de otros antimicrobianos intra y extracelulares (Rastogi y David 1993).

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

II.4.4 rifampicina

Rifampicina (RMP) es un derivado semisintético de rifamicina B, fue usada por primera vez en el año 1965 y se ha convertido en una droga de primera línea en el tratamiento de la TB. Es altamente efectiva contra *M. tuberculosis* y difunde fácilmente a través de la envoltura celular. Es una droga bactericida, produce un efecto esterilizante, es absorbida rápidamente en el tracto gastrointestinal y produce pocos efectos adversos (Bastían y Portaels 2000). La monoresistencia a RMP es rara y se ha convertido en un indicador de multidrogorresistencia (Parsons *et al* 1997).

El mecanismo de acción primario de RMP es el bloqueo del paso de elongación dependiente de ADN durante el proceso de transcripción que es llevado a cabo por la enzima micobacteriana *ARN polimrasa* cuya subunidad beta es codificada por el gen *rpoB*; mutaciones en este gen generan altos niveles de resistencia (Chopra y Brennan 1998). Se han encontrado aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* que manifiestan resistencia a RMP los cuales están relacionados con mutaciones que ocurren dentro de la porción central del codón 27 del gen *rpoB*, encontrándose alteraciones en Ser 531 o His 526 (Telenti *et al* 1993^c; Williams *et al* 1994; 1998^a; Cohén *et al* 2003).

Los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a RMP que no contienen mutaciones en el gen *rpoB* son raros, estos pueden involucrar cambios en la permeabilidad de la membrana o en la incorporación del antibiótico, por tanto, las técnicas de diagnóstico molecular encaminadas a la búsqueda de mutaciones en el gen *rpoB* son de gran utilidad para la detección de resistencia a esta droga (Parsons *et al* 1997).

II.5 cómo ocurre la resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*?

La resistencia a antimicrobianos en *M. tuberculosis* surge, en primer lugar, por mutaciones espontáneas. En toda población de células sensibles, existe una pequeña proporción de murantes resistentes por cada generación, que varía en dependencia de la droga a la cual se manifieste la resistencia. Cuando un único antimicrobiano es utilizado en el tratamiento de la TB, una mayoría de bacilos sensibles a éste es inhibida o muerta, pero se favorece la selección de mutantes resistentes a la droga empleada. Además, como el tratamiento es a largo plazo porque la población bacteriana es elevada, las células mutantes resistentes se van multiplicando y se toman la mayoría (Caminero 2001; Nacheva y Chaisson 2003).

Por tanto, toda monoterapia (real o encubierta por asociación con drogas previamente resistentes e ineficaces) llevará ineludiblemente al fracaso y a la selección de resistencia. De esta forma, la asociación de drogas nunca usados en el enfermo (o que se hayan utilizado asociados adecuadamente) debe ser la primera premisa que ha de tenerse en cuenta en el tratamiento de la TB, hecho relativamente fácil de seguir si se trata de un paciente inicial, pero que se toma a veces difícil de realizar cuando un enfermo ha recibido ya previamente vanos esquemas terapéuticos (Mitchinson 1984; Caminero 1989; Yew y Chau 1995; Caminero 2001).

Según lo expuesto previamente, existirían tres conceptos completamente diferentes de resistencias. La primera de ellas sería la denominada “resistencia natural”, que es aquella que presentan las cepas salvajes, como fruto de su multiplicación continua que hace que al alcanzar un determinado número de bacilos se produzca una mutación genética en un bacilo concreto, mutación que puede afectar específicamente al lugar donde interviene alguna de las drogas. Pero esta resistencia natural debe ser seleccionada por las drogas para que se exprese fenotípicamente. Cuando esto se produce por una mala terapéutica (monoterapia real o encubierta) se da lugar a lo que se denomina “resistencia adquirida o secundaria” que siempre tendrá detrás de sí una mala actuación por parte de la especie humana, bien por parte del médico al prescribir un mal tratamiento, o bien por el enfermo al seleccionar la medicación que está tomando. Si un paciente portador de una resistencia adquirida contagia con sus bacilos resistentes a un paciente que previamente no ha tomado ningún tratamiento antituberculoso, le podrá ocasionar una TB con una resistencia que, en este caso, se denomina “primaria” por ser enfermos nunca antes tratados (Caminero 1989; Ausina 1996; Caminero 2001).

Como se ha visto, las alteraciones de genes intrínsecos es el mecanismo principal de desarrollo de resistencia en Mycobacteria, pues ocurre independientemente del contacto previo del bacilo con las drogas. Sin embargo, el mayor tipo de resistencia en muchas otras especies de bacterias ha sido la adquisición de nuevos

determinantes de resistencia llevados a cabo por elementos genéticos móviles como son: secuencia de inserción, plásmidos y tramosones. Pero ninguno de estos elementos han sido reportados hasta la fecha en *M. tuberculosis* como transmisor de resistencia a antimicrobianos de una cepa a otra (Hatfull 1996; Nacheva y Chaisson 2003).

II.6 métodos empleados en los estudios de resistencia a las drogas antibacilares

Los métodos para la detección de resistencia, juegan un papel fundamental en la vigilancia de la resistencia a las drogas antibacilares y en la selección de la terapia en pacientes infectados con cepas MDR (Nacheva y Chaisson 2003).

El principal requerimiento de las pruebas de resistencia es que permitan diferenciar entre cepas susceptibles y resistentes. La concentración de la droga que permite distinguir entre cepas susceptibles y resistentes se denomina concentración crítica, y puede ser cualquier concentración entre la mayor Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) encontrada entre cepas salvajes y la menor CIM encontrada entre cepas resistentes (Heifets y Cangelosi 1999; Heifets 2000).

Los métodos de resistencia basados en el cultivo de las micobacterias sobre medios de huevo o agar, pueden ser directos, si los medios controles y los medios con drogas son inoculados directamente con la muestra, obteniéndose los resultados en 3 ó 4 semanas, o indirectos si se inoculan los medios con una suspensión bacteriana hecha a partir de un cultivo en medio sólido o líquido, obteniéndose los resultados en un período de 7 - 12 semanas. La ventaja de los métodos directos es que se obtienen los resultados más rápidamente y hay una mayor representatividad de la población bacilar original (Heifets y Cangelosi 1999; Heifets 2000).

Actualmente se cuenta con diferentes métodos cuantitativos para la detección de resistencia. Dentro de los más frecuentemente utilizados se encuentran:

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de más del 99 % de la población bacteriana contenida en un medio de cultivo (Heifets 1988; Heifets y Cangelosi 1999; Heifets 2000; Nacheaga y Chaisson 2003).

Concentración Bactericida Mínima (CBM): Es la concentración más baja de un antimicrobiano que causa la muerte a más del 99,9 % de la población bacteriana contenida en un cultivo en caldo. El índice CIM / CBM es la expresión estándar para expresar la potencia de un antimicrobiano (Heifets 1988; Heifets y Cangelosi 1999; Heifets 2000; Nacheaga y Chaisson 2003).

Concentración Inhibitoria Fraccional (CIF): Es una interacción de coeficientes que indica cuando una combinación de antimicrobianos con actividad inhibitoria es sinérgica $CIF < 0.5$, aditiva $CIF = 1$ o antagónica $CIF > 4.0$, donde:

$CIF = (CI_aM \text{ en combinación} / CI_aM \text{ sola}) + (CI_bM \text{ en combinación} / CI_bM \text{ sola})$ a y b son los antimicrobianos en los que se determinan su CIF (Heifets 1988; Heifets y Cangelosi 1999; Heifets 2000; Nacheaga y Chaisson 2003).

Concentración Bactericida Fraccionaria (CBF): Es una interacción de coeficientes que indica cuando una combinación de antimicrobianos con actividad bactericida es sinérgica $CBF < 0.5$, aditiva $CBF = 1$ o antagónica $CBF > 4.0$, donde: $CBF = (CB_aM \text{ en combinación} / CB_aM \text{ sola}) + (CB_bM \text{ en combinación} / CB_bM \text{ sola})$, a y b son los antimicrobianos en los que se determinan su CBF (Heifets 1988; Heifets y Cangelosi 1999; Heifets 2000; Nacheaga y Chaisson 2003).

Estos métodos cuantitativos se reservan básicamente para el estudio *in vitro* de antimicrobianos. Sin embargo CIM y CIF son también empleadas en la determinación de resistencia en aislamientos de casos clínicos; siendo CIM aceptada como método cuantitativo estándar para gran diversidad de especies bacterianas. Respecto a CIF, su uso está reservado cuando se necesita el uso combinado de antimicrobianos. Por otro lado CBM y CBF debido a su costo y laboriosidad no se realizan rutinariamente en laboratorios de diagnóstico (Heifets 1988; Heifets y Cangelosi 1999; Heifets 2000; Nachege y Chaisson 2003).

11.6.1 métodos estandarizados para la detección de resistencia en TB

Los métodos estandarizados son aquellos que se han recomendado por la OMS/UICTER para ser implementados por los laboratorios en estudios de vigilancia de la resistencia debido a los resultados altamente reproducibles que brindan. La mayoría de ellos, se fundamentan en la medición del crecimiento micobacteriano en medios de cultivo que contienen los antimicrobianos (usualmente se utiliza el medio Lówenstein - Jensen), (Heifets 1996; 2000; Nachege y Chaisson 2003).

■ método de las proporciones

El método de las proporciones o método proporcional de Canetti, constituye en la actualidad la prueba de referencia (regla de oro) que permite vigilar la resistencia de las cepas que circulan y seleccionar la quimioterapia de la TB a escala mundial según recomendaciones del Comité de Expertos en Tuberculosis de la OMS (Canetti et al 1963; 1969).

El principio de este método consiste en medir la proporción de bacilos resistentes que existe en una cepa de *M. tuberculosis* a una concentración de antimicrobianos (concentración crítica), capaz de inhibir el crecimiento de células sensibles, pero no de las resistentes. Para conseguirlo, la prueba debe indicar el número total de bacilos sembrados y el número de bacilos resistentes. Esta información se obtiene

sembrando dos diluciones bacilares, escogidas de tal forma que una u otra dilución de lugar a colonias en número contables. Se debe señalar que para cada antimicrobiano está definida una proporción de mutantes resistentes (proporción crítica) por encima de la cual la cepa es considerada resistente. Los resultados se obtienen luego de 4 - 6 semanas de incubación (Canetti *et al* 1963; 1969; Heifets 2000).

■ método de las concentraciones absolutas

Se utiliza el medio Lówenstein - Jensen con las diferentes concentraciones de la droga para determinar la concentración más baja que inhibe el crecimiento micobacteriano. Originalmente fue utilizado para determinar CIM de INH y SM. Se puede emplear una concentración crítica, considerando resistencia, cuando hay un crecimiento de 20 ó más colonias sobre esta concentración. Los resultados se obtienen en 4 - 6 semanas (Rieder *et al* 1998; Heifets 2000).

■ método del cociente de resistencia

Es una variante del método de las concentraciones absolutas. Se define como la CIM de la cepa en estudio dividida por la CIM de la cepa de referencia sensible (*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v). Un cociente de 2 ó menos indica sensibilidad y un cociente de 8 ó más indica resistencia. (Rieder *et al* 1998; Heifets 2000).

■ sistema radiométrico *BACTEC460® TB (Becton Dickinson)*

Se emplea el medio de cultivo Middlebrook 7H12 que contiene ácido palmítico marcado con C¹⁴ que es metabolizado por la micobacteria y se libera ¹⁴CO₂ cuya actividad es registrada como índice de crecimiento. Al emplearse drogas antituberculosas que inhiban el crecimiento micobacteriano se ve afectada la producción de ¹⁴CO₂. La mayor ventaja de este método es la capacidad de detectar crecimiento y su inhibición en un período de tiempo entre 9 - 18 días con una buena correlación con los métodos convencionales, pero tiene el inconveniente de

ser muy costoso, no sólo por el equipamiento que lleva, sino por ser dependiente del suministro de los medios de cultivo, además, es riesgoso debido a la cantidad de residuos radioactivos que se liberan (Heifets 1986; 1996; 2000).

II.6.2 nuevos métodos rápidos

Muchos de los métodos estandarizados para la detección de resistencia tardan mucho tiempo en dar los resultados, este retraso produce daños significativos al paciente, la comunidad y a los trabajadores de salud por lo que es importante buscar métodos rápidos de detección de resistencia que puedan aplicarse en países de escasos recursos donde la situación de la TB es alarmante (Palomino 2000; Nacheza y Chaisson 2003).

II.6.2.1 métodos fenotípicos

Las técnicas fenotípicas generalmente necesitan de la presencia de las colonias para poder realizar la interpretación de los resultados, pero debido al crecimiento lento de *M. tuberculosis* se necesitan varias semanas para que estos puedan ser interpretados. Un grupo de novedosos métodos fenotípicos se han desarrollado permitiendo la detección de signos tempranos característicos del crecimiento en micobacterias. Algunas tecnologías miden el metabolismo mediante el empleo de indicadores coloreados, detección del consumo de oxígeno y la visualización temprana de microcolonias (Gorden *et al.* 1996; Palomino 2000).

■ E Test (AB Biodisk, Suecia)

El *E Test* es un método de detección de CIM, su principio está basado en la dispersión de un antimicrobiano contenido en tiras con un gradiente logarítmico de concentración, este induce una zona de inhibición de forma elipsoidal en la superficie del medio donde se hace crecer la cepa en estudio. Debido a la necesidad de acortar el tiempo en brindar los resultados de las pruebas de resistencia, este método puede ser una herramienta útil para el estudio a partir de muestras clínicas

con baciloscopía positiva, pero tiene como principal desventaja el costo elevado (Wanger y Mills 1994; Fabry *et al.* 1995; Hausdorfer *et al.* 1998; Palomino 2000).

■ **tubo indicador de crecimiento de micobacterias (*MGTT*, siglas en inglés; Becton Dickinson).**

Este método se introdujo como un método no radiométrico, alternativo al *BACTEC* 460 TB para la detección rápida de crecimiento en micobacterias. Su principio se basa en la propiedad fluorescente de un compuesto sensible al oxígeno que está contenido en un tapón de silicona ubicado en el fondo del tubo que contiene el medio de cultivo. El oxígeno disuelto en el medio extingue cualquier fluorescencia, de forma tal, que el consumo de oxígeno producto del metabolismo de las micobacterias permitirá la manifestación de fluorescencia cuando el tubo se expone a un transiluminador de luz ultravioleta con una $\lambda=365$ nm (Bergmann y Woods 1997; Rivera *et al.* 1997; Morcillo *et al.* 1998; Palomino *et al.* 1999).

■ **ensayo Pha B (*Organon Teknika*)**

Es un ensayo de amplificación biológica de fago. Se basa en la habilidad de células de *M. tuberculosis* para soportar la multiplicación de un micobacteriófago infectante; los fagos exógenos no infectantes son inactivados por tratamiento químico. El número de fagos endógenos, el cual es un indicador del número de células de *M. tuberculosis* viables, es determinado después de ciclos de infección, replicación y liberación en micobacterias de crecimiento rápido. Los resultados se obtienen en 3 ó 4 días. Este método pudiera emplearse además directamente en las muestras, acortándose el tiempo en el cual se obtienen los resultados de las pruebas de resistencia (Wilson *et al.* 1997; McNemey 1999).

■ **método de detección de microcolonias**

Se basa en la detección de microcolonias en medio sólido. Cuando se inocula una capa fina de medio Middlebrook 7H11, las micobacterias forman microcolonias típicas fácilmente detectables con el microscopio. Se ha visto que con este método

se acorta el tiempo en el cual se obtienen los resultados de las pruebas de resistencia. Por lo que este método constituye una alternativa para los estudios de resistencia en los laboratorios con escasos recursos (Welch *et al* 1993; Mejia *et al* 1999; Palomino y Portaels 2000).

■ citometría de flujo

Se basa en la habilidad de *M. tuberculosis* de hidrolizar el diacetato de fluoresceina, produciendo un efecto de fluorescencia en el bacilo, que puede ser detectado mediante análisis citométrico de flujo. Así, la exposición a antimicrobianos que afecten la viabilidad detendrá la reacción de hidrólisis, resultando en menos fluorescencia. Los valores de CIM obtenidos por este método se han correlacionado con los determinados por los métodos convencionales y pueden obtenerse resultados en menos de 24 horas (Kirk *et al* 1998; Moore *et al* 1999).

■ sistema de cultivo II ESP (*Becton Dickinson*)

Este sistema detecta cambios de presión que se producen ya sea por el consumo o producción de gas por las micobacterias que están creciendo. Al ser un método automatizado requiere de equipos complejos, lo que limita su empleo en países en vías de desarrollo (Bergmann y Woods 1998; Palomino 2000).

■ microensayo alamar azul

El alamar azul es un reactivo de óxido-reducción, que ha sido utilizado en una variedad de pruebas para medir toxicidad, viabilidad o crecimiento celular. Este indicador cambia de color azul (no fluorescente) cuando está en su estado oxidado a rosado intenso (fluorescente) frente a un ambiente reductor como el generado durante el metabolismo celular, este cambio de color puede detectarse visualmente. Esta propiedad ha sido utilizada para medir viabilidad de *M. tuberculosis* luego de la exposición a las drogas antituberculosas. Es un método simple, rápido y de bajo

costo que no requiere de un equipamiento especial para su utilización (Yajko *et al.* 1995; Franzblau *et al.* 1998; Palomino y Portaels 1999).

■ microensayo MTT

El MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio es una sal de color amarillo y soluble en solución salina. Cuando es reducida por la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, enzima que cataliza la reacción donde la sal acepta electrones desde NADH y NADPH, se produce una destrucción del anillo tetrazolio, formándose cristales púrpuras insolubles (formazán), que luego de la solubilización pueden medirse espectrofotométricamente y de forma visual. Como NADH y NADPH solamente son producidos por células vivas, la producción de formazán puede emplearse como una medida indirecta de la viabilidad (Mosmann 1983; Vistica *et al.* 1991; Mshana *et al.* 1998).

Este ensayo es muy útil para medir viabilidad en cultivos celulares y fue comparado con el método tradicional en el que se usa la incorporación de ^3H -Timidina mostrando ventajas por no utilizar radioactividad. Ha sido empleado, además, como indicador de viabilidad en estudios con antivirales probados contra virus herpes simple, VIH-1 e influenza (Vistica *et al.* 1991; Jabry *et al.* 1996).

Recientemente se ha explorado la posibilidad de introducirlo en estudios de resistencia en TB por constituir un ensayo sencillo, rápido y económico (Mosmann 1983; Abate *et al.* 1998), que brinda la posibilidad de determinar viabilidad de *M. tuberculosis* luego de la exposición a las drogas antibacilares (Gómez *et al.* 1995; Abate *et al.* 1998; Mshana *et al.* 1998; De Logu *et al.* 2001).

La sensibilidad del método depende del tipo de células empleadas, del estado fisiológico promedio de las mismas y del método empleado para la solubilización de los cristales (Mosmann 1983). Algunos autores recomiendan solubilizar el formazán con una mezcla que contenga 10 % de duodecil sulfato de sodio (SDS) con ácido

clorhídrico (HC1 0.01 N), isopropanol o una mezcla de 50 % de dimetilformamida (DMF) en agua desionizada con 20 % de SDS (Vistica *et al.* 1991; Abate *et al.* 1998; Mshana *et al.* 1998).

■ método de la nitrato reductasa

La nitrato reductasa es una enzima que está presente en muchos microorganismos entre los que se encuentran el género *Mycobacterium* y específicamente *M. tuberculosis*, esta enzima es la encargada de reducir los nitratos a nitritos. La reacción bioquímica no se puede evidenciar a simple vista, por lo que es necesario utilizar una mezcla de reactivos (ácido clorhídrico + sulfanilamida + N-I-Naftilendiamina) los cuales al unirse con el nitrito presente en el medio dan origen a un derivado azoico coloreado que indica la reducción (Virtanen 1960; Golyshevskaia *et al.* 1996; Ángeby *et al.* 2002).

Este procedimiento se utiliza de rutina como prueba de identificación de especies, pero en estudios recientes se ha visto la posibilidad de utilizarlo como prueba de resistencia en medio sólido indicando viabilidad luego de ser expuesto *M. tuberculosis* a las drogas antibacilares (Ángeby *et al.* 2002).

II.6.2.2 métodos genotípicos

Gracias al conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a las drogas, así como la disponibilidad de nuevos métodos de biología molecular, se han desarrollado diferentes métodos genotípicos para la detección rápida de resistencia a las drogas antibacilares (Palomino 2000; Nacheza y Chaisson 2003).

■ secuenciación automática de ADN

La secuenciación de ADN amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) ha sido la técnica más ampliamente utilizada, convirtiéndose en la regla de oro para estos fines. Se han realizado procedimientos manuales y automatizados, siendo descrita su aplicación en la caracterización de

mutaciones en el gen *rpoB* de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la RMP. También se ha empleado en la detección de mutaciones responsables de la resistencia a INH, SM y ciprofloxacina (Kapur *et al* 1994^b; Kapur *et al* 1995).

■ PCR-SSCP (polimorfismo conformacional de simple cadena)

Se basa en la propiedad de una simple cadena de ADN de doblarse formándose una estructura terciaria cuya forma depende de su propia secuencia. Las cadenas simples de ADN difieren en una o pocas bases por lo que al doblarse se enrollan en diferentes conformaciones con diferente movilidad electroforética, produciéndose el llamado Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena. Después de la amplificación de la región de interés por PCR las cadenas de ADN amplificadas se separan por calor seguido de enfriamiento hasta obtener cadenas separadas y se van a doblar formando una conformación característica, las que van a diferir en su movilidad en el gel luego de una electroforesis. Ha sido utilizado en la detección de resistencia a INH, SM, RMP y ciprofloxacina (Pretorius *et al* 1996; Scarpellini *et al* 1997).

■ PCR-HDF (formación heteroduplex)

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

■ hibridación en fase sólida

Se emplean membranas de nitrocelulosa en forma de tiras donde están inmovilizadas sondas específicas a diferentes regiones del gen *rpoB*. A través de este método se pueden detectar cepas resistentes a RMP en menos de 24 horas y con

una alta especificidad. Ejemplo de esto es el estuche comercial *Inno-Lipa RTB* (*innogenetics* NI Bélgica), (Rossau *et al* 1997; Gamboa *et al* 1998).

■ microarreglo de ADN

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

■ sistema de proteínas reporteras

Es un procedimiento basado en el principio de emisión de luz debido a actividad enzimática. Uno de los métodos más recientes emplea la enzima “Luciferasa” aislada de una variedad de luciérnagas, cuyo gen fue clonado en el bacteriófago temperado *L5* y más recientemente en el *pbAE88*, este funciona como vehículo para introducir la mencionada enzima dentro de la célula sin recurrir a la lisis celular.

El principio de este método va a ser la detección de fotones liberados por reacciones dependientes de trifosfato de adenosina (ATP), metabolito muy ligado a la actividad vital de la célula y que en ambientes desfavorables, como es la presencia de antibióticos, se ve afectada su producción (Beckers *et al* 1985; Nilsson *et al* 1988). Recientemente fue descrito un sistema similar al Luciferasa, en este se utiliza la proteína de fluorescencia verde (*GFP*, en inglés) de la medusa *Aequorea victoria*, la cual se emplea como molécula indicadora. Este sistema no requiere cofactores ni sustratos debido a la naturaleza fluorescente intrínseca del *GFP* (Jacobs *et al* 1993; Hickey *et al* 1996; Shawar *et al* 1997).

II.7 diagnóstico de tuberculosis

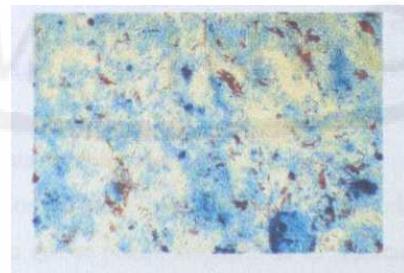
La bacteriología de la TB es uno de los aspectos fundamentales en un PNC y un componente esencial de la estrategia *DOTS*. Por tanto, contar con una red de laboratorios es de vital importancia para detectar los casos infecciosos de TB pulmonar, realizar un seguimiento de los resultados de tratamiento y verificar la curación por medio de la baciloscopía una vez finalizado éste. Esta red de laboratorios debe formar parte de los programas integrados de control de la TB que, a su vez, deben formar parte de los programas generales de atención primaria de salud de los países (Weyer *et al* 1998^{a,b}).

La normalización de las técnicas básicas de bacteriología de la TB tiene tantas ventajas que se ha convertido en una necesidad inevitable. La carencia de técnicas normalizadas complica las actividades de los servicios de laboratorio, así como la integración de los laboratorios existentes a una red interrelacionada. La normalización permite obtener resultados comparables en un mismo país; facilita la capacitación del personal, la selección del equipo, los materiales y los reactivos que es preciso adquirir; también facilita la evaluación del desempeño y el establecimiento de una supervisión apropiada a fin de mejorar la eficiencia y reducir los gastos de ejecución (Weyer *et al* 1998^{a,b}).

Las técnicas y los procedimientos normalizados son útiles si responden a las condiciones epidemiológicas predominantes y a los distintos niveles de complejidad de los laboratorios y se formulan de conformidad con estos elementos. Es preciso que las técnicas sean sencillas (para lograr la máxima cobertura) y realizables por trabajadores de la red de laboratorios. Al mismo tiempo, su sensibilidad y especificidad deben garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos (Weyer *et al* 1998^{a,b}).

II.7.1 microscopía

Las *tinciones* para *detectar* bacilos *ácido alcohol resistente* (BAAR) en *muestras* clínicas, constituyen la primera etapa en el diagnóstico de laboratorio de la TB. Estas técnicas tienen las ventajas de ser rápidas y de bajo costo, razones por las que han resultado de obligado cumplimiento a lo largo de más de un siglo, ofreciendo valiosos resultados en un gran número de casos (Enarson *et al.* 2000; Laszlo *et al.* 2000). La baciloscopía tiene un valor prioritario en el diagnóstico de la TB; esta técnica detecta la principal fuente de infección para proceder a su inmediato tratamiento y control; además, la baciloscopía es eficaz en el control bacteriológico del *tratamiento quimioterapéutico* y *permite una amplia cobertura en el diagnóstico*. Sin embargo, tanto su sensibilidad como su especificidad no alcanzan niveles óptimos debido, por un lado, a que precisan un número alto de microorganismos en las muestras a investigar, del orden de 10^4 bacilos/mL, cifras no alcanzables en muchos especímenes clínicos, fundamentalmente líquidos orgánicos originalmente estériles. La existencia de cultivos positivos con microscopía previa negativa en algunas de estas muestras clínicas, es un hecho bien conocido que limita la sensibilidad de las tinciones. Por otro lado, la especificidad de una tinción positiva es restringida, ya que únicamente *indica la presencia* de BAAR, característica compartida por todas las especies de micobacterias y aun por otras bacterias de géneros diferentes. En el siguiente esquema se muestra la observación microscópica de BAAR utilizando la coloración de Zieli - Neelsen (Weyer *et al.* 1998^a).



La sensibilidad de la microscopía oscila entre un 22 % y un 80 % dependiendo fundamentalmente del tipo de muestra examinada, la población de pacientes a evaluar, la experiencia del observador y el tipo de *gold standard* con el que se compare. De todas las muestras, las procedentes del aparato respiratorio son las que ofrecen la mayor sensibilidad, pudiéndose diagnosticar hasta un 96 % de pacientes con TB pulmonar (Rieder *et al* 1998; Weyer *et al* 1998^a).

II.7.2 cultivo

El cultivo es una técnica que tiene mayor sensibilidad, ya que basta que existan más de 10 bacilos/mL en muestras digeridas y concentradas, para que sea positivo. Por esto, el cultivo es el método de elección actual para el diagnóstico de esta enfermedad. Los cultivos pueden ser persistentemente negativos en alrededor del 10 % de los casos de TB pulmonar, aunque esta sea tan severa como una diseminación miliar. Esto se debe a que al procesar el esputo, los métodos de descontaminación, unos más que otros, son capaces de destruir gran cantidad de bacilos. Por otra parte, las lesiones con escasas poblaciones bacterianas no excretan bacilos todos los días ni en todas las expectoraciones (Rieder *et al* 1998; Weyer *et al* 1998^b).

Los cultivos tienen el inconveniente de su mayor costo y de la demora, pues rara vez son positivos antes de transcurridas 2-4 semanas de su siembra. A pesar de estas limitaciones los cultivos, por su mayor sensibilidad son de gran importancia para el diagnóstico de la TB. Además son indispensables para las pruebas de sensibilidad *in vitro* para realizar la tipificación y en estudios actuales de Epidemiología Molecular (Rieder *et al* 1998; Weyer *et al.* 1998^b).

II.7.3 nuevas técnicas de diagnóstico

Se han hecho muchos intentos para mejorar los métodos de cultivo del bacilo tuberculoso, de modo que se pueda disponer de su resultado en plazos más breves. Las técnicas más útiles a este respecto parecen ser las no radiométricas (MGIT), que

permiten hacer el diagnóstico de la TB en pocos días. Además, tienen una mayor sensibilidad que los métodos bacteriológicos tradicionales (Grange 1997; Brooks *et al* 1999; Perkins y Kritski 2002; Drobniowski *et al* 2003).

Los métodos convencionales para clasificar micobacterias están volviéndose rápidamente de interés histórico. Las sondas moleculares proporcionan un método rápido, sensible y específico para identificar micobacterias; estas se pueden utilizar sobre el crecimiento micobacteriano en medio sólido o en cultivo en caldo. Las sondas ADN específicas para secuencias del ARNr de los microorganismos sometidos a prueba se emplean en el procedimiento de hibridación (Grange 1997; Brooks *et al* 1999; Su 2002; Drobniowski *et al.* 2003).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido aplicada a la identificación de muchas especies de micobacterias. El método se basa en el desarrollo de perfiles de ácidos micólicos, que varían de una especie a otra, esta técnica se utiliza generalmente en laboratorios de referencia (Grange 1997; Brooks *et al* 1999).

Se han usado ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para detectar anticuerpos contra antígenos de *M. tuberculosis* con una sensibilidad cercana al 90 % y una especificidad próxima al 100 % en enfermos bacilíferos, con una fuerte carga antigénica. La sensibilidad es menor en la TB paucibacilar y extrapulmonar, que es justamente donde las técnicas bacteriológicas también muestran sus mayores limitaciones. Ninguno de estos métodos es adecuado para emplearse en el diagnóstico sistemático (Montoro *et al.* 1994^{a,b}; 1996).

El PCR es un método sumamente prometedor para lograr la detección directa y rápida de *M. tuberculosis* en muestras clínicas. La sensibilidad total es de 55 % a 90 %, con una especificidad cercana al 99 %. La prueba tiene una mayor sensibilidad cuando se aplica en muestras que resultaron positivas a la baciloscopía;

la prueba del *PCR* está aprobada para este uso, aunque todavía, este método se encuentra bajo intenso desarrollo para lograr su aplicación generalizada ya que presenta como inconveniente principal, problemas por la contaminación ambiental con fragmentos libres del ADN micobacteriano que dan lugar a reacciones falsas positivas y el alto costo de la prueba cuando se compara con los métodos convencionales (baciloscopía y cultivo), (Roos *et al.* 1998; Suffys *et al.* 2000; Su 2002; Drobniowski *et al.* 2003).

Utilizando el principio del *PCR*, es posible realizar la identificación de micobacterias a partir del aislamiento primario en medios de cultivo. El *PRA* (*PCR-restriction analysis*, nombre en inglés) consiste en amplificar una región de la proteína de choque térmico de 65 *kD* (kilodalton) presente en todas las micobacterias y digerir posteriormente con dos enzimas de restricción *Hae III* y *BstE II*. Dichas enzimas producen cortes específicos y característicos en cada una de las especies micobacterianas. Mediante una separación en gel de agarosa se puede diferenciar visualmente las distintas micobacterias (Telenti *et al.* 1993^b, Devallois *et al.* 1997; Su 2002).

II.8 tratamiento

Se tienen en cuenta tres propiedades fundamentales de los medicamentos antituberculosos: su capacidad bactericida, su capacidad esterilizante y su capacidad de prevenir la resistencia. Los medicamentos antituberculosos poseen estas propiedades en diferentes grados (Maher *et al.* 1997).

II.8.1 casos nuevos

En los regímenes terapéuticos se distingue una fase inicial (intensiva) de dos meses de duración y una fase de continuación que por lo general dura entre 4 y 6 meses. En la fase inicial, en la que por lo general se utilizan 4 medicamentos [INH, RMP, PIR (pirazinamida) y EMB] se produce una rápida destrucción de bacilos tuberculosos. En una amplia mayoría, los pacientes con baciloscopía positiva (BK+)

se vuelven negativos en los primeros dos meses de tratamiento. La fase de continuación requiere un menor número de medicamentos (INH y RMP) pero durante un tiempo mayor. El efecto esterilizante de los medicamentos elimina los bacilos restantes y evita una ulterior recaída (González *et al.* 1994; Marrero y Carreras 1996; Maher *et al.* 1997; Enarson *et al.* 2000; Marrero *et al.* 2000).

En los enfermos de TB pulmonar BK+ existe el riesgo de selección de bacilos resistentes, pues estos pacientes albergan y excretan un número elevado de bacilos. Los regímenes de quimioterapia de corta duración consistente en 4 medicamentos en la fase inicial y 2 en la fase de continuación reducen ese peligro (Marrero y Carreras 1996; Maher *et al.* 1997; Enarson *et al.* 2000; Marrero *et al.* 2000).

En casos con TB pulmonar o extrapulmonar con baciloscopía negativa el riesgo de selección de bacilos resistentes es bajo, pues estos pacientes albergan un menor número de bacilos en sus lesiones. En estos casos se ha comprobado la eficacia de regímenes de quimioterapia de corta duración con 3 medicamentos en la fase inicial y 2 en la fase de continuación (Marrero y Carreras 1996; Maher *et al.* 1997; Enarson *et al.* 2000; Marrero *et al.* 2000).

II.8.2 casos de retratamiento

Los pacientes tratados con anterioridad pueden haber adquirido una drogorresistencia. Pueden albergar y excretar, con mayor probabilidad que los pacientes nuevos, bacilos resistentes por lo menos a INH. El régimen de retratamiento consiste en 5 medicamentos en la fase inicial (INH, RMP, PIR, SM y EMB) y 3 en la fase de continuación (INH, RMP y EMB). De ese modo, el paciente recibe en la fase inicial al menos 2 medicamentos eficaces, lo que reduce el riesgo de seleccionar más bacilos resistentes (Marrero y Carreras 1996; Maher *et al.* 1997; Enarson *et al.* 2000; Marrero *et al.* 2000; Nacheva y Chaisson 2003).

II.8.3 medicamentos disponibles para tratar la TB multirresistente

Los regímenes elegidos deberán consistir en una combinación de medicamentos básicos [SM, PIR, EMB y Tiocetazona (TIO)] y de medicamentos de segunda línea: aminoglucósidos (kanamicina, amikacina, capreomicina), tioamidas (etionamida y protionamida), fluoroquinolonas (ofloxacina y ciprofloxacina), cicloserina y ácido para-aminosalicílico (PAS) (Crofton *et al* 1992; 1997; Espinal *et al* 2000; Nachega y Chaisson 2003).



Capítulo III. Materiales y Métodos

III MATERIALES Y METODOS

III 1.1 determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de las proporciones

III.1.1 cepas de estudio

Según las directrices para la vigilancia de la drogo-resistencia recomendadas por el grupo mundial de trabajo de la *OMS/UICTER* (Bustreo *et al.* 1997), se seleccionaron las cepas objeto de estudio por el método de muestreo por conglomerados (*clusters*). Esta selección fue adoptada, de acuerdo a las características que presenta nuestro país con relación a la distribución de centros de salud para realizar el diagnóstico de TB. La red de laboratorios en Cuba, está formada por 609 unidades (policlínicos y hospitales) que realizan baciloscopía y 49 laboratorios que realizan cultivo. Además, se realizó un estimado promedio de casos de TB por provincias de acuerdo al número de casos BK+ notificados en el año 1994. El total de cepas estudiadas representó del 40 al 50 % del total de pacientes BK+ en cada año de estudio.

Como parte de los estudios de la vigilancia longitudinal de la resistencia en cepas de *M. tuberculosis* que realiza el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias (*LNR-TB*)/ Centro Colaborador OPS/OMS del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (*IPK*) desde el año 1975 y en el marco de nuestra incorporación al grupo mundial de trabajo para participar en los dos proyectos mundiales (1997 y 1999) organizados por la *OMS/UICTER* para la vigilancia de la resistencia a las drogas antituberculosas, se seleccionó un total de 1379 cepas aisladas del mismo número de pacientes sintomáticos respiratorios (SR + 14) que resultaron BK+. Las cepas fueron recibidas durante el período de Enero de 1995 a Diciembre de 1998 procedentes de los 14 Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (*CPHE*) y el municipio especial Isla de la Juventud.

Las 1379 cepas fueron analizadas en dos períodos de estudio; el primero correspondiente a los años 1995-96 (786 cepas) y el segundo perteneciente a los años 1997-98 (593 cepas). Dichos períodos se establecieron de acuerdo a los resultados de los 2 proyectos referidos anteriormente.

Conjuntamente con las cepas se recibió la encuesta diseñada para el estudio de vigilancia de resistencia donde se obtuvo datos relacionados con los pacientes: edad, fecha de diagnóstico, antecedentes de tratamiento anterior con drogas antibacilares, codificación de la baciloscopía y cultivo (anexo 1). Previo a la determinación de la resistencia, se confirmó el diagnóstico bacteriológico de *M. tuberculosis* mediante la realización de las pruebas bioquímicas de niacina y catalasa a 68°C (Valdivia *et al* 1988).

III.1.2 método de las proporciones

Se empleó el método de las proporciones (MP), en su variante económica tipo b, mediante la técnica indirecta para determinar los patrones de sensibilidad/ resistencia (S/R) a las drogas antibacilares en cepas de *M. tuberculosis* (Canetti *et al* 1963, 1969).

preparación de las soluciones de trabajo de cada antimicrobiano

Teniendo en cuenta la potencia de cada droga se preparó una solución patrón (1 mg/mL) en agua destilada estéril para INH, SM y EMB. En el caso de RMP se empleó una mezcla (1:2) de dimetilsulfóxido y agua destilada estéril para su mejor disolución (todas las drogas empleadas fueron de la casa comercial SIGMA, EE. UU.). Las soluciones preparadas para cada una de las drogas, fueron añadidas por separado a 300 mL de medio Lówenstein - Jensen Modificado (UIT), para alcanzar la concentración crítica de cada antimicrobiano (anexo 2).

Concentraciones críticas de los antimicrobianos empleados en el MP

Antimicrobiano	Concentración Crítica $\mu\text{g/mL}$
INH	0,2
SM	4
EMB	2
RMP	40

preparación del inóculo

A partir de un cultivo de 3 - 4 semanas de incubación en medio UIT se tomó con un asa de 5 mm de diámetro la mayor cantidad de colonias posibles. Esta biomasa se colocó en un frasco estéril de 5 cm de diámetro que contenía 30 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro y 2 ó 3 gotas de agua destilada estéril y se agitó realizando movimientos circulares con el objetivo de homogenizar la biomasa. Luego se agregaron aproximadamente 3 mL de agua destilada estéril, se agitó y se dejó reposar unos minutos. Una parte del sobrenadante se recogió y fue empleada para preparar una suspensión bacilar con turbidez similar al patrón 1 mg/mL de masa húmeda de BCG [correspondiente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL)]. Una vez que se obtuvo el patrón de 1 mg/mL se tomó 1 mL de esta suspensión y se realizaron diluciones decimales separadas desde 10^{-1} mg/mL hasta 10^{-5} mg/mL, en tubos que contenían 9 mL de agua destilada estéril, cambiándose la pipeta al realizar cada dilución.

Se sembraron 0,2 mL de las suspensiones 10^{-3} mg/mL y 10^{-5} mg/mL en cada juego de medios (2 tubos de medio control o sea, medio sin antimicrobiano y un tubo de medio correspondiente a cada antimicrobiano). Los tubos se incubaron a 37°C en posición inclinada, de forma tal que el inóculo se distribuyó sobre toda la superficie, manteniendo las tapas ligeramente abiertas durante 24 - 48 horas; pasado este tiempo, se ajustaron las tapas y se colocaron los tubos en posición vertical hasta que se realizó la lectura a los 28 y 42 días. En cada lote de medio preparado se

incluyó como garantía de calidad la cepa de referencia internacional *M. tuberculosis* *H37Rv* con patrones de sensibilidad para las 4 drogas analizadas y la cepa *M. tuberculosis* (288-99) resistente a las 4 drogas.

III.1.2.1 lectura e interpretación de los resultados

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

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

Se comparó la proporción obtenida con la proporción crítica establecida para cada droga. Por debajo de esta proporción, la cepa se consideró sensible y si la proporción era igual o mayor se consideró resistente.

Proporción crítica establecida para cada droga

Antimicrobiano	Proporción Crítica (%)
INH	1
SM	10
EMB	1
RMP	1

III.2 estudio de garantía de la calidad de las pruebas de resistencia

Las directrices para la vigilancia de la drogo-resistencia publicadas por la OMS/UICTER (Bustreo *et al* 1997), recomiendan para la participación en dichos proyectos la realización de un control de calidad internacional de las pruebas de *resistencia mediante un intercambio de cepas de M. tuberculosis* en dos direcciones: del Laboratorio de Referencia Supranacional (*LRS*) al *LNR* y del *LNR* al *LRS*.

El *LNR-TB* del *IPK* participó durante la ejecución del segundo proyecto (1999) en el proceso de garantía de calidad, para ello las cepas *evaluadas pertenecieron* a los años 1997-98 (593).

III.2.1 del *LRS* al *LNR*

El *LRS* [Laboratorio de Tuberculosis del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) en Buenos Aires, Argentina] envió al *LNR-TB* un total de 20 cepas codificadas con el objetivo de realizar las pruebas de resistencia en nuestras condiciones. Las cepas recibidas *pertenecían* al Instituto de Medicina Tropical “Príncipe Leopoldo” de Amberes, Bélgica (Centro Coordinador Mundial designado para la realización de esta segunda etapa en la ejecución del proyecto). Los resultados obtenidos en el *LNR-TB* del *IPK* *fueron* enviados al *LRS* y posteriormente se recibió la evaluación (sensible o resistente) para cada cepa analizada.

III.2.2 del *LNR* al *LRS*

El *LNR* envió al *LRS* una muestra de *cepas de M. tuberculosis* estudiadas en el período 1997-98 (593) para su evaluación en el *LRS*. De acuerdo a las recomendaciones (Bustreo *et al* 1997) se envió el 10 % de las cepas (60), sin aplicar ningún criterio de selección basado en resultados (p. ej., resistente o sensible). Al igual que en el proceso anterior, se recibió del *LSR* los resultados obtenidos de las cepas analizadas y la comparación con los enviados por el *LNR-TB*.

III 1.3 análisis y procesamiento estadístico de los resultados

Los resultados de las cepas estudiadas fueron clasificados en tres grupos en dependencia si pertenecían a pacientes sin antecedentes de tratamiento anterior o con menos de 1 mes de aplicación [*resistencia primaria (RP) o resistencia en casos nuevos*]; pacientes con antecedentes de tratamiento por un período mayor de 1 mes [*resistencia adquirida (RA) o resistencia en casos previamente tratados*] y *resistencia combinada* que representa el total de la resistencia: **RP + RA**. Para cada clasificación, se calculó el por ciento de cepas que mostró algún tipo de resistencia frente a las drogas estudiadas: monorresistencia (resistencia a una sola droga); multidrogorresistencia (resistencia al menos a INH + RMP) y cualquier otra combinación (Bustreo *et al.* 1997).

Con relación al estudio de garantía de la calidad internacional de las pruebas de resistencia, se compararon los resultados obtenidos entre los dos laboratorios (LRJ y *LNR*), realizando el cálculo de la sensibilidad, especificidad y concordancia. Se confeccionaron tablas para la presentación de los resultados.

III.4 método colorimétrico MTT

cepas de estudio: Se emplearon 38 cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la colección del LNR-TB, enviadas de los CPHE para la vigilancia longitudinal de la resistencia y confirmado el diagnóstico en el laboratorio del IPK. Todas las cepas fueron estudiadas en paralelo por el método MTT y por el MP (ver III 1.2).

Para la realización del MP se empleó el medio UIT (anexo 2) y para el microensayo MTT se utilizó el medio Middlebrook 7H9 (*DIFCO Laboratories, EE. UU.*), enriquecido con 10 % de OADC (ácido oleico - albúmina - dextrosa - catalasa, *DIFCO Laboratories, EE. UU.*). Se utilizaron las mismas drogas descritas para el MP (ver III. 1.2)

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio]

Se preparó una solución patrón de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio (*SIGMA, EE. UU.*) a una concentración de 5 mg/mL en solución salina fosfato (PBS) estéril, pH 6,8. Se conservó a 4°C no más de 3 semanas y protegido de la luz. El *buffer* de solubilización para los cristales de MTT reducidos (formazán), consistió en una solución del 50 % de dimetilformamida [(DMF), (*BDH, Inglaterra*)] en agua desionizada con 20 % de duodecil sulfato de sodio [(SDS), (*Riedel de Haén, Alemania*)]. Se guardó a 4°C, siendo necesario calentarla a 55°C antes de ser utilizada (Abate *et al.* 1998; Mshana *et al.* 1998).

III.4.1 determinación de los valores de CIM por el microensayo MTT

Para la aplicación del microensayo MTT, se tuvo en cuenta los trabajos descritos por Abate *et al.* (1998) y Mshana *et al.* (1998). Nos apoyamos además de artículos publicados sobre el método colorimétrico Alamar Azul (Yajko *et al.* 1995; Franzblau *et al.* 1998); así como la experiencia previa de utilización de este micrométodo en el LNR-TB (Cabrera 1999).

El inóculo fue preparado en las mismas condiciones descritas para el MP (ver 111.1.2). Una vez que se obtuvo el patrón de 1 mg/mL (correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Me Farland), se realizó una dilución 1:2 en medio Middlebrook 7H9, obteniéndose una suspensión bacilar de $3,75 \times 10^6$ células/mL.

Se emplearon placas estériles de poliestireno, de 96 pocillos y fondo plano con tapas (*Costar, EE. UU.*). Dos cepas fueron estudiadas por cada placa de 96 pocillos. Se adicionaron a todos los pocillos de la periferia de la placa 200 μ L de agua destilada estéril con el objetivo de evitar la evaporación del contenido del resto de los pocillos durante el tiempo de incubación.

A los pocillos de las filas C a la G, de la columna 2 a la 11 se le añadieron 50 μL de medio Middlebrook 7H9. Se adicionaron 100 μL de la solución de trabajo de cada antimicrobiano (2X) en los pocillos B₂ y B₇ (INH), B₃ y B₈ (SM), B₄ y B₉ (EMB) y B₅ y B₁₀ (RMP). Una vez que se depositó la concentración máxima de cada antimicrobiano a analizar, se procedió con la pipeta multicanal, a realizar diluciones dobles senadas de la fila B a la G y se descartaron 50 μL al final. De esta forma, las concentraciones de los antimicrobianos en cada pocilio se correspondió con los rangos establecidos para cada droga.

Concentración 2X de cada antimicrobiano y rango ensayado en el Microensayo MTT.

Antimicrobiano	Concentración 2X ($\mu\text{g/mL}$):	Rango de concentración
		($\mu\text{g/mL}$)
INH	2	1-0,03125
SM	16	8 - 0,25
EMB	32	16-0,5
RMP	4	2 - 0,0625

Seguidamente se depositó la suspensión bacteriana en una placa petri estéril y con la pipeta multicanal se añadieron 50 μL de este inóculo a todos los pocillos con antimicrobiano comenzando por la fila G (menor dilución del antimicrobiano) hasta la fila B (mayor concentración). A los controles marcados con CM (control de esterilidad del medio) se le depositaron 50 μL más de medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y a los marcados con CC (control de crecimiento) se le colocaron 50 μL de la suspensión bactenana. De esta forma se alcanzó en todos los pocillos un volumen de 100 μL . Una vez tapadas las placas, se trasladaron cuidadosamente a la incubadora de 37°C donde permanecieron por 5 días.

Materiales y Métodos

Al quinto día de incubación se adicionó al control CC5 de cada cepa 10 μL de MTT y se reincubaron las placas durante 3 1/2 h horas, pasado este tiempo se añadieron 100 μL de SDS-DMF y se incubaron durante toda la noche. En las cepas donde transcurrido este tiempo se produjo un cambio de color de amarillo a violeta intenso, se procedió a realizar el ensayo en todos sus pocillos. En aquellas donde no ocurrió cambio de coloración en el control CC5, se les realizó el ensayo en el pocillo CC7 (día 7 de incubación) y se incubaron 24 horas más. De esta forma, el cambio de color en los pocillos CC5 al CC13 indican el momento en que se le deben adicionar los reactivos al resto de los pocillos de la cepa correspondiente. A continuación se muestra el esquema de la placa utilizada.

Cepa 1					Cepa 2							
	INH	SM	EMB	RMP		INH	SM	EMB	RMP			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1	8	16	2	CM	1	8	16	2	CM	
C		0,5	4	8	1	CC5	0,5	4	8	1	CC5	
D		0,25	2	4	0,5	CC7	0,25	2	4	0,5	CC7	
E		0,125	1	2	0,25	CC9	0,125	1	2	0,25	CC9	
F		0,0625	0,5	1	0,125	CC11	0,0625	0,5	1	0,125	CC11	
G		0,03125	0,25	0,5	0,0625	CC13	0,03125	0,25	0,5	0,0625	CC13	
H												

Leyenda:

Filas: B - G: Rango de concentraciones utilizado para cada *droga* $\mu\text{g/mL}$)

Columnas 6 y 11: Controles de las cepas montadas en la placa.

CM: Control de esterilidad del medio.

CC 5 - CC 13: Controles de crecimiento correspondiente a los días 5, 7, 9, 11 y



Pocillos con 200 μL de agua destilada estéril

III 1.4.2 lectura e interpretación de los resultados

Una vez añadidos los reactivos MTT y SDS-DMF a todos los pocillos de la cepa, la lectura fue realizada a las 24 horas. Esta se realizó por inspección visual, la CIM se definió como la menor concentración de la droga donde no hubo ningún cambio de color (permaneció amarillo).

III.4.3 análisis estadístico de los resultados

Para definir el valor de corte para cada droga en el Microensayo MTT, se tuvieron en cuenta los resultados de las 38 cepas estudiadas, este valor se calculó realizando la curva de Características Operativas para el Receptor (ROC) mediante el Programa Estadístico *MEDCALC*. Para cada droga se calculó la sensibilidad, especificidad, coeficiente de concordancia y discordancia, así como los valores predictivos positivos y negativos, empleando el Programa *Microsoft Excel*. Los valores de corte calculados se emplearon para definir patrones S/R en las cepas estudiadas por MTT y los resultados obtenidos previamente por el MP, lo cual permitió calcular la concordancia entre los dos métodos.

III.5 determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de la nitrato reductasa

cepas de estudio: Se empleó el MNR descrito por Angeby *et al* (2002) para determinar sensibilidad/ resistencia (S/R) en 80 cepas de *M. tuberculosis*, pertenecientes a la colección del LNR-TB del IPK. Todas las cepas Rieron estudiadas en paralelo por el método de la Nitrato Reductasa y por el MP (ver III. 1.2); se utilizaron las mismas drogas que en los trabajos anteriores (INH, SM, EMB y RMP).

preparación de medios y reactivos

Se confeccionó el medio UIT (anexo 2) para realizar la prueba de resistencia por el MP. Para el ensayo del MNR se utilizó este mismo medio, al cual fúe necesario

añadirle nitrato de potasio (KNO₃) antes de realizar la coagulación, de forma tal que quedó a una concentración final de 1 mg/mL. A los dos medios se le adicionaron los antimicrobianos a la concentración crítica requerida (ver II 1.1.2). El PBS (solución salina fosfato) con un pH ± 7,4 se utilizó para realizar todas las diluciones bacilares necesarias para el MNR. Cada lote de medio fue controlado con dos cepas, *M. tuberculosis* *H₃₇Rv* (sensible a las 4 drogas) y *M. tuberculosis* (288-99) perteneciente a la colección del LNR-TB resistente a las cuatro drogas.

Se prepararon los siguientes reactivos:

- (A)** ácido clorhídrico al 50 % (v/v)
- (B)** sulfanilamida al 0,2 % (p/v)
- (C)** N-1-naftilendiamina hidroclorhidrato al 0,1 % (p/v)

En el momento de ser utilizados se mezclaron de la siguiente forma: 1 volumen (A) + 2 volúmenes (B) + 2 volúmenes (C).

preparación del inóculo

A partir de un cultivo de 3 - 4 semanas de incubación en medio UIT se tomó con un asa de 5 mm de diámetro la mayor cantidad de colonias posibles. Esta biomasa se colocó en un frasco estéril de 5 cm de diámetro que contenía 30 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro y 2 ó 3 gotas de PBS y se agitó realizando movimientos circulares con el objetivo de homogenizar la biomasa. Luego se adicionó 1 mL de PBS, se agitó y con una pipeta de vidrio se extrajo el contenido del frasco y este se fue depositando gota a gota en un tubo que contenía 9 mL de PBS hasta que la turbidez se correspondió con el tubo 1 de la escala de MacFarland (3×10^8 células/mL), quedando así constituido el patrón, a partir de este se realizó una dilución 1:10 en PBS.

inoculación

Se emplearon por cada cepa 7 tubos (3 tubos controles y un tubo para cada droga). Se depositaron 0,2 mL de la dilución 1:10 en los 3 tubos controles y los tubos con drogas se inocularon con 0,2 mL del inoculo que se correspondió con el tubo 1 de Me Farland. Los tubos se incubaron a 37°C en posición inclinada, de forma tal que el inóculo se distribuyó sobre toda la superficie, manteniendo las tapas ligeramente abiertas durante 24 - 48 horas. Pasado ese tiempo, se cierran las tapas y los tubos se colocaron en posición vertical hasta que se realizó la lectura (7, 10 y 14 días).

revelado de la prueba

El revelado de la prueba se realizó en diferentes tiempos (7, 10 y 14 días), en dependencia del cambio de color observado en el tubo control. A los siete días se reveló el primer tubo control adicionándole 0,5 mL de la mezcla de reactivos [(A) (B) + (C)] y se observó si se produjo un compuesto coloreado (color rosado). Si esto ocurrió, se revelaron los tubos con drogas siguiendo el mismo procedimiento. En caso de no ocurrir cambio de color en el tubo control se vuelven a incubar hasta el día 10 ó 14.

III. 5.1. lectura e interpretación de los resultados

La cepa se considera sensible si no ocurrió cambio de color en el tubo con droga o si el cambio de color es menor que el que se observa en el tubo control. Si el color que se desarrolló en el tubo con droga es más intenso que el observado en el tubo control la cepa se considera resistente.

III. 5.2 análisis estadístico de los resultados

Se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y coeficiente de concordancia a través de una tabla de doble entrada para el MNR al ser comparado con el MP; se utilizó el Programa *Microsoft Excel*. Se confeccionaron tablas y gráficos donde se muestran los resultados.



Capítulo IV. Resultados

IV RESULTADOS

IV. 1 determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de las proporciones

La determinación de la resistencia utilizando el MP en cepas de *M. tuberculosis* frente a las 4 drogas empleadas: INH, RMP, EMB y SM; nos permitió disponer de los siguientes resultados.

De las 786 cepas estudiadas correspondientes al período 1995-96; 763 pertenecieron a pacientes clasificados como RP (de acuerdo a la información recogida en la encuesta); de ellas 700 resultaron sensibles a las 4 drogas para 91,7 % y 63 cepas (8,3 %) presentaron algún tipo de resistencia (tabla 1).

Al analizar el comportamiento de las cepas resistentes frente a cada droga; vemos que 55 cepas (7,2 %) presentaron monorresistencia, siendo SM la de mayor cifra (6,0 %), seguida de INH con 1,0 %; solo una cepa (0,1 %) fue resistente a RMP y ninguna a EMB.

Con respecto a la presencia de MDR, se reportaron 5 cepas (0,7 %). La asociación más frecuente observada fue INH + RMP + SM en 4 cepas (0,5 %). El resto de los patrones de resistencia obtenidos (INH + SM y RMP + SM), no mostraron importancia, pues solo fue hallado en 3 cepas.

La RA se manifestó en 23 cepas, de las cuales sólo 2 fueron sensibles para 8,7 % y 21 resistentes (91,3 %). La resistencia frente a una droga estuvo presente en 15 cepas (65,2 %), la droga más frecuente fue SM con 13 cepas (56,5 %) seguido de INH con solo 2 cepas (8,7 %), ninguna cepa resultó resistente a RMP y a EMB. Se observó solo 3 cepas (13,0 %) con MDR; el resto de los patrones se comportó de igual forma que en la RP (tabla 1).

La RC estuvo representada por el total de cepas estudiadas (786), de las cuales 702 resultaron sensibles (89,3 %) y 84 resistentes (10,7 %). La resistencia a una sola droga representó el 8,9 % (SM 7,5 % e INH 1,3 %). El 1,4 % (11 cepas) presentó algún tipo de resistencia a RMP. La MDR solo alcanzó 1,0 %. La resistencia a 3 drogas estuvo presente en 7 cepas (0,9 %) y ninguna cepa mostró resistencia a las 4 drogas (tabla 1).

tabla 1 Prevalencia de drogo-resistencia. Cuba, 1995-96

	Primaria		Adquirida		Combinada	
	N	%	N	%	N	%
Total de cepas estudiadas	763	100	23	100	786	100
Sensible a 4 drogas	700	91,7	2	8,7	702	89,3
Cualquier resistencia	63	8,3	21	91,3	84	10,7
Monorresistencia	55	7,2	15	65,2	70	8,9
INH	8	1,0	2	8,7	10	1,3
RMP	1	0,1	0	0,0	1	0,1
EMB	0	0,0	0	0,0	0	0,0
SM	46	6,0	13	56,5	59	7,5
MDR	5	0,7	3	13,0	8	1,0
INH + RMP	1	0,1	0	0,0	1	0,1
INH + RMP + EMB	0	0,0	0	0,0	0	0,0
INH + RMP + SM	4	0,5	3	13,0	7	0,9
INH + RMP + EMB + SM	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Otros patrones	3	0,4	3	13,0	6	0,8
INH + SM	2	0,3	2	8,7	4	0,5
RMP + SM	1	0,1	1	4,3	2	0,3
EMB + SM	0	0,0	0	0,0	0	0,0

En el segundo período de estudio correspondiente a los años 1997-98; 525 cepas pertenecieron a pacientes clasificados con RP, de las cuales 491 (93,5 %) fueron sensibles a las 4 drogas y 34 resistentes, para 6,5 % (tabla 2). El 5,7 % de las cepas presentó resistencia a una sola droga, siendo SM (4,9 %) e INH (0,8 %) las únicas que mostraron estos patrones. En este período no se reportó ninguna cepa con MDR dentro de la clasificación de RP. Sólo se obtuvo 4 cepas con otra combinación de patrones de resistencia (INH + SM y EMB + SM).

Con respecto a la RA, 68 cepas se incluyeron en esta categoría, de ellas 46 fueron sensibles (67,6 %) y 22 resistentes (32,4 %). La resistencia a una droga fue de 17,6 % (11,7 % para SM y 5,9 % para INH). La MDR alcanzó un valor de 11,7 % (8 cepas) y el resto de los patrones representó solo 2,9 % (tabla 2).

En la RC representada por 593 cepas estudiadas; 90,6 % resultó sensible y 9,4 % resistente. La resistencia a una droga fue de 7,1 %; 9 cepas (1,5 %) presentaron algún tipo de resistencia a RMP. La MDR representó solo 1,3 %. Seis cepas mostraron resistencia a 3 drogas. Al igual que en el período anterior, no se obtuvo ninguna cepa resistente a las 4 drogas (tabla 2).

tabla 2 Prevalencia de drogo-resistencia. Cuba, 1997-98

	Primaria		Adquirida		Combinada	
	N	%	N	%	N	%
Total de cepas estudiadas	525	100	68	100	593	100
Sensible a 4 drogas	491	93,5	46	67,6	537	90,6
Cualquier resistencia	34	6,5	22	32,4	56	9,4
Monorresistencia	30	5,7	12	17,6	42	7,1
INH	4	0,8	4	5,9	8	1,3
RMP	0	0,0	0	0,0	0	0,0
EMB	0	0,0	0	0,0	0	0,0
SM	26	4,9	8	11,7	34	5,7
MDR	0	0,0	8	11,7	8	1,3
INH + RMP	0	0,0	2	2,9	2	0,3
INH + RMP + EMB	0	0,0	2	2,9	2	0,3
INH + RMP + SM	0	0,0	4	5,9	4	0,7
INH + RMP + EMB + SM	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Otros patrones	4	0,8	2	3,0	6	1,0
INH + SM	3	0,6	1	1,5	4	0,7
RMP + SM	0	0,0	1	1,5	1	0,2
EMB + SM	1	0,2	0	0,0	1	0,2

IV.2 estudio de garantía de la calidad de las pruebas de resistencia

Los valores obtenidos de sensibilidad, especificidad y concordancia del estudio de garantía de la calidad para cada droga, se muestran en las tablas 3 y 4. En las 20 cepas enviadas del *LSR* al *LNR* la sensibilidad fue de 100 % para INH y SM; por su parte para EMB y RMP fue de 89,0 % y 88,0 % respectivamente (para las 4 drogas fue de 92,6 %). La especificidad fue de 100 % en 3 de las drogas evaluadas (INH, RMP y EMB) y de forma general de 97,6 %. La concordancia total reportada fue de 95,6 % (tabla 3).

tabla 3 Parámetros obtenidos del estudio de garantía de la calidad del *LSR* al *LNR*

Parámetros	INH			SM:;	Total
Sensibilidad	100 %	87,5 %	88,8 %	100 %	92,6 %
Especificidad	100 %	100 %	100 %	90,9 %	97,6 %
Concordancia	100 %	94,1 %	94,1 %	94,1 %	95,6 %

En la tabla 4 se muestran los resultados de las cepas enviadas del *LNR* al *LSR*. La sensibilidad fue de 100 % para INH y RMP y la más baja fue de 33,3 % para EMB (total de 90,1 %). La especificidad obtenida fue de 100 % en las 4 drogas y la concordancia total de 98,0 %.

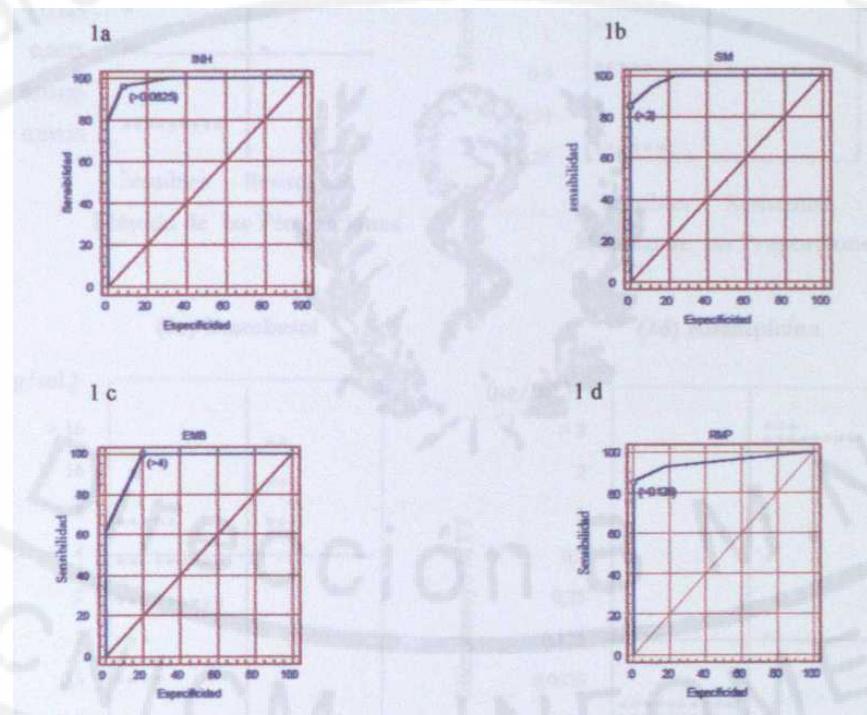
En ambos estudios los parámetros obtenidos fueron muy similares, excepto la baja sensibilidad reportada para EMB (33,3 %) en la segunda etapa del estudio.

tabla 4 Parámetros obtenidos del estudio de garantía de la calidad del *LNR* al *LSR*

Parámetros	INH	RMP	EMB	SM	Total
Sensibilidad	100 %	100 %	33,3 %	91,0 %	90,1 %
Especificidad	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Concordancia	100 %	100 %	96,1 %	96,1 %	98,0 %

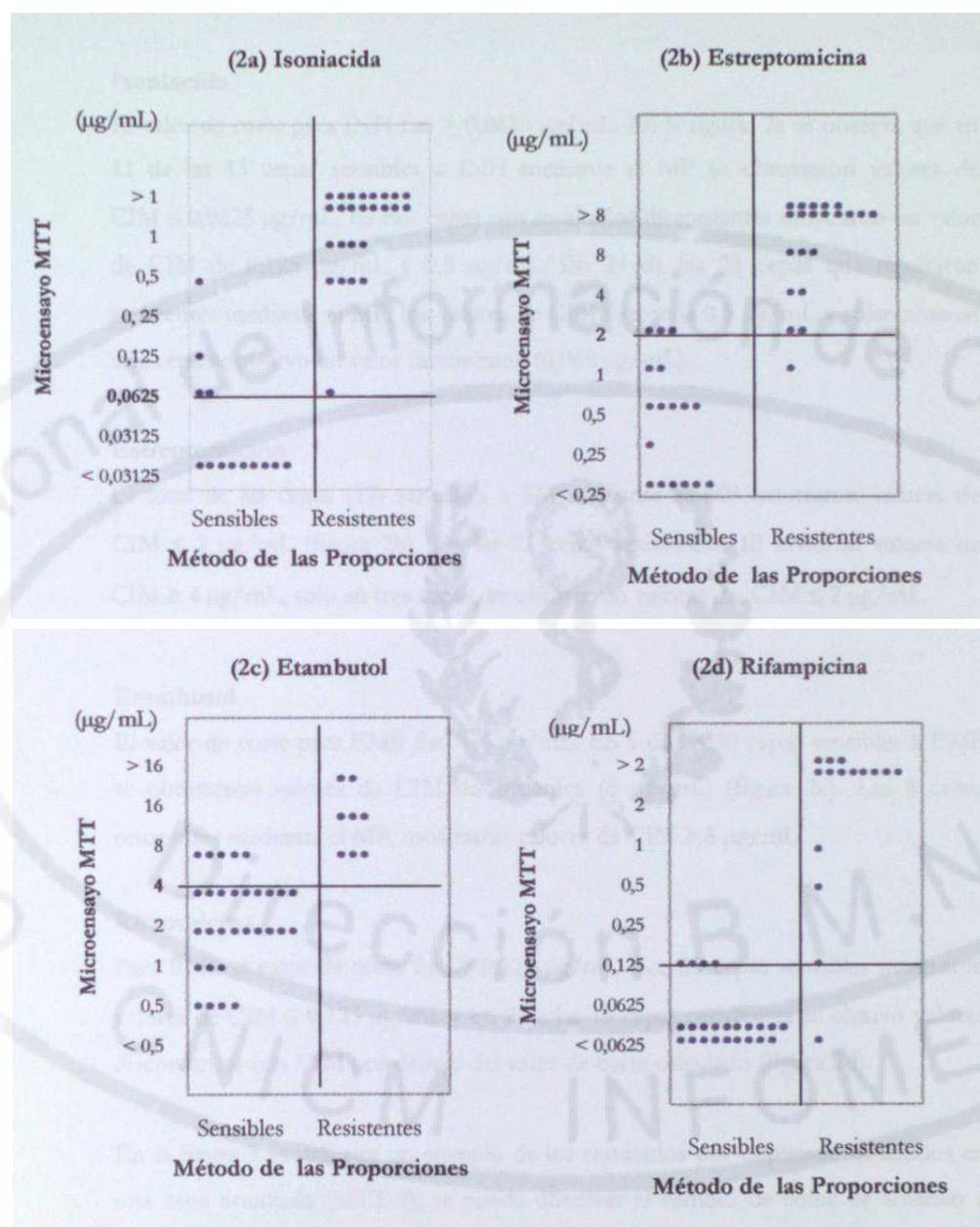
IV.3 método colorimétrico MTT

Una vez que se obtuvo la CIM de las 38 cepas estudiadas, los datos fueron procesados mediante el programa estadístico MEDCAL, obteniéndose las curvas ROC para cada droga (figuras 1a - 1d). Los valores de corte obtenidos fueron $> 0,0625$ ng/mL, > 2 fig/mL, > 4 ng/mL y $> 0,125$ ng/mL para INH, SM, LMB y RMP, respectivamente, con un intervalo de confianza de 95 %.



figuras 1a - 1d Curvas ROC con los valores de CIM de las 38 cepas estudiadas

La disposición de las cepas de acuerdo al valor de corte determinado se muestra en las figuras 2a - 2d. Las líneas verticales dividen cepas sensibles y resistentes para el método de referencia (MP) y las líneas horizontales representan el valor de corte calculado mediante la curva ROC.



figuras 2a - 2d Distribución de las cepas de acuerdo al valor de corte determinado

Isoniacida

El valor de corte para INH fUe $> 0,0625 \mu\text{g/mL}$. En la figura 2a se observa que en 11 de las 13 cepas sensibles a INH mediante el MP se obtuvieron valores de CIM $< 0,0625 \mu\text{g/mL}$, las dos cepas con resultados discordantes mostraron un valor de CIM de $0,125 \mu\text{g/mL}$ y $0,5 \mu\text{g/mL}$. En 24 de las 25 cepas que resultaron resistentes mediante el MP, los valores de CIM fueron $> 0,5 \mu\text{g/mL}$ y solamente en una cepa se obtuvo un valor discordante ($0,065 \mu\text{g/mL}$).

Estreptomicina

El total de las cepas (17) sensibles a SM mediante el MP mostraron valores de CIM $< 2 \mu\text{g/mL}$ (figura 2b). De las 21 cepas resistentes, 18 tuvieron valores de CIM $> 4 \mu\text{g/mL}$, solo en tres cepas, se obtuvieron valores de CIM $< 2 \mu\text{g/mL}$.

Etambutol

El valor de corte para EMB fue $> 4 \mu\text{g/mL}$. En 5 de las 30 cepas sensibles a EMB se obtuvieron valores de CIM discordantes ($8 \mu\text{g/mL}$) (figura 2c). Las 8 cepas resistentes mediante el MP, mostraron valores de CIM $> 8 \mu\text{g/mL}$.

Rifampicina

Para RMP el valor de corte fue $> 0,125 \mu\text{g/mL}$. Las 23 cepas sensibles mostraron valores de CIM $< 0,125 \mu\text{g/mL}$ y en 2 de las 15 cepas resistentes se obtuvo valores discordantes con CIM por debajo del valor de corte calculado (figura 2d).

En la figura 3 se muestra un ejemplo de los resultados por duplicado obtenidos en una cepa estudiada (MTT-9); se puede observar el cambio de color de amarillo a púrpura en los pocillos que resultaron resistentes de acuerdo a la CIM de la droga evaluada.

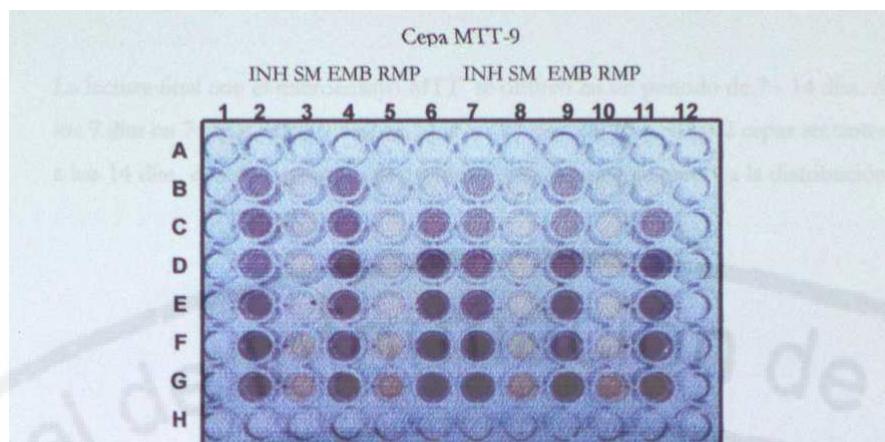


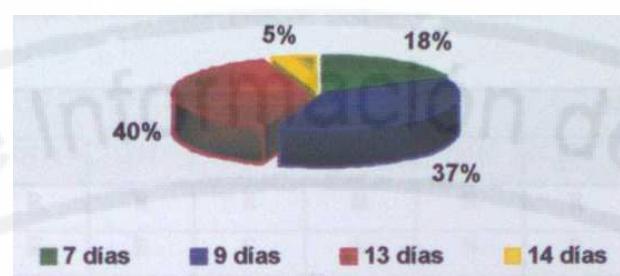
figura 3. Cepa MTT - 9. CIM > 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, < 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CIM > 16, CIM < 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para INH, SM, EMB y RMP, respectivamente

En la tabla 5 se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, coeficiente de concordancia y valores predictivos positivo y negativo, para *cada droga y para el ensayo*; teniendo en cuenta los resultados de las 38 cepas estudiadas y el valor de corte determinado. El EMB mostró una sensibilidad de 100 % y la especificidad más alta se obtuvo para SM y RMP (100 %); por su parte INH y RMP mostraron el coeficiente de concordancia más elevado (94,7 %). El método en su conjunto tuvo una sensibilidad y especificidad de 91,7 % y 95,0 % respectivamente.

tabla 5 Parámetros calculados para cada droga y para el microensayo MTT

Parámetros	Drogas antituberculosas				Ensayo
	INH	SM	EMB	RMP	
Sensibilidad	96,0 %	85,7 %	100%	86,7 %	91,7%
Especificidad	92,3 %	1(X) %	80,0%	100 %	95,0 %
Valor Predictivo (+)	96,0 %	100 %	57,1 %	100%	94,3 %
Valor Predictivo (-)	92,3 %	85,0 %	100 %	92,0 %	92,7 %
Coef. Concordancia	94,7 %	92,1 %	84,2 %	94,7 %	93,4 %

La lectura final con el microensayo MTT se obtuvo en un período de 7 - 14 días. A los 7 días en 7 cepas, a los 9 días en 4, a los 13 días en 15 y en las 2 cepas restantes a los 14 días, con un promedio de 10 días. En la figura 4 se muestra la distribución



de las cepas de acuerdo al día en que se obtuvo los resultados.

figura 4 Tiempo en el que se obtuvo los resultados por el Microensayo MTT

IY.4 determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de la nitrato reductasa

Al emplear el MNR para determinar resistencia en cepas de *M. tuberculosis* y realizar el estudio en paralelo con el MP se obtuvieron los siguientes resultados. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en las 80 cepas estudiadas frente a cada droga. Se puede observar que el total de las cepas coincidió para SM y EMB, en el caso de INH resultaron concordantes 77 cepas (3 cepas discordantes) y para RMP se obtuvo 2 cepas discordantes.

tabla 6 Resultados de las 80 cepas estudiadas por el MNR y por el MP

Cepas	INH	SM		RMP
Concordantes	77	80	80	78
Discordantes	3	0	0	2
Total	80	80	80	80

En la tabla 7 se muestran los patrones de resistencia para las 5 cepas que resultaron discordantes entre los dos métodos.

tabla 7 Patrones de resistencia para las 5 cepas discordantes

Cepas	MPC				MNR			
	INH	SM	EMB	RMP	INH	SM	EMB	RMP
19	R	R	S	R	R	R	S	S
21	R	R	S	S	S	R	S	S
23	R	R	S	S	S	R	S	S
26	R	R	S	R	R	R	S	S
40	R	S	S	S	S	S	S	S

En las figuras 5a y 5b se observan dos patrones de resistencia diferentes a las cuatro drogas estudiadas; en ellas se puede apreciar la presencia de coloración (rosado - fucsia) luego de ser añadidos los reactivos indicando resistencia para la droga en cuestión.

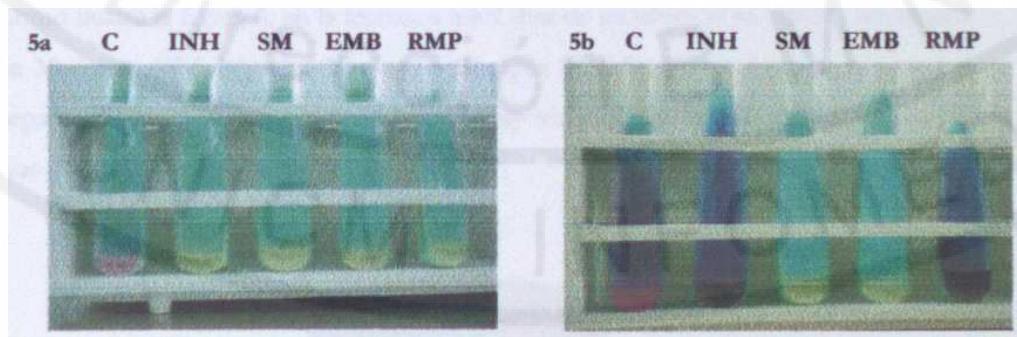


figura 5a Cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, sensible a las cuatro drogas estudiadas, **5b**
Cepa *Mycobacterium tuberculosis* - 69 resistente a INH y RMP y sensible SM y EMB

En la tabla 8 se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, coeficiente de concordancia y valores predictivos positivo y negativo, para cada droga y para el método. Se observa que los mejores resultados se obtuvieron para SM y EMB, donde los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 100 %. En el caso de INH y RMP estos se situaron por encima de 90,0 %. Para el ensayo, la sensibilidad fue de 95,6 %, la especificidad de 100 % y el coeficiente de concordancia de 98,4 %.

tabla 8 Parámetros calculados para cada droga y para el ensayo

Parámetros	INH	SM	EMB	RMP	Ensayo
Sensibilidad	92,3	100 %	100%	92,6 %	95,6%
Especificidad	100 %	100 %	100%	100%	100%
Valor Predictivo +	100 %	100 %	100%	100%	100%
Valor Predictivo-	93,2%	100%	100%	96,3 %	97,6 %
Coef. Concordancia	96,3 %	100%	100%	97,5 %	98,4 %

En el análisis del tiempo de lectura de la prueba podemos apreciar que se obtuvieron resultados en tres intervalos de tiempo diferentes (7, 10 y 14 días). Como ilustra la figura 6, en la lectura a los 7 días de incubación se obtuvo resultados en 38 cepas (47,5 %), a los 10 días en 40 cepas (50,0 %) y a los 14 días para las dos cepas restantes (2,5 %), obteniéndose la mayoría de los resultados entre los 7 y 10 días (97,5 %).

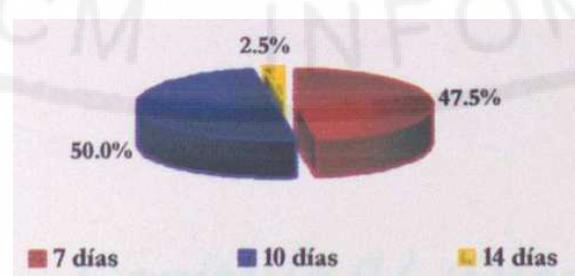


figura 6 Tiempo en el que se obtuvo los resultados por el MNR.



Capítulo V. Discusión

V DISCUSION

V.I determinación de patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de las proporciones

Antes del inicio del primer proyecto mundial en 1994, la magnitud del problema de la resistencia a las drogas antituberculosas no estaba bien definida. Una revisión de la literatura y de reportes no publicados en las últimas décadas sugiere la presencia de altos niveles de resistencia en algunas regiones. Sin embargo, la mayoría de estos estudios fueron realizados con muestras no representativas o en pacientes donde no se conocía el antecedente de tratamiento previo o sí correspondía a casos nuevos. Además, no existió un consenso en la selección de las técnicas de laboratorio a utilizar. La existencia de estas limitaciones, alertó sobre la necesidad de la ejecución de estudios mundiales, con el objetivo de conocer la prevalencia de drogorresistencia y poder aplicar conceptos, criterios y parámetros iguales para realizar comparaciones válidas entre los diferentes países participantes (Cohn *et al* 1997).

La drogorresistencia en TB fue reportada inmediatamente después de la introducción de SM en el tratamiento, aunque esto no fue considerado un tema importante en los países industrializados hasta la aparición reciente de los brotes de MDR en personas infectadas por el VIH (Center for Disease Control 1991; Edlin *et al* 1992). Desde que RMP e INH son las drogas de primera línea más poderosas en el tratamiento de la TB, ha existido un interés creciente por conocer como la MDR afecta negativamente las actividades de control de la TB y como cuando alcanza niveles significativos, los esfuerzos por obtener una reducción de la transmisión de *M. tuberculosis* a través de la cura de los casos de TB será prácticamente difícil de lograr en un país determinado (Caminero 2001).

La administración de la quimioterapia estandarizada de corta duración (*SSCQ* siglas en inglés) con las drogas de primera línea (INH, RMP, SM, EMB, PIR y TIO) bajo la terapia directamente observada (DOT, siglas en inglés) es la piedra angular de los

modernos PNC de TB. Desafortunadamente, los datos disponibles en el resultado del tratamiento de los casos bajo condiciones de programas de rutina sugieren que pacientes con MDR responden pobemente a la SSCC con estas drogas (Caminero 2001).

Como antecedente de estudios de resistencia realizados en Cuba, se cuenta con el reporte de Valdivia y Suarez Méndez (1968), donde 1022 cepas de pacientes procedentes del Hospital Antituberculoso "Julio Trigo" de La Habana fueron estudiadas. Se notificó una RP de 8,6 % frente a INH, SM y PAS; INH fue la droga en que se obtuvo una cifra mayor de resistencia (3,8 %). La RA fue de 90,8 %; donde INH mostró 7,8 %. El 48,2 % de las cepas, resultó resistente a las 3 drogas evaluadas.

González *et al.* (1974) reportaron el comportamiento de 37 cepas de *M. tuberculosis* frente a las mismas drogas utilizadas en el estudio anterior, obteniéndose 16 cepas resistentes (43,0 %). El 37,8 % y 29,0 % fueron resistentes a INH y SM respectivamente.

A partir de 1975 el LNR-TB del IPK comenzó el estudio longitudinal de la resistencia paralelo al PNC con el fin de conocer sus magnitudes, variaciones y aspectos relacionados con el tratamiento masivo. Se registró una RP de 6,0 % en 430 cepas estudiadas (1978-80) frente a 4 drogas (INH, SM, PAS y TIO). El 3,5 % fue resistente a INH y 5,3 % a SM. No se encontró resistencia a PAS y a TIO; esta no estuvo presente en dos o más drogas. La RA fue 5,3 %; la resistencia a cada droga, sola o asociada fue para INH de 4,2 %, a SM de 4,4 %, a PAS 1,8 % y a TIO de 0,7 % (Valdivia *et al.* 1982).

En otro estudio de Valdivia *et al.* (1988) en 503 cepas, se obtuvo una RP de 3,2 %; el 0,6 % presentó RP a la asociación INH-SM. Solo se encontró una RA de 0,6 %. Por su parte, Montoro *et al.* (1992), analizaron 402 cepas empleando 7 drogas antituberculosas (INH, SM, PAS, TIO, EMB, RMP y PIR). La RP fue 2,7 %; 2,2 % correspondió a una droga (SM); solo 0,2 % presentó resistencia a

la asociación SM - INH. La RA encontrada fue 1,5 %; 0,2 % fue resistente a SM y 1,2 % mostró resistencia a INH-RMP (González *et al* 1994; Kantor 1994).

No es posible establecer una comparación con relación a los valores de RA, entre los trabajos mencionados anteriormente y los actuales. A partir del año 1982 ha existido una disminución marcada en este parámetro, incluso valores muy por debajo a los obtenidos en el presente estudio [1995-96 (91,3 %) y 1997-98 (32,4 %)]. Estos últimos valores no representan un aumento de la RA, sino que son producto de la adopción de los nuevos criterios recomendadas en las guías de la OMS/UICTER para la vigilancia de la resistencia (Bustreo *et al* 1997). Actualmente el cálculo de este tipo de resistencia se realiza de acuerdo al total de cepas estudiadas de pacientes con antecedentes de tratamiento que resultan resistentes entre el total de cepas estudiadas de pacientes con igual antecedente; resultando un por ciento mayor; pues cada vez en nuestro país existe un número menor de pacientes que son sometidos a re tratamientos y un número mucho menor de ellos resulta resistente. Anteriormente a este estudio, la RA se determinaba dividiendo las cepas de pacientes que resultaban resistentes con antecedentes de tratamiento entre el total de pacientes estudiados incluidos en ambas categorías (RP y RA); obteniéndose por cientos muy bajos.

En un trabajo realizado en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico de La Habana, en 141 cepas aisladas en el período 1993-95, se aplicaron los criterios actuales para la clasificación de la resistencia. La RP fue de 8,6 % y la mayor resistencia a una droga correspondió a SM (6,1 %); por su parte la MDR fue de 0,0 %. La RA fue de 76,9 % reportada en 20 de 26 pacientes con antecedentes de tratamiento y la MDR de 23,1 % (Rodríguez 1995). A pesar de que este trabajo se realizó con una muestra muy seleccionada de pacientes que acuden al servicio especializado de este hospital; donde en su gran mayoría constituyen casos con complicaciones en la evolución de esta enfermedad; se puede apreciar que los resultados obtenidos son muy similares a los reportados en las etapas 1995-96 y 1997-98.

En Cuba, de acuerdo a las etapas por las cuales ha transitado el PNC, se han adoptado diferentes estrategias de tratamiento. Así, en una primera etapa (1964-1971), este se aplicó en hospitales y dispensarios, por automedicación, con una combinación de SM, INH y PAS durante 18 a 24 meses; en la segunda etapa (1971-87), se utilizó el DOT, con una combinación de SM-INH acompañada de TIO o EMB, durante 12 - 18 meses y la última etapa, de 1987 hasta el presente, se aplica el TAES/DOTS, con la administración de SM, INH más RMP y PIR, en una fase intensiva de 2 meses y una fase de continuación que por lo general dura entre 4 y 6 meses donde se administra INH y RMP (González et al 1993; 1994; Marrero et al 2000).

En la primera etapa (1964-1971) se obtuvo inicialmente una conversión de esputos del 77,0 % en casos nuevos y alrededor de 50,0 % en casos crónicos o en vías de cronicidad. No obstante, en uno de los estudios de enfermos hospitalizados al comienzo del tratamiento se reportó una conversión del 100 %, al cabo de los 6 meses de seguimiento (Caraballoso et al. 1972; González y Caraballoso 1972). Durante la segunda etapa, se alcanzaron valores de conversión de los esputos entre 85,0 - 92,0 % (Aldereguía et al 1972; Caraballoso et al 1973; González y Caraballoso 1974) y en la tercera etapa, se han obtenido tasas de conversión de 95,0 % y más, en los grupos de enfermos estudiados (González et al. 1994; Marrero et al 2000).

Como puede apreciarse, en los estudios de resistencia realizados en Cuba, en etapas tan tempranas como 1965 (recién instaurado el PNC), existía un número elevado de pacientes crónicos, a los cuales se habían administrado varios esquemas de tratamiento anterior, sin obtener la curación, reportándose cifras elevadas de RA (90,8 %). Esta situación es un fiel reflejo del fracaso en los regímenes de tratamiento aplicados en el pasado (antes del PNC); ya en 1970, con la puesta en práctica en Cuba de una estrategia integrada de diagnóstico bacteriológico y tratamiento estrictamente supervisado, comienzan a notificarse altos valores en la conversión de esputos y por consiguiente cifras bajas de resistencia. El mejoramiento de los regímenes de tratamiento y su organización se acompañó de un incremento en la proporción de casos curados; particularmente, esto es más evidente a partir de la implantación del *DOT*.

Durante los cuatro años (1994-97) de la ejecución del primer proyecto mundial, 35 países o regiones de 5 continentes reportaron resultados de resistencia. Once pertenecieron a Europa, ocho de África y las Américas, cinco de la región del Pacífico Oeste y tres al Sudeste Asiático (participaron 16,0 % del total de países, 20,0 % de la población mundial y 16,0 % del total de casos reportados). Los resultados de Cuba correspondientes a la etapa 1995-96, fueron incluidos en dicho proyecto y forman parte de los resultados del siguiente trabajo. La prevalencia de RP fue reportada en 32 países y la RA en 25.

La prevalencia de RP osciló en un rango del 2,0 % (República Checa) hasta 40,6 % en República Dominicana, con un valor medio de 9,9 %. Los valores reportados por Cuba fueron de 8,3 %, encontrándose por debajo del valor medio. Por otra parte, países como Argentina (12,5 %), Bolivia (23,9 %), Estonia e Ivanovo en Rusia (28,2 %), Vietnam (32,5 %), Letonia (34,0 %), Tailandia (36,6 %) y República Dominicana (40,6 %), reportaron cifras por encima de la media.

La media en la prevalencia de cualquier tipo de resistencia para cada droga fue más elevada para INH (7,3 %) y SM (6,5 %), mientras que la resistencia a RMP (1,8 %) y EMB (1,0 %) fue más baja. Los valores de resistencia en nuestro país se encuentran por debajo de la media e incluso entre los valores más bajos reportados por todos los países participantes; fue SM donde el valor se encontró ligeramente por encima de la media.

Desde los primeros estudios de resistencia realizados en Cuba, se pudo observar el incremento de la resistencia a SM y probablemente sea producto de la no aplicación de una política controlada en la administración de la misma (restringiendo su uso solamente en el tratamiento de la TB), además, otro factor importante a tener en cuenta, es que esta droga desde su introducción en 1948 ha sido la más utilizada en el tratamiento de esta enfermedad y posteriormente ha estado presente en todos los esquemas aplicados en Cuba desde inicios del PNC en el año 1963.

La resistencia a RMP como droga única fue muy baja (media 0,2 %), mostrando Cuba 0,1 %; por su parte la resistencia frente a las 4 drogas, reportó una media de 0,2 % con un rango desde 0,0 % (Benín, Bolivia, Bostwana, Brasil, Cuba, Irlanda del Norte, Kenya, Lesotho, Nueva Zelanda, Reino Unido, Rumania y Barcelona en España) hasta 4,6 % [Argentina, 1,7 %, Ivanovo (Rusia) 3,6 %, Estonia 4,5 % y Letonia 4,6 %].

La MDR primaria fue hallada en todos los países estudiados excepto en Kenya; la media fue 1,4 % con un rango que fluctuó entre 0,0 % y 14,4 %. Cuba reportó uno de los valores más bajos (0,7 %). Entre los países con cifras más elevadas se encuentran: Perú (2,5 %), Rumania (2,8 %), Tailandia (3,8 %), Ivanovo (4,0 %), Argentina (4,6 %), Costa de Marfil (5,3 %), República Dominicana (6,6 %), Estonia (10,2 %) y Letonia (14,4 %). En estos países el problema de MDR primaria es preocupante, pues esto denota una alta circulación de cepas MDR en la comunidad y por tanto, un aumento en la transmisión de las mismas.

En casos de retratamiento se reportó con mayor frecuencia la aparición de resistencia que en los casos nuevos. La prevalencia de RA a cualquier droga vanó desde 5,3 % en Nueva Zelanda hasta 100 % en Ivanovo (Rusia), con un valor medio de 36,0 %. Con relación a este parámetro, el valor reportado por Cuba, se encuentra por encima de la media e incluso entre los valores más altos (91,3 %); de este total, 56,5 % presentó resistencia sólo a SM. Estas cifras de RA son producto del número pequeño de pacientes evaluados (23) dentro de esta categoría, de los cuales 21 presentaron algún tipo de resistencia. Esta situación es propia en países donde existe desde hace años un buen desempeño de los PNC y cada vez se reporta menor número de pacientes crónicos con mala respuesta al tratamiento. Por el contrario, países que notificaron valores elevados de RP y MDR, presentan de igual forma, altos por cientos de RA como es el caso de Argentina (41,3%), Estonia (46,2 %), República Dominicana (52,1%), Letonia (73,7 %) e Ivanovo (100 %). En estos lugares, la situación con relación al funcionamiento de los PNC, es bien diferente, pues en muchos de ellos, no se aplica la estrategia *DOTS* y existen altas tasas de fracasos y abandonos en el tratamiento.

La media de resistencia a las 4 drogas en la RA fue de 4,4 % (rango desde 0,0 % hasta 17,0 %). Países como Cuba, Brasil, Kenya, Nueva Zelanda, Rumania y Zimbabwe presentaron 0,0 %. La media de MDR fue de 13,0 %, con un rango desde 0,0 % en Kenya hasta 54,4 % en Letonia. Con relación a este parámetro, Cuba presentó un valor igual a la media referida (13,0 %).

La prevalencia de RC varió desde 2,3 % en la República Checa hasta 42,4 % en República Dominicana, con un valor medio de 12,6 %. Nuestros valores se comportaron por debajo de la media con 10,7 %. La media de MDR en la RC fue de 2,2 % con un rango desde 0,0 % en Kenya hasta 22,1 % en Letonia (Cuba 1,0 %).

La ejecución del primer proyecto mundial de vigilancia de la drogorresistencia permitió conocer la prevalencia en varios países distribuidos por todo el mundo. La presencia de cepas resistentes, fue hallada en todos los países estudiados, y la resistencia a INH o SM fue la más comúnmente encontrada. Aunque el total de MDR fue baja, la alta prevalencia en algunos países reclama una atención internacional.

Estudios realizados en Checoslovaquia (Styblo *et al* 1967), Argelia (Boulahebal *et al* 1989), Corea (Kim *et al* 1992; Kim *et al* 1997) y en E.U.A (Baltimore, Nueva York y Texas), han demostrado la amplia asociación que existe entre la aplicación de la estrategia *DOTS* y la disminución de las cifras de drogorresistencia (Weis *et al* 1994; Chaulk *et al* 1995; Frieden *et al* 1995; Fujiwara *et al* 1997).

Los resultados de la prevalencia de drogorresistencia, en los 35 países participantes en este proyecto, no constituyen un reflejo total de la situación. Los países incluidos, se encuentran ubicados en los 5 continentes y representan varias de las categorías del programa mundial de control de TB y los mismos fueron seleccionados de acuerdo a la conveniencia de aplicar un diseño balanceado de la muestra seleccionada. La prevalencia de esta enfermedad, puede ser más alta en algunas regiones no incluidas en el estudio, mientras que en los países con mejores PNC y facilidades de laboratorio se pudo conocer mucho mejor la situación existente.

Entre 1996 y 1999, se llevó a cabo el segundo proyecto mundial de vigilancia de la drogorresistencia, un número mayor de áreas geográficas (72) perteneciente a 65 países estuvieron representadas (24,0 % del total de países); en 54 de ellos se reportó RP y en 48 RA. La ejecución de este proyecto incluyó a un total de 61 415 pacientes con TB. Los países participantes aportaron el 18,0 % de casos de TB reportados por la OMS en 1997 y el 26,0 % de la población mundial.

En los casos nuevos de TB, la prevalencia de resistencia osciló en un rango desde 1,7 % en Uruguay hasta 36,9 % en Estonia (media de 10,7 %). Cuba presentó un valor de 6,5 %, ligeramente inferior al primer proyecto (8,3 %). Los países con cifras más elevadas fueron: China (Provincia de Henan 35,0 %), Ivanovo (32,4 %), Letonia (29,9 %), Tailandia (25,5 %), Sierra Leona (24,8 %) y Mozambique (20,8 %).

La prevalencia de MDR varió desde 0,0 % en 8 sitios, hasta 14,1 % en Estonia (media de 1,0 %). La MDR también fue elevada en la provincia China de Henan (10,8 %), Letonia (9,0 %), Rusia (Ivanovo 9,0 % y Tomsk 6,5 %), Irán (5,0 %) y Zhejiang (China) 4,5 %. Cuba al igual que Finlandia, Francia, Irlanda del Norte, Nueva Caledonia, Suiza, Uruguay y Venezuela reportaron un valor del 0,0 %. Se puede apreciar en el caso de Cuba una disminución con relación al reporte anterior.

La prevalencia de resistencia a una sola droga fue desde 1,3 % en la República Checa hasta 17,9 % en Sierra Leona con una media de 7,0 %. Cuba redujo su por ciento de 7,2 en el período anterior a 5,7 % en el presente. La resistencia a las 4 drogas osciló en un rango desde 0,0 % en 24 sitios (incluyendo a Cuba), hasta 8,5 % en Estonia.

Entre los pacientes previamente tratados, la prevalencia de resistencia varió desde el 0,0 % hasta 93,8 % con una media de 23,3 %. En esta etapa, Cuba mostró una cifra de 32,4 %, superior a la media reportada, pero mucho más baja que en el período anterior (91,3 %). Esta disminución es producto de la inclusión de un número ligeramente mayor de pacientes evaluados con retratamiento (68) obteniéndose un por ciento mayor de cepas sensibles (67,6 %). Otros países como la República Checa (21,2 %),

Reino Unido (22,2 %), Francia (20,0 %), Italia (60,6 %), Suiza (27,5 %), E.U.A. (20,9 %) y Uruguay (93,8 %) donde existen bajas cifras de RP y MDR, muestran valores de RA muy similares a Cuba e incluso algunos más elevadas. La explicación de este fenómeno ya fue abordada en el análisis de los datos incluidos en el proyecto anterior, pero se insiste en el éxito alcanzado por los PNC en esos países y a las altas tasas de curación que presentan los pacientes al terminar el tratamiento (Espinal 2000; Caminero 2001).

La resistencia al menos a 1 droga fue desde 0,0 % en Finlandia hasta 81,3 % en Uruguay (media 11,3 %). Cuba, disminuyó igualmente este parámetro de 65,2 % a 17,6 %. La prevalencia de MDR en estos pacientes fue desde 0,0 % en 4 sitios hasta 48,2 % en Irán (media de 9,3 %). Nuestros valores fueron de 11,7 %. Cifras importantes se repiten en China (Henan) 34,4 %, Estonia 37,8 %, Irán 48,2 %, Ivanovo y Tomsk en Rusia con 25,9 % y 26,7 % respectivamente. Los valores de resistencia a las 4 drogas fluctuaron desde 0,0 % hasta 28,6 % (media 1,8 %).

La RC se comportó con cifras entre 2,9 % y 40,8 %. Los países con menores y mayores valores de resistencia, así como MDR, ya han sido analizados en los parámetros anteriores de RP y RA.

En países donde se dispone de datos de prevalencia de resistencia por tres o más años, existió un aumento de la RP para cualquier droga; en Estonia, varío desde 28,2 % en 1994 hasta 36,9 % en 1998 y en Dinamarca aumentó desde 9,9 % en 1995 hasta 13,1 % en 1998. Por otra parte, países con datos de resistencia por 2 años como Perú, Nueva Zelanda y Alemania mostraron también un incremento en este parámetro; sin embargo, en la ciudad de Barcelona y Suiza se obtuvo una disminución. A pesar de que no se observó un incremento en Letonia, Estonia e Ivanovo en Rusia, se reportaron cifras elevadas de MDR (9,0 % o mayor en otros sitios). Por su parte, Francia y E.U.A. mostraron una disminución de la resistencia.

En los casos previamente tratados, no hubo evidencias de un incremento en la prevalencia de drogorresistencia al menos a una droga. Existió una disminución en Cuba, Reino Unido, Perú y Corea. En Estonia la prevalencia de MDR en estos pacientes, se incrementó desde 19,2 % en 1994 a 37,8 % en 1998.

Al analizar cuantitativamente la tendencia mundial de la resistencia a las drogas antituberculosas aplicando métodos microbiológicos y epidemiológicos estandarizados, se pudo comprobar que existen hallazgos que indican que la MDR continua siendo un seno problema en países de Europa del Este, especialmente en Estonia, Letonia y Rusia. Tales hallazgos sugieren un aumento en la circulación de cepas drogorresistentes debido a la existencia de un mal manejo en los PNC, lo cual representa hoy en día una amenaza para otros países. La tendencia en Ivanovo, confirmó que la situación es crítica, y la alta prevalencia de drogorresistencia encontrada en el último estudio en Siberia (Tomks), mostró que el problema está presente en otras partes del país e incluso puede extenderse a toda Rusia. Además, se identificaron nuevas áreas con una alta densidad de población (China e Irán) y elevada prevalencia de MDR; lo cual sugiere que la presencia de cepas resistentes de *M. tuberculosis* no está limitada sólo a una parte del mundo.

Desde que se demostró la asociación de cepas MDR con altas tasas de fracaso y muerte (lo contrario a lo que sucede con cepas sensibles), se ha hecho mucho más difícil y costoso tratar esta enfermedad (Mahmoudi y Iseman 1993). Por esta situación, se han ejercido grandes presiones sobre los sistemas de salud de esos países, para que adopten inmediatamente medidas de intervención para el control de la TB, que permitan la implantación de la estrategia preconizada por la OMS (*DOTS*). El uso de drogas de segunda línea para tratar la MDR en lugares con recursos limitados está siendo dirigido como parte de una iniciativa internacional "*DOTS plus*" para lograr la reducción de la transmisión hacia casos nuevos, además, debe ser considerado como parte de un programa bien estructurado, que permita poder realizar la evaluación de la factibilidad en el uso de las mismas (Espinal *et al.* 1999; Dye *et al* 2002; Espinal y Zaleski 2002; Pablos *et al.* 2002).

Los resultados aportados en la segunda etapa del proyecto, mostraron que no se observó un incremento en la prevalencia de MDR en casos nuevos en Bostwana, Chile, Cuba, República Checa, Dinamarca, Reino Unido, Finlandia, Francia, Alemania, Nepal, Holanda, Nueva Zelanda, Irlanda del Norte, Corea, Perú, Escocia, Sierra Leona, Barcelona, Suecia, Suiza, y en los E.U.A.; la mayoría de estos países han mantenido tasas elevadas de curación durante años (Farga *et al* 1991; Hong *et al* 1998; Bloch *et al* 1999; Kenyon *et al* 1999; Espinal 2000; Marrero *et al* 2000).

Al analizar el comportamiento de la resistencia por regiones, vemos que en las Américas, uno de los países con una alta prevalencia de MDR fue República Dominicana; esta situación, probablemente sea el resultado de un debilitamiento en el desempeño del PNC, aunque, otra posible explicación, podría ser el flujo constante de viajeros entre República Dominicana y Nueva York, ciudad donde a principios de los años 90, la prevalencia de MDR fue elevada (Frieden *et al* 1993). La alta prevalencia de MDR primaría en Argentina, pudo estar asociada a la ocurrencia de brotes de TB entre personas seropositivas al VIH en hospitales de Buenos Aires (Morcillo *et al* 1996; Espinal 2000, Organización Panamericana de la Salud 2000).

Todos los países que fueron estudiados en las Américas, por primera vez en la segunda etapa del proyecto - incluyendo Canadá, Chile, Colombia, México, Nicaragua, Uruguay y Venezuela - no mostraron signos de un serio problema de drogorresistencia (Organización Panamericana de la Salud 2000). Se observó una paradoja en Cuba y Uruguay, países que han tenido buenos PNC por muchos años; donde casi todos los pacientes previamente tratados presentaron drogorresistencia, pero solo existió un número pequeño de ellos. Por lo tanto, un número reducido de pacientes previamente tratados con resistencia, no debe estar relacionado como un signo de fracaso del PNC (Espinal 2000; Dye y Espinal 2001).

Muchos países de Africa - incluso aquellos con una alta incidencia de coinfección VIH/TB - no han sido seriamente afectados por la MDR (Raviglione *et al* 1997; De Cock y Chaisson 1999). Esta baja prevalencia, puede ser el resultado de varios

factores entre los que se incluyen: la reciente introducción de RIF, el uso de regímenes de tratamiento gratuito con RIF en la fase de continuación del tratamiento y el incremento en la administración del *DOTS* (Chaisson *et al.* 1999; Trébucq *et al.* 1999). Sin embargo, la resistencia a INH fue hallada en casi 10,0 % de los casos estudiados y en países como Costa de Marfil se reportó 5,3 % de MDR (Raviglione *et al.* 1995, Espinal 2000). Otros países en África con una alta incidencia en TO - incluyendo República Democrática del Congo, Etiopía y Nigeria - no han sido estudiados aún; por lo tanto, se requiere disponer de resultados de drogorresistencia, para tener un fiel reflejo de esta situación en este continente.

En el Oeste de Europa, la MDR no constituyó un serio problema de salud, incluso en Barcelona, donde el 28,0 % de pacientes con TB fueron coinfectados por el VIH, la prevalencia solo fue de 0,5 %. Esta situación refleja que la resistencia presente en los últimos años en estos países (Dinamarca y Alemania), está limitada a subgrupos de inmigrantes (Caminero 1989; Raviglione *et al.* 1993; March 1994; Borchart *et al.* 1995; Lambregts-van Weezenbeeck 1997; Thomsen *et al.* 2000).

Por su parte, Europa del Este, y particularmente la antigua Unión Soviética, mostró un testimonio de un aumento reciente de TB, después de haber experimentado bajas tasas de esta enfermedad en el pasado (Raviglione *et al.* 1994), esta situación probablemente se debe al suministro irregular de drogas y a la existencia de regímenes de tratamiento no estandarizados; otros factores que pueden haber contribuido son la infección y ocurrencia de brotes nosocomiales en prisiones. La prevalencia de MDR fue más elevada en las repúblicas bálticas exsoviéticas que en los otros países estudiados. Si no se implementan rápidamente políticas de control, la prevalencia de MDR está llamada a incrementarse en esa región (Coninx *et al.* 1997).

En Asia se encuentran los dos países más poblados (China e India) que aportan 3,1 millones (39,0 %) del estimado mundial de casos de TB (8 millones), registrándose el 75,0 % de los casos en 5 países de esta región. En la India, la prevalencia de MDR combinada fue de 13,3 %, cifra muy cercana a la reportada en los países situados en el

Báltico. Los resultados del estudio llevados a cabo en China, Vietnam y Tailandia, reflejan una MDR que puede convertirse en una amenaza regional; por lo que se requiere una rápida expansión de la estrategia *DOTS*, la cual solo está aplicada en el 44.0% de la población; además el manejo de la MDR, reclama el uso prudente de las drogas de segunda línea en esta región (Murray *et al.* 1990; Raviglione *et al.* 1995; Espinal 2000).

La realización de estos dos proyectos mundiales proporcionaron datos confiables en la prevalencia de la drogorresistencia en los diferentes países, dados por la estandarización de las técnicas y el control de calidad realizado en los laboratorios. Las limitaciones de los trabajos anteriores (inclusión de muestras no representativas, utilización de técnicas de laboratorio no estandarizadas, no distinguir entre casos nuevos y retratados para establecer los criterios de RP y RA) fueron ampliamente superadas.

Diversas recomendaciones fueron derivadas de estos estudios. Primero, la Red de Laboratorios de Referencia Supranacional, debe ser mantenida como un modelo y un recurso mundial (una de las primeras creadas en Microbiología, podrá constituir un modelo para investigar y vigilar la drogorresistencia en otras enfermedades). Segundo, se hace necesario la realización de estudios repetidos en los mismos países para determinar la tendencia de la MDR en el tiempo y su relación con intervenciones programadas. Tercero, de los 22 países con mayor carga de esta enfermedad (aportan el 80.0 % de los casos nuevos en el mundo), solo 11 poseen datos relevantes; por lo tanto, es importante continuar ampliando los esfuerzos de vigilancia en esos países. Las áreas que no fueron estudiadas, particularmente en África y Medio Oriente, deben ser objetivos para estudios futuros. Cuarto, no pudo ser completamente aplicado en todos los países participantes, la separación entre pacientes previamente tratados de los casos nuevos (Chaulet *et al.* 1995, Dye *et al.* 1999; Caminero 2001).

Estos proyectos no tuvieron como objetivo el tema de la administración y evaluación de los regímenes de tratamiento; sin embargo el cumplimiento de los mismos debe ser aplicado en el presente, de acuerdo a las recomendaciones hechas por la OMS y la

UICTER (Crofton *et al* 1997). Por lo tanto, pacientes con MDR, deben ser trasladados a centros especializados para la aplicación de tratamientos adecuados; siendo además necesario, realizar el análisis del costo - efectividad para lograr el mejoramiento en la distribución de los recursos para el control de la MDR. Debe realizarse además, investigaciones adicionales para evaluar la transmisibilidad y la virulencia clínica de las cepas MDR comparándola con la TB causada por organismos drogosenfisibles (Cullinam 2002; Kim *et al* 2002; Suarez 2002).

La implementación de las guías de la OMS/UICTER (Bustreo *et al* 1997) permitió realizar un trabajo de consenso en la definición y terminología utilizada, además la infraestructura de salud y los procedimientos de laboratorio existentes, hicieron posible la determinación de la prevalencia de drogorresistencia en diferentes regiones donde varió con respecto a la carga de TB. Sin embargo, distinguir entre la veracidad de RP y RA no siempre es posible. En ausencia de registros de TB, la diferenciación depende de las declaraciones que hagan los pacientes de haber tenido un tratamiento anterior y en el entrenamiento de los clínicos en obtener historias confiables. Los pacientes pueden estar conscientes en negar el antecedente de tratamiento. La clasificación incorrecta de los pacientes en casos nuevos o previamente tratados, puede incrementar artificialmente la prevalencia de RP. Entre los pacientes retratados, la drogorresistencia pudo haber estado presente en el episodio original de la enfermedad y quizás haya contribuido al fracaso del tratamiento. Así, se supone que no todos los casos de RA pueden ser debido a regímenes inadecuados o tratamientos no terminados.

Por todo lo anterior, se hace necesario implementar de forma urgente medidas para el manejo de la MDR, pero éstas solo pueden ser exitosas, si existe el control de las drogas de primera línea en los casos sensibles, que en definitiva constituyen la gran mayoría de los casos de TB. Si esto no se garantiza, es muy probable no obtener éxito alguno, aunque se disponga de drogas de segunda línea para estos casos y traerá como consecuencia la expansión de este fenómeno hacia otros lugares con el peligro inminente de convertir la TB en una enfermedad incurable (Mitchison y Nunn 1986; Frieden *et al* 1995; Espinal y Zaleski 2002).

V.2 estudio de garantía de la calidad de las pruebas de resistencia

La red de *LSR* de la OMS/UICTER fue creada en 1994 con el objetivo de conocer la exactitud de los métodos utilizados en los diferentes laboratorios para determinar la resistencia de *M. tuberculosis* frente a las principales drogas antituberculosas y poder comparar los datos obtenidos de la vigilancia entre los diferentes países participantes en los proyectos mundiales. La red de *LSR* estuvo integrada por 23 laboratorios; durante el período 1994-98 el Laboratorio Canadiense del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) actuó como centro coordinador. En 1999, el Instituto de Medicina Tropical “Príncipe Leopoldo” de Amberes, Bélgica actuó como nuevo centro coordinador.

Los *LSR* pertenecientes a cada región geográfica fueron responsables de realizar el control de calidad a los *LNR* situados en su propia región. Seis rondas de pruebas de pruebas de calidad fueron realizadas durante el período 1994 - 99 (coincidiendo con los 2 proyectos mundiales). Los dos Centros Coordinadores responsables (Canadá y Bélgica) en cada período de estudio, distribuyeron 2 juegos idénticos (20 cepas) de cultivos de *M. tuberculosis* a todos los *LSR* y estos a su vez a los *LNR* participantes, los cuales debieron realizar la determinación de los patrones de resistencia de acuerdo a la técnica de rutina utilizada en cada país y posteriormente enviaron los resultados obtenidos (cepas sensibles o resistentes) a los *LSR*. Los parámetros de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad fueron calculados para cada laboratorio y para cada una de las 4 drogas analizadas.

Como premisa al comienzo del primer proyecto mundial, el Laboratorio del CDC de Canadá dirigido por el Dr. Laszlo, coordinó la realización de la primera ronda de control de calidad de las pruebas de resistencia a los 16 laboratorios participantes. La sensibilidad total más baja fue obtenida para EMB con 66,0 %, seguida de SM con 88,0 %; por su parte, INH y RMP se comportó con 99,0 % y 94,0 % respectivamente. La especificidad fue de 100 % para SM e INH y para RMP y EMB fue de 96,0 % y

98,0 % respectivamente. La reproducibilidad más baja fue obtenida para SM con 89,0 %. Al analizar el comportamiento total de las cuatro drogas analizadas, observamos que la sensibilidad se comportó con 87,0 %, la especificidad con 99,0 % y la eficiencia y reproducibilidad fue de 95,0 % y 93,0 % respectivamente. Los valores de sensibilidad variaron ampliamente entre los diferentes laboratorios; sin embargo, la especificidad se comportó de forma más homogénea y más alta que la sensibilidad (Laszlo *et al* 1997).

Laszlo *et al* (2002) durante los años 1994-98 realizó 5 rondas de control de calidad donde participaron 14 laboratorios en todas las etapas. La eficiencia, sensibilidad y la especificidad mostraron que los laboratorios evaluaban la sensibilidad a RMP y a INH de manera muy confiable con valores que iban de 97,0 % a 99,0 %. Esto es particularmente importante si se tiene en cuenta que son las drogas más importantes en el tratamiento de la TB y son las que definen la presencia de MDR. La sensibilidad para EMB aumentó de 60,0 % en la primera ronda a 98,0 % en la última, sin disminución paralela de la especificidad. Este estudio demostró que los controles de calidad regulares pueden mejorar de manera significativa la calidad de las pruebas de resistencia, aun en los laboratorios más desarrollados. Los resultados discordantes obtenidos con respecto al uso de SM y EMB, exigen una intervención de mejoramiento y pueden ser fácilmente corregidos si se adoptan nuevas recomendaciones internacionales para definir un mismo criterio de drogorresistencia (concentración, proporción crítica, tiempo de lectura de la prueba y corrección de la potencia de las drogas), (Laszlo *et al* 1997, 2002).

Otro estudio de proñciencia realizado más recientemente por el LJR de Italia a los 22 laboratorios regionales de su país, arrojó una sensibilidad de 76,6 %; la especificidad fue de 97,2 % y la reproducibilidad de 92,8 % (Migliori *et al* 2000). Al igual que el trabajo realizado por Laszlo *et al.* (1997, 2002), los valores más altos (por encima de 90,0 %) correspondieron a INH y RMP y la sensibilidad para SM y EMB se comportó con valores inferiores.

Los 58 países incorporados en la segunda etapa del proyecto reportaron los valores de concordancia entre los resultados de los LNR participantes y los *LSR*. La cifra más baja correspondió a Tomsk en Siberia con 82,0 % y 9 países obtuvieron 100 %; con un valor medio de 95,7 %. Se obtuvo una sensibilidad total de 98,0 % y una especificidad de 95,0 %. Como se refleja en los resultados, el LNR-TB del IPK, obtuvo 98,0 % de concordancia; superior a la media reportada. Otro parámetro evaluado en las pruebas de proficiencia fue la especificidad para RMP, donde en 50 países (incluyendo Cuba) se obtuvo 100 %, la cifra más baja correspondió a Eslovaquia con 90,0 % y la media fue de 99,4 %.

En los resultados obtenidos por Cuba en los 2 procesos de control de calidad en que participó, las cifras de concordancia se comportaron por encima del 94,0 % para todas las drogas; la sensibilidad más elevada se obtuvo para INH y SM (100 %) en las cepas enviadas del *LSR* al *LNR* y para INH y RMP (100 %) en las cepas del *LNR* al *LSR*. La especificidad fue del 100 % en los 2 procesos de control de calidad para INH, RMP y EMB. Por su parte, EMB, mostró una sensibilidad de 33,3 % (cepas analizadas en el *LNR* y enviados los resultados al *LSR*), pues sólo 3 cepas del total evaluadas, resultaron resistentes; sin embargo la especificidad fue de 100 % en ambos estudios. Como se puede apreciar en las recomendaciones realizadas por Laszlo *et al* (1997, 2002), coincidimos en que esta droga requiere una estandarización para su uso en pruebas de resistencia.

Consideramos que la participación del LNR-TB en los 2 proyectos mundiales organizados por la OMS/UICTER, permitió realizar el perfeccionamiento de la vigilancia de la resistencia con la adopción de los criterios internacionales actuales obteniéndose resultados confiables y comparables con otros países del mundo, además los resultados alcanzados sugieren la baja transmisión de cepas MDR que existen en la comunidad, reconociéndose a nivel mundial el buen funcionamiento del PNC en Cuba y el éxito de la aplicación en nuestro país del tratamiento estrictamente supervisado desde el año 1971.

V.3 método colorimétrico MTT

En los últimos años se ha estado trabajando a nivel mundial en el desarrollo de métodos colorimétricos para estudios de resistencia en TB. Yajko *et al* (1995) y Franzblau *et al* (1998) empleando el método colorimétrico Alamar Azul (MAA) reportaron muy buena correlación con el método de las proporciones en agar y el sistema radiométrico *BACTEC* - 460 respectivamente, logrando sus resultados en un corto período de tiempo.

En el *LNR-TB*, Cabrera (1999) empleó el MAA, en una primera fase de un estudio multicéntrico organizado por la Red Latinoamericana y del Caribe de Tuberculosis (*RELACTB*), donde obtuvo los resultados en un período de 9 - 12 días con una alta concordancia con el MP. En una segunda etapa de este estudio, en el Laboratorio Coordinador se analizaron los resultados de 4 laboratorios de *RELACTB* obteniendo resultados en un período de aproximadamente 4 días con valores de concordancia con el MP de 80,0 %, 97,5 %, 75,0 % y 90,0 % para INH, SM, EMB y RMP, respectivamente (Delgadillo *et al* 2001).

Gómez-Flores *et al* (1995) reportaron el empleo de otro método colorimétrico, el ensayo MTT, que había sido descrito con anterioridad, para medir viabilidad celular. Estos autores compararon dicho ensayo con el método de incorporación de glicerol-³H en la detección de crecimiento de *M. avium-intracellulare*, encontrando muy buena correlación y además lo emplearon para determinar CIM de clofazimine y resorcinimicina frente a cepas de esta misma especie.

Abate *et al* (1998) y Mshana *et al* (1998) describieron el ensayo MTT para la detección de resistencia a RMP, empleando una concentración crítica, en cepas de *M. tuberculosis* y encontraron una perfecta correlación con los resultados obtenidos por el sistema radiométrico *BACTEC* - 460.

En los estudios anteriores los métodos colorimétricos resultaron rápidos, cuantitativos, y además mostraron una buena correlación con los métodos convencionales (Gómez- Flores *et al* 1995; Yajko *et al* 1995; Abate *et al* 1998; Franzblau *et al* 1998; Mshana *et al* 1998; Cabrera 1999; Delgadillo *et al* 2001). Todas estas ventajas nos motivaron a implementar en el LNR-TB el microensayo MTT y aplicarlo en la determinación de CIM a las drogas de primera línea en el tratamiento de la TB.

El tiempo de lectura de la prueba, constituye un reto para los estudios de resistencia. La obtención de resultados del ensayo MTT depende de la actividad metabólica de cada cepa y por tanto del período de incubación que requiere cada una para alcanzar el estadio fisiológico y multiplicación óptima para reducir la sal de tetrazolio. Por esta razón, todos los resultados en las cepas estudiadas no fueron obtenidos el mismo día.

Mientras que con el MP, los resultados para todas las cepas fueron a los 42 días, con el microensayo MTT se obtuvieron con un promedio total de 10 días, en un rango de 7 - 14 días. Yajko *et al* (1995) empleando el MAA, obtuvieron resultados a los 7 días en el 58,0 % de las cepas. Cabrera (1999), empleando el MAA obtuvo resultados en un promedio de 10 días, necesitando 12 días para lograr resultados en el 50,0 % de las cepas.

Con la aplicación de estos métodos se observa una considerable disminución del tiempo en comparación con los métodos convencionales, demostrándose las ventajas de emplear métodos capaces de detectar signos tempranos del metabolismo de las micobacterias en estudios de resistencia para *M. tuberculosis*.

Con el objetivo de determinar el valor de CIM a partir del cual las cepas fueron consideradas sensibles o resistentes, se estudiaron mediante el microensayo MTT 38 cepas de *M. tuberculosis* con patrones de resistencia conocidos por el MP. Las CIM donde se obtuvieron los mejores valores de sensibilidad y especificidad fueron: > 0,0625 µg/mL, > 2 µg/mL, > 4 µg/mL y > 0,125 µg/mL para INH, SM, EMB y RMP, respectivamente. Morcillo *et al* (2001), han trabajado también con vistas a

estandarizar el microensayo MTT para la determinación de CIM de las drogas antibacilares. Estos autores encontraron un valor de corte para SM igual al reportado en el presente trabajo, mientras que para las otras drogas obtuvieron valores de CIM correspondientes a una dilución menor a la reportada por nosotros (0,125 µg/mL, 8 µg/mL y 0,25 µg/mL para INH, EMB y RMP, respectivamente). Con los valores de corte determinados en el presente trabajo, se encontró una correlación entre el microensayo MTT y el MP de 93,4 %, mientras que Morcillo *et al.* (2001) obtuvieron un coeficiente de concordancia de 95,0 %.

Franzblau *et al.* (1998), encontraron una correlación entre el MAA y el sistema radiométrico *BACTEC* - 460 de 87,9 %. Yajko *et al.* (1995), al comparar el MAA con el método de las proporciones en agar reportaron 97,0 % de concordancia entre ambos. Cabrera (1999), empleando los puntos de corte encontrados por Yajko *et al.* (1995) y Franzblau *et al.* (1998), reportó una concordancia entre el MAA y el MP de 95,0 % y 97,5 %, respectivamente.

Morcillo *et al.* (2001) empleando el método colorimétrico MTT para determinar CIM a drogas de segunda línea para el tratamiento de la TB, reportaron resultados a los 8 días de incubación con una concordancia de 100 % con el método de las proporciones en agar. Recientemente Foongladda *et al.* (2002), obtuvieron una concordancia de 97,0 % entre este método y el MP al estudiar 279 aislamientos clínicos frente a INH (sensibilidad y especificidad de 89,2 % y 99,5 %, respectivamente) y RMP (sensibilidad y especificidad de 94,1 % y 100 %, respectivamente); sin embargo, al comparar dichos resultados con el sistema radiométrico *BACTEC* - 460 encontraron 34,0 % de discordancia. Estos resultados permiten apreciar que aún entre dos métodos estandarizados pueden encontrarse discrepancias.

Laszlo *et al.* (1997), plantearon que cuando hay cepas de *M. tuberculosis* en las que el valor de CIM o proporción de mutantes resistentes (para el MP) coincide con el valor de corte, se pueden presentar discrepancias al interpretar los resultados y estas se hacen mayores si han sido estudiadas pocas cepas; situación que ha influido en los resultados.

obtenidos con el método colorimétrico MTT. En nuestro trabajo encontramos varias cepas con valor de CIM que coincidieron con el valor de corte determinado, considerándose sensibles. En el caso de INH y RMP, hubo una cepa con CIM igual al valor de corte que resultó resistente por el MP obteniéndose una concordancia de 94,7 %. Para SM, hubo 5 cepas con CIM igual al valor de corte y de estas, 2 fueron resistentes por el MP, para una concordancia entre el microensayo MTT y el MP de 92,1 %. En el caso de EMB, hubo 9 cepas con CIM igual al valor de corte, resultando todas sensibles por el MP, sin embargo la concordancia entre los dos métodos fue del 84,2 % debido a que 5 cepas sensibles por el MP mostraron valores de CIM superiores al valor de corte.

Es válido señalar que son muchos los parámetros que influyen en la estandarización de un método, más aún, si tenemos en cuenta que todavía existen dificultades con los métodos de referencia. En un estudio realizado por Laszlo *et al* (1997), se informaron resultados obtenidos por métodos convencionales como el MP, el método de las proporciones en agar y el sistema radiométrico *BACTEC* - 460 y se obtuvo valores de concordancia de 99,0 % y 94,0 % para INH y RMP, respectivamente. Los valores de concordancia fueron menores para SM y EMB.

Luego de la realización de estudios que incluya un mayor número de cepas, confirmen la reproducibilidad del método y brinden valores de sensibilidad, especificidad y concordancia elevadas; se puede implementar el microensayo MTT, empleando una concentración crítica (valor de corte) para evaluar la correspondencia con los resultados del MP. Esto aumentaría las posibilidades de aplicación con un menor gasto en recursos al poder estudiar más de 2 cepas por placas. En un estudio realizado por Palomino y Portaels (1999), empleando el MAA con una concentración crítica encontraron una correlación del 97,0 % con el MP y una considerable disminución de los costos.

Algunos autores han presentado dificultades en la estandarización del ensayo para INH. De Logu *et al.* (2001), obtuvieron resultados a los 3 y 6 días para RMP y SM respectivamente, mientras que en este tiempo para INH se hacía imposible determinar el patrón S/R pues la producción de formazán fue alta, independientemente de la inhibición del crecimiento que encontraron al realizar un conteo de unidades formadoras de colonias, por tal motivo, necesitaron 10 días para obtener patrones de resistencia frente a esta droga. Ellos plantearon que esto pudiera deberse al mecanismo de acción de cada droga, teniendo en cuenta que INH requiere largos períodos de exposición para poder realizar su función antimicobacteriana.

Abate *et al.* (1998), reportaron que existen factores que pueden favorecer la reducción del MTT independientemente de que se produzca una inhibición del crecimiento, entre estos se encuentran compuestos con acción reductora sobre nucleótidos de pinmidina y radicales superóxido, que pudieran actuar sobre el MTT luego de largos períodos de incubación. Esto quizás fue lo sucedido a De Logu *et al.* (2001), que luego de 10 días de exposición frente a INH encontraron una elevada producción de formazán y sin embargo, no hubo crecimiento micobacteriano en las muestras con esta droga. Por esta razón, algunos investigadores han recomendado la aplicación de una técnica que mida la actividad catalasa (teniendo en cuenta que las mutaciones en el gen que codifica para la enzima catalasa - peroxidasa, son las que se presentan con mayor frecuencia cuando hay resistencia a INH), para determinar resistencia a esta droga (Abate *et al.* 1998; Caminero 2001).

De Logu *et al.* (2001; 2003) realizaron recientemente un estudio en el que compararon dos sales de tetrazolio, MTT y XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H- tetrazolio-5-carboxinilide], encontrando muy buena correlación entre ambas, con la ventaja de que el ensayo con XTT no requiere del paso de adición del *buffer* de solubilización, pues el formazán que se obtiene es soluble en agua.

La introducción de métodos genotípicos y fenotípicos abren nuevas posibilidades para los estudios de resistencia a las drogas antibacilares y por tanto favorecen la vigilancia de la misma. Los primeros tienen la ventaja de ser rápidos y específicos, pero muy costosos (Palomino 2000; Schluger 2001). Los métodos fenotípicos como el microensayo MTT requieren una evaluación muy minuciosa y una validación para obtener niveles aceptables de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad antes de que puedan reemplazar los métodos convencionales (Palomino 2000; Morcillo *et al* 2001; Foonglada *et al* 2002).

Estudios adicionales con un mayor número de aislamientos clínicos son necesarios para confirmar la aplicabilidad del método colorimétrico en estudios de resistencia a las drogas antibacilares, no obstante debemos resaltar que en nuestro trabajo se obtuvieron resultados comparables con el MP, lo cual está en correspondencia con lo reportado en la literatura internacional, constituyendo una herramienta útil en futuras investigaciones clínicas y epidemiológicas.

V.4 determinación de los patrones de resistencia a las drogas antibacilares por el método de la nitrato reductasa

La información acumulada sobre la genética de la resistencia en *M. tuberculosis*, ha permitido desarrollar métodos que brindan los resultados en tiempos relativamente cortos. La mayoría de estas técnicas requieren de una considerable inversión en equipos y formación profesional, lo cual las coloca más allá del alcance de los países de bajos ingresos (Palomino 2000; Schluger 2001; Somoskovi 2001).

Recientemente se ha visto la posibilidad de emplear el MNR para los estudios de resistencia en tuberculosis (Golyshevskaia *et al*. 1996; Ángeby *et al*. 2002). En el presente trabajo se empleó este método para determinar la resistencia de 80 cepas de *M. tuberculosis* frente a las principales drogas antituberculosas. Sólo en 5 cepas se

obtuvo resultados discordantes y estas se comportaron como falsos negativos al ser comparados con el método de referencia (MP). Siempre se evidenció la discordancia para una sola droga (tres cepas para la INH y dos cepas para la RMP).

Ángeby *et al.* (2002) compararon el MNR con el sistema radiométrico *BACIHC-460*. Al estudiar las cuatro drogas (INH, SM, EMB y RMP), encontraron que los valores de sensibilidad y especificidad oscilaban entre 75,0 %-100 % y 83,0%-100% respectivamente; obteniéndose el valor más elevado de sensibilidad para RMP (100 %) y el más bajo para EMB (75,0 %). La especificidad se comportó de igual forma para la RMP (100 %) y el valor inferior correspondió a SM. En nuestro estudio los valores de sensibilidad para las drogas se ubicaron en un rango entre 92,3 % para la INH hasta el 100 % para SM y EMB. La especificidad resultó del 100 % para las cuatro drogas, obteniéndose resultados superiores al trabajo realizado por Ángeby *et al.* (2002); sin embargo cuando se analizaron los métodos de forma general, se pudo apreciar que los dos parámetros estuvieron por encima de 90,0 %.

Golyshevskaia *et al.* (1996) reportaron el empleo del MNR en medio líquido obteniendo los resultados en un período de tiempo entre 7 y 10 días. Ángeby *et al.* (2002) obtuvieron el mayor por ciento de resultados en igual período de tiempo; lo cual coincide también con los hallazgos del presente trabajo.

El MNR pudiera incluir un paso adicional, que consiste en la adición de polvo de zinc para identificar aquellas cepas que continúan la degradación del nitrito a óxido nítrico. Al realizar nuestro estudio no encontramos ninguna cepa que presentara estas características en su metabolismo, por lo que no fue necesario este procedimiento ya que todas las cepas estudiadas resultaron ser positivas al menos al día 14 de la lectura (Virtanen 1960; Ángeby *et al.* 2002).

De acuerdo a las posibilidades que brinda esta técnica en cuanto a rapidez, fácil ejecución y considerando confiables los resultados obtenidos en el análisis estadístico realizado, el MNR puede servir también para evaluar drogas de segunda línea, teniendo en cuenta la importancia para los pacientes infectados con cepas MDR donde los tratamientos con drogas de primera línea fracasan. Por tanto, este método puede convertirse en una herramienta útil para ser aplicable en países con pocos recursos, dado que sólo se requiere el equipamiento microbiológico de base para su ejecución.

Con la introducción de estos dos métodos novedosos para la detección rápida de resistencia en cepas de *M. tuberculosis* y por la experiencia acumulada en dicho tema el LNR-TB como Centro Colaborador OPS/OMS cuenta con poderosas herramientas útiles, las cuales pueden ser implementadas en otros países de la región donde la TB y la MDR constituyen un problema de salud.

Capítulo VI. Conclusiones

VI CONCLUSIONES

1. Es la primera vez que el LNR-TB/Centro Colaborador OPS-OMS participa en un estudio de vigilancia de la resistencia a drogas antituberculosas bajo el auspicio de la OMS/UICTER, permitiendo realizar el perfeccionamiento de la vigilancia con la adopción de los criterios internacionales y la obtención de resultados confiables y comparables con otros países del mundo.
2. Los resultados de este trabajo permitieron conocer y comparar la magnitud de la circulación de cepas MDR en Cuba, el cual sugiere que existe baja transmisión de cepas resistentes en la comunidad.
3. La vigilancia sistemática de la resistencia realizada en el LNR-TB, ha permitido conocer la tendencia descendente de la misma, lo que se corresponde con las altas tasas de curación de los pacientes y es reflejo del éxito de la aplicación del tratamiento estrictamente supervisado; reconociéndose a nivel mundial el buen funcionamiento del PNC.
4. Los resultados obtenidos por el LNR-TB en el estudio internacional de garantía de la calidad de las pruebas de resistencia, reportaron altos valores de sensibilidad, especificidad y concordancia, demostrándose la confiabilidad de las pruebas realizadas.
5. Con la evaluación del método colorimétrico MTT se determinó los valores de CIM para las 4 drogas utilizadas. Los parámetros de sensibilidad y especificidad para el ensayo se comportaron superior al 90 %.

6. Se obtuvo una buena concordancia con los métodos MTT y MNR, al compararse con la técnica de referencia (MP). Los métodos evaluados resultaron rápidos y de fácil ejecución para la detección de resistencia a las drogas antibacilares en cepas de *M. tuberculosis*.



Capítulo VII Recomendaciones

1.

VII RECOMENDACIONES

1. Continuar realizando la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis* frente a las drogas antituberculosas con los nuevos criterios adoptados y mantener la información de los resultados obtenidos a los funcionarios del PNC y a la red de laboratorios del país.
2. Participar en futuros estudios mundiales y ampliar la colaboración con otros laboratorios como parte de los términos de referencia del Centro Colaborador.
3. Estudiar un número mayor de aislamientos clínicos por el método colonmétrico MTT con vistas a superar los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos e implementar el microensayo MTT para determinar CIM a drogas de segunda línea en el tratamiento de la Tuberculosis y realizar el montaje de la técnica empleando una concentración crítica para cada droga para lograr un mayor rendimiento.
4. Aplicar el MNR directamente en muestras clínicas, ensayar con drogas de segunda línea y proponer la ejecución de un estudio multicéntrico entre los miembros de RELACTB con el objetivo de que el MNR sea utilizado para estudios de resistencia en *M. tuberculosis*.



Capítulo VIII.
Referencias Bibliográficas

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VIII. 1 bibliografía

- Abate G, Mshana RN, Miomer H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3(4,5-dimethyl thiazol -2 - yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int Tuberc Lung Dis 1998; 2:1011-6.
- Aldereguía G, González E, Pedraza R.O, Valdivia J, Frías E, Muñoz L, *et al*. Nuestra experiencia en el programa de control de la tuberculosis sobre la base del pesquisaje bacteriológico y el tratamiento ambulatorio controlado. Bol. Hig. Epi. 1972; 10:41-52.
- Ángeby K, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductasa assay. J Clin Microbiol 2002; 40:553-5.
- Armas L, González E. El manejo de la tuberculosis en la República de Cuba. Rev Cubana Med Trop 1998; 50:150-8.
- Ausina V. Tuberculosis multirresistente. Puntualizaciones y reflexiones sobre un tema polémico y de candente actualidad. Med Clin (Barc) 1996; 106:15-8.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A. inh A, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1994; 263:172.
- Bastian I, Portaels F. Multidrug-resistant tuberculosis: past, present and future. En: Bastian I, Portaels F, editores. Multidrug-resistant tuberculosis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London; 2000. p. 1-12.

- Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am* 1993; 77:1205-17.
- Beckers B, Lang HR, Schimke D, Lammers A. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4:556-61.
- Bergmann JS, Woods GL. Reliability of Mycobacteria Growth Indicator Tube for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3325-7.
- Bergmann JS, Woods GL. Evaluation of the ESP culture system II for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four primary antituberculous drugs. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2940-3.
- Besra GS, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. American Society for Microbiology, Washington DC; 1994. p.285- 306.
- Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* 1996; 65:215-65.
- Bloch AB, Cauthen GM, Simone PM, Kelly GD, Dansbury KG, Castro KG. Completion of tuberculosis therapy for patients reported in the United States in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:273-80.
- Borchardt J, Kirsten D, Jorres R, Kroeger C, Magnusen H. Drug-resistant tuberculosis in northern Germany: a retrospective hospital-based study of 1055 patients from 1984 until 1993. *Eur respir J* 1995; 8:1076-83.

- Borgdorff MW. Annual risk of tuberculosis infection - time for an update ?. Bull WHO 2002; 80: 501-2.
 - Bottger EC. Resistance to drugs targeting protein synthesis in Mycobacteria. Trends Microbiol 1994; 2:416.
 - Boulahbal F, Khaled S, Tazir M. The interest of follow-up of resistance of the tubercle bacillus in the evaluation of a programme. Bull Int Union Tuberc Lung Dis 1989; 64:23-5.
 - Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of Mycobacteria. Annu Rev Biochem 1995; 64:29-63.
- * Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Micobacterias. En: Melnick JL, Adelberg EA, editores. Microbiología médica de Jawetz, 16^a ed. El Manual Moderno, México, D.F.; 1999. p.343-50.
- Bustreo F, Pablos-Méndez A, Ravaglione M, Murria J, Trébucq A, Rider H. Directrices para la vigilancia de la farmacorresistencia en la Tuberculosis. OMS/UICTER, editor. Ginebra. WHO/TB/96.216. 1997. p.5-25.
 - Cabrera A. Microensayo Azul Alamar. Una alternativa para la detección rápida de resistencia a antimicrobianos en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis para optar por el título de Licenciado en Microbiología. Ciudad de La Habana, IPK, 1999. 43 pp.
 - Caminero JA. Resistencia primaria a fármacos antituberculosos. Med Clin (Bare) 1989; 93:30-6.
 - Caminero JA. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. Arch Bronconeumol 2001; 37:35-42.
 - Canetti G, Rist N, Grosset JM. Measure de la sensibilité du bacille aux drogues antibacillaire pour la methode des proportions, methodologie, entere du résistance, results, interpretation. Tuberc Pneumol 1963; 27:217-72.

- Canetti G, Fox W, Khomenko Al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. Bull World Health Organ 1969; 41:21-43.
- Caraballoso M, Sitot A, Ramírez J, Martínez L, González E. Estudio de los pacientes admitidos en el Hospital Antituberculoso de La Habana en el año 1969; Rev. Cubana Med. 1972; 11:341-9.
- Caraballoso M, González E, Pedraza RO, Pentón E, Frias E. Reporte preliminar del tratamiento ambulatorio controlado con drogas de segunda línea en los policlínicos de la provincia de la Habana. Bol. Hig. 1973; 11:149-52.
- Center for Disease Control. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV - infected persons - Florida and New York, 1988- 1991. MMWR 1991; 40:585-91.
- Chaisson RE, Coberly JS, De Cook KM. DOTS and drug resistance: a silver lining to a darkening cloud. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3:1-3.
- Chaulet P, Boulahbal F, Grosset J. Surveillance of drug resistance for tuberculosis control: why and how ?. Tuberc Lung Dis 1995; 76:487-92.
- Chaulk CP, Moore-Rice K, Rizzo R, Chaisson RE. Eleven years of community- based directly observed therapy for tuberculosis. JAMA 1995; 274:945-51.
- Chopra I, Brennan P. Molecular action of antimicrobial agents. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 78:89-98.
- Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet Infect Dis 2003; 3:13-21.
- Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC. Drug-resistant TB: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. Clin Infect Dis 1997; Suppl 1:S121-S30.

- Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis*-, drug-resistance mechanisms. *Trends Microbiol* 1994; 2:411.
- Coninx R, Pfyffer G, Mathieu C. Multidrug resistant tuberculosis in Azerbaijan. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1:Suppl 1:S43.
- Crofton J, Home N, Miller F. *Clinical Tuberculosis*, The MacMillan Press Ltd, London, 1992. p. 153-201.
- Crofton J, Chaulet P, Maher D. Directrices para el tratamiento de la tuberculosis farmacorresistente. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1997. WHO/TB/96.210 (Rev. 1)S. p.5-8.
- Cullinam T. Multidrug-resistant TB - unexamined costs and complexities. *Bull WHO* 2002; 80: 496-7.
- Daniel TM. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:395-400.
- De Cock KM, Chaisson RE. Will DOTS do it ? A reappraisal of tuberculosis control in countries with high rates of HIV infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:457-65.
- De Logu A, Uda P, Pellerano ML, Pusceddu MC, Said B, Schiro ML. Comparisson of two rapid colorimetric methods for detemining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, isoniazid and streptomycin in liquid medium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:33-9.
- De Logu A, Pellerano ML, Sanna A, Pusceddu MC, Uda P, Saddi B. Comparison of the susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by the XTT colorimetric method and the NCCLS standards method. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21:244-50.

- Delgadillo PR, Palomino JC, Luna HJ, RELACTB. Evaluación multicéntrica de la determinación de la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a antimicrobianos de primera línea por el micrométodo colorimétrico Alamar Azul. Enf Infec y Microbiol 2001; 21 :S65.
- Deretic V, Philipp W, Dhandayuthapani S. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity for isoniazid. Mol Microbiol 1995; 17:889.
- Devallous A, Goh K.S, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997; 35:2969-73.
- Draper P. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. Res Microbiol 1991; 42:420-2.
- Drobniowski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, a molecular story. J Med Microbiol 1998; 47:189-96.
- Drobniowski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. Lancet Infect Dis 2003; 3:141-7.
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement: global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. JAMA 1999; 282:677-86.
- Dye C, Espinal MA. Will tuberculosis become resistant to all antibiotics? Proc R Soc Lond 2001;268:45-52.
- Dye C, Watt CJ, Bleed D. Low access to a highly effective therapy: a challenge for international tuberculosis control. Bull WHO 2002; 80: 437-44.

- Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Dordillo EM, *et al.* An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326:1514- 21.
- Enarson DA, Rieder HL, Amadottir T, Trébucq A. Management of Tuberculosis. A guide for low- income countries. IUATLD editor, 5th ed., Pans, 2000. p.3-45.
- Espinal MA, Dye C, Raviglione M, Kochi A. Rational "DOTS plus" for the control of MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:561-3.
- Espinal MA. Epidemiology of multidrug - resistant tuberculosis in low - and middle - income countries. En: Bastian I, Portaels F, editores. *Multidrug- resistant tuberculosis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London; 2000. p.35-48.
- Espinal MA, Jae Kim S, Suarez PG, Man Kam K, Khomenko AG, Miglion GB *et al.* Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis. Treatment outcomes in 6 countries. *JAMA* 2000; 283:2537-45.
- Espinal MA, Zaleski R. TB control and access to second-line drugs: better model needed. *Bull WHO* 2002; 80: 495-6.
- Fabry W, Schmid EN, Ansorg R. Comparison of the E Test and proportion dilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Zbl Bakt* 1995; 282:394- 401.
- Farga V, Valenzuela P, Valenzuela MT, Yáñez A, García P, Scheel G. Una década de quimioterapia antituberculosa abreviada en Chile. *Rev Chil Ent Respir* 1991;7:94-106.

- Foonglada S, Roengsunthia D, Arjratankool W, Chuschottawom C, Chaisprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:1118-22.
- Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernández A, *et al.* Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue Assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36:362-6.
- Freire M, Roscigno G. Joining forces to develop weapons against TB: together we must. *Bull WHO* 2002; 80: 429.
- Frieden TR, Sterling T, Pablos-Méndez A. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993; 328:521-6.
- Frieden TR, Fujiwara PI, Washko RM, Hamburg MA. Tuberculosis in New York City turning the tide. *N Engl J Med* 1995; 333:229-33.
- Fujiwara PI, Larkin C, Frieden TR. Directly observed therapy in New York City: history, implementation, results, and challenges. *Clin Chest Med* 1997; 18:135-48.
- Gamboa F, Cardona PJ, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Padilla E, *et al.* Evaluation of a commercial probe assay for detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* directly from respiratory and non respiratory clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:189-92.
- Golyshevskaia VI, Korneev AA, Chemosova IN, Selina IG, Kasarova TA, Grishina TD, *et al.* New microbiological techniques in diagnosis of tuberculosis. *Prob Tuberk* 1996; 6:22-5.

- Gómez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta R. Determinations of MICs for *Mycobacterium avium-intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric methods. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1842-6.
- González E, Carabaloso M. Estudio de los enfermos bacilíferos que existían en el regional 10 de Octubre, 30 de abril de 1970. *Bol. Hig Epid*, 1972; 10:53-7.
- González E, Carabaloso M. Massive application of tuberculosis chemotherapeutic programme in Cuba. *Bull. Int. Union Tuberc.* 1974; 49:118- 26.
- González E, Carabaloso M, Sevy J, Báez A.L, Valdivia J.A., Jaime A, *et al.* Resultados del seguimiento de casos de tuberculosis en las zonas de verificación. *Bol Hig Epid* 1974; 12:229-40.
- González E, García M, Armas L. Recuento de las etapas de evolución histórica de la lucha antituberculosa en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1993; 45:49-54.
- González E, Armas L, Alonso A. Tuberculosis in the Republic of Cuba: its possible elimination. *Tuberc Lung Dis* 1994; 75:188-94.
- González E, Armas L, Machín A. The trends by a province of tuberculosis in Cuba: 1979-1993. *Bol Oficina Sanit Panam* 1995;19:369-404.
- Gorden S, Houldsworth S, Duncan K, Roberts IS, Andrew PW. Rapid measurements of antimycobacterial drug activity. *Res Microbiol* 1996; 47:38-45.
- Grange JM. The biology of the genus *Mycobacterium*. *J Appl Bactenol Suppl* 1996;81:1-9.
- Grange J.M. *Mycobacterium*. En: Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF, editores. *Medical Microbiology*. 15th ed. Churchill Livingstone. Edinburgh; 1997. p.200-13.

- Haas F. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notions of its contagiousness: En: Rom WN, Garay SM, editores. *Tuberculosis*. Boston: Little, Brown and Co; 1996. p.3-19.
- Hatfull G. The molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Topics Microbiol Immunol* 1996; 215:29.
- Hausdorfer J, Sompek E, Allerberger F, Dierich MP, Rüsch-Gerdes S. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:751-5.
- Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*-. an infection from Jurasic time?. *Lancet* 1984; 2:1015-6.
- Head SR, Parikh K, Rogers Y, Bishai W, Goelet P, Boyce-Jacmo MT. Solid- phase sequence scanning for drug resistance detection in tuberculosis. *Mol Cell Probes* 1999; 13:81-7.
- Heifets L. Rapid automated methods (BACTEC system) in clinical mycobacteriology. *Sem Respir Inf* 1986; 1:242-9.
- Heifets L. Qualitative and quantitative drug-suscepdbility test in mycobacteriology. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:1217-22.
- Heifets L. Drug susceptibility testing in Mycobacteriology. En: Heifets L, editor. *Clinical Micobacteriology*. Clin Lab Med Philadelphia: \VB Sanders, 1996; 16:641-56.
- Heifets LB, Cangelosi CA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* - a neglected problem at the turn of the century. *Int J Tuber Lung Dis* 1999; 3:564-81.

- Heifets L. Conventional Methods for antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bastian I, Portaels F, editores. Multidrug- resistant tuberculosis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London; 2000. p.90-9.
- Heym B, Alzan PM, Honoré N. Missense mutations in the catalase - peroxidase gene, *kat G*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1995; 15:235.
- Hickey MJ, Arain TM, Shawar RM, Humble DJ, Langhorne MH, Morgenroth JN *et al.* Luciferase in vivo expression technology: use of recombinant mycobacterial reporter strains to evaluate antimycobacterial activity in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:400-7.
- Hong YP, Kim SJ, Lew WJ, Lee SH, Lee EK. Cohort analyses of the treatment of smear - positive pulmonary tuberculosis patients under programme conditions in Korea, 1983- 1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:365-71.
- Hopewell PC. Tuberculosis control: how the world has changed since 1990. *Bull WHO* 2002; 80: 427.
- Jabry AA, Wigg MD, Oxford JS.. Initial in vitro screening of drug candidates for their potential antiviral activities. En: Mahy BW, Kangoo HO, editors. *Virology Methods Manual*. San Diego: Academic Press; 1996. p.302-15.
- Jacobs WR, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G *et al.* Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phage. *Science* 1993; 260:819-22.
- Kantor IN. Información sobre resistencia inicial y adquirida a las drogas antituberculosas en América Latina. *Bol Inform COLAB AT* 1994; 10:6-19.
- Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15000 years old?. *J Infect Dis* 1994*; 170:1348-9.

Referencias Bibliográficas

- Kapur V, Li LI, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, *et al.* Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpob*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 1994^b; 32:1095-8.
- Kapur V, Li LI, Hamrick MR, Plikaytis BB, Shinnick TM, Telenti A, *et al.* Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:131-8.
- Kenyon TA, Mwasekaga MJ, Huebner R, Rumisha D, Binkin N, Maganu E. Low levels of drug resistance amidst rapidly increasing tuberculosis and human immunodeficiency virus co-epidemics in Botswana. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 4-11.
- Kim SJ, Hong YP. Drug resistance of *M. tuberculosis* in Korea. *Tuberc Lung Dis* 1992;73:219-24.
- Kim SJ, Bai GH, Hong YP. Drug-resistant tuberculosis in Korea, 1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1:302-8.
- Kim JY, Mitnick CD, Bayona J, Blank R, Nardell EA, Mukherjee JS, *et al.* Examining assumptions about multidrug-resistant TB control. *Bull WHO* 2002; 80: 498.
- Kirk SM, Schell RF, Moore AV, Callister SM, Mazurek GH. Flow citometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid and rifampin in 24 hours. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1568- 73.
- Lambregts-van Weezenbeek CSB. Drug-resistant tuberculosis. *Eur Respir Monogr* 1997, 2:298-326.

- Laszlo A, Rahman M, Raviglione M, Bustreo F. WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1:231-8.
- Laszlo A, Akhtar M, Bretzel G, Boulahbal F, Dawson D, Fattorini L, et al. Technical guide. Sputum examination for Tuberculosis by direct microscopy in low - income countries. IUATLD, editor, 5th ed. Pans, 2000. p. 1-15.
- Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M, and the WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO /IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:748- 56.
- Lee AS, Teo ASM, Wong SY. Novel mutations in *ndk* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2157-9.
- Lee JW, Loevinsohn E; Kumaresan JA. Response to a major disease of poverty: the Global Partnership to Stop TB. *Bull WHO* 2002; 80: 428.
- Maher D, Chaulet P, Spinaci S, Harries A. Tratamiento de la tuberculosis: Directrices para los programas nacionales. Organización Mundial de la Salud, editor, 2^{da} ed. Ginebra. WHO/TB/97.220. 1997. p.9-13.
- Maher D, Mikulencak M. Qué es la estrategia DOTS/TAES ?. Organización Mundial de la Salud, editor. Ginebra, WHO/CDS/CPC/TB/99.270. 1999. p.7- 15.

- Mahmoudi A, Iseman MD. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis: common errors and their association with the acquisition of drug resistance. *JAMA* 1993; 270:65-8.
- March P. La transmisión de la resistencia al *M. tuberculosis* en los infectados por el VIH. La llamada tercera epidemia del VIH. *Med Clin (Barc)* 1994; 102:98-100.
- Marrero A, Carreras L. El programa de control de la tuberculosis en Cuba. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1996; 12:381-5.
- Marrero A, Caminero JA, Rodriguez R, Billo NE. Towards elimination of tuberculosis in a low income country: the experience of Cuba, 1962-1997. *Thorax* 2000; 55:39-45.
- Martin LD, Rothschild BM. Earth history and the evolution of sickness. En: Greenblatt C, editor, *Digging for pathogens: ancient emerging diseases: their evolutionary, anthropological and archeological context*. Jerusalem: Balaban Publishers, 1998. p. 15-46.
- Me Nerney R. TB: the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:179-84.
- Mejia GI, Castellon L, Trujillo H, Robledo JA. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:138-42.
- Menéndez M, González E, Rodríguez R. Análisis de la tendencia de las modificaciones por tuberculosis en Cuba. Influencia del Programa de Control. *Rev Cubana Hig Epidem* 1981; 19:211-21.
- Migliori GB, Ambrosetti M, Fattorini L, Penati V, Vaccarino P, Besozzi G, *et al.* Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance: results of the 1998/1999 proficiency testing in Italy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:940-6.

- MINSAP. Dirección Nacional de Estadísticas. Cuadro epidemiológico nacional. La Habana, Cuba, 2002.
- Mitchison DA. Drug resistance in mycobacteria. Br Med J 1984; 40: 84-90.
- Mitchison DA, Nunn AJ. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1986; 133:423-30.
- Montoro E, Echemendía M, Jiménez C, Ferrá C, Valdivia J.A. Estudio de la resistencia a 7 drogas antibacilares de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba. Bol Inform COLAB AT 1992; 8:7-10.
- Montoro E, Díaz R, Echemendía M, Valdivia JA. Aplicación del enzimoinmunoensayo para el diagnóstico de la tuberculosis. Bol Soc Venezolana Microbiol 1994^a; 14:29.
- Montoro E, Díaz R, Vazquez S, Laferté J, Suarez R, Valdivia JA. Evaluación de un ELISA para el diagnóstico serológico de tuberculosis. Rev Cubana Med Trop 1994^b; 46:90-3.
- Montoro E, Díaz R, Echemendía M, Valdivia JA. Evaluation of Enzyme- Linked Immunosorbent assay for the serodiagnosis in patients with AIDS in Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91:191.
- Moore AV, KirK SM, Callister SM, Mazurek GH, Schell RF. Safe determination of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antimycobacterial agents by flow cytometric. J Clin Microbiol 1999; 37:479-83.
- Morcillo N, Alito A, Romano MI. Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires: DNA fingerprinting analysis of isolates. Medicina (B Aires) 1996; 56:45-7.

- Morcillo N, Scipioni S, Vignoles M, Trovero A. Rapid diagnosis and susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics using MGIT system. Rev /Argentina Microbiol 1998; 30:155-62.
- Morcillo N, Cordero G, Davenport S, Givlio BD, Dolmann A. In vitro activity of several drugs against *Mycobacterium tuberculosis* using an economical and rapid microplate colorimetric method. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5:S150.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferative toxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65:55-63.
- Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miomer H. Use of 3(4,5-dimethyl thiazol -2 - yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin- resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998; 36:1214-9.
- Murray C, Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. Bull Int Union Tuberc Lung Dis 1990; 65:6-24.
- Nacheega JB, Chaisson RE. Tuberculosis drug resistance: a global threat. Clin Infect Dis 2003; 36:S24-30.
- Nair J, Rouse DA, Bai GH. The *rps L* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 1993; 10:512.
- Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 1994; 264:382.
- Nilsson LE, Hoffner SE, Ansehn S. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATI⁵. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:1208-12.
- Organización Panamericana de la Salud. El control de la tuberculosis en las Américas: Perfil de los países 2000. OPS. Washington D.C., 2000. p.1-17.

- Pablos-Méndez A, Gowda DK, Frieden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. *Bull WHO* 2002; 80:489-94.
- Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:380-3.
- Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (*MGIT*) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:344-8.
- Palomino JC. Novel rapid antimicrobial susceptibility tests for *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bastian I and Portaels F, editores, *Multidrug-resistant tuberculosis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London, 2000. p.101-12.
- Palomino JC, Portaels F. Microcolony detection for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:91.
- Parsons LM, Driscoll JR, Taber HW, Salfinger M. Drug resistance in Tuberculosis. *Antimicrob Resist* 1997; 11:905-28.
- Perkins MD, Kritski AL. Diagnostic testing in the control of Tuberculosis. *Bull WHO* 2002; 80: 512-3.
- Pretorius GS, Sirgel FA, Schaaf HS, van Helden PD, Victor TC. Rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* rapid detection and implications in chemotherapy. *S Afr Med J* 1996; 86:50-5.
- Rastogi N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug resistance. *Res Microbiol* 1991; 142:464-76.

- Rastogi N, David HL. Mode of action of antituberculosis drugs and mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1993; 144:133-44.
- Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2001; 20:21-54.
- Ravaglione MC, Sudre P, Rieder HL, Spinaci S, Kochi A. Secular trends of tuberculosis in western Europe. *Bull World Health Organ* 1993; 71:297-306.
- Ravaglione MC, Rieder HL, Styblo K, Khomenko AG, Esteves K, Kochi A. Tuberculosis trends in eastern Europe and the former USSR. *Tuberc Lung Dis* 1994; 75:400-16.
- Ravaglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273:220-6.
- Ravaglione MC, Harries AD, Msiska R, Wilkinson D, Nunn P. Tuberculosis and HIV: currents status in Africa. *AIDS* 1997; 11: Suppl B:S115-23.
- Rieder HL, Martin T, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim SJ, *et al*. The public health service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network. Minimum requirements, role and operation in a low - income country. *IUATLD*, editor, Paris; 1998. p.22-57.
- Rigouts L, Portaels F. The contribution of laboratory testing in the control of TB. *Clin Lab Int* 2001; 25:6-8.
- Rivera AB, Tupasi TE, Grimaldo ER, Cardano RC, Co VM. Rapid and improved recovery rate of *Mycobacterium tuberculosis* in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Lówestein Jensen medium. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1:454-9.

- Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. *Mycobacterium*. En: Balows A, Hansler WJ, Hersmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. editores. *Manual of clinical Microbiology* 5th ed. American Society for Microbiology, Washington DC; 1991. p.304-39.
- Rodríguez C. Estudio de la resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en pacientes del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico de La Habana. Tesis para optar por el Grado Científico de Master en Bacteriología-Micología. IPK, Ciudad de La Habana. 1995. pp.29.
- Ross BR, van Cleff MR, Githui WA. Cost-effectiveness of the polymerase chain reaction versus smear examination for the diagnosis of tuberculosis in Kenya: a theoretical model. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:235-41.
- Rossau R, Traore H, de Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk, *et al*. Evaluation of the *INNO-UPA RifTB* assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2093-8.
- Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Kahila Bar-Gal G, Greenblatt C, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis complex* DNA from an extinct bison dated 17 000 years before the present. *Clin Infect Dis* 2001; 33:305-11.
- Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, Dalessandro M, Chichero P, Gori A, *et al*. Detection of rifampin resistance by single strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2802-6.
- Schluger NW. Changing approaches to the diagnosis of Tuberculosis. *Am Respir Crit Care Med* 2001; 164:2020-4.

- Shawar RM, Humble DJ, Van Dalsen JM, Stover CK, Hickey MJ, Steele S, *et al.* Rapid screening of natural products for antimycobacterial activity by using luciferase - expressing strains of *Mycobacterium bovis BCG* and *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 570- 4.
- Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001;2:164-8.
- Suarez PG. First requirement for control of multidrug-resistant TB: realism. *Bull WHO* 2002; 80: 496.
- Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO, *et al.* When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the new world?. An important questions with public health implications. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1267-8.
- Styblo K, Dankova D, Drapela J. Epidemiological and clinical study of tuberculosis in the district of Kolin, Czechoslovakia: report for the first 4 years of the study (1961-64). *Bull World Health Organ* 1967; 37:819-74.
- Su WJ. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35:209-14.
- Suffys P, Palomino JC, Leao SC, Espitia C, Cataldi A, Romano MI, *et al.* Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *IntJ Tuberc Lung Dis* 2000; 4:179-83.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi FI. Detection of rifampin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993^a; 341:647.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993^b; 31:175-8.

- Thomsen VO, Bauer J, Lilleback T, Glisman S. Results from 8 years of susceptibility testing of clinical *M. tuberculosis* isolates in Denmark. *Eur Respir J* 2000; 16:203-8.
- Trébucq A, Anagonou S, Gninafon M, Lambregts K, Bouhnabal E. Prevalence of primary and acquired resistance of *M. tuberculosis* to antituberculosis drugs in Benin after 12 years of short-course chemotherapy. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:466-70.
- Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM *et al.* *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high - density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999; 37:49-55.
- Valdivia J.A., Suarez R. Incidencia y prevalencia de cepas drogorresistentes en el Hospital antituberculoso "Julio Trigo" de La Habana. *Bol Hig Epid* 1968; 6:247-51.
- Valdivia J.A, Jiménez C, Rodriguez R, Mederos L, Echemendía M, Valdes L, *et al.* Estudio cooperativo de la resistencia a las drogas antibacilares en cepas de *M. tuberculosis* aisladas en pacientes tuberculosos. (Informe preliminar). *Rev Cubana Med Trop* 1982; 34:119-25.
- Valdivia J.A, Jiménez C, Ferrá C, Mederos L, Echemendía M, Mazon D. El Laboratorio Nacional de Referencia de Mycobacteria y Tuberculosis dentro de la lucha antituberculosis en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1988; 40:51-66.
- Virtanen S. A study of nitrate reduction by Mycobacteria. *Acta Tuberc Scand* 1960; 48:78-82.

- Vistica DT, Skenhan P, Scudeiro D, Monks A, Pitman A, Boyd MP. Tetrazolium based assays for cellular viability a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research* 1991; 51:2515-20.
- Wanger A, Mills K. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 19:179-81.
- Weis SE, Slocum PC, Blais FX. The effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. *N Engl J Med* 1994; 330:1179-84.
- Welch DF, Guruswamy AP, Slides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJ. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2178-84.
- Weyer K, Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, *et al*. Microscopía. OMS, editor, Ginebra, WHO/TB/98.258; 1998^a. p. 13-31.
- Weyer K, Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, *et al*. Cultivo. OMS, editor, Ginebra, WHO/TB/98.258; 1998^b. p.27-39.
- Williams DL, Waguestack C, Eisenach K. Characterization of rifampin resistance in pathogenic Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2380.
- Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PRJ, *et al*. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin crossresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998^a; 42:1853-7.

- Williams DL, Spring L, Gillis TP, Salinger M, Persing DH. Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *Clin Infect Dis* 1998^b; 26:446-50.
- Wilson SM, al-Suwaidi Z, McNemey R, Porter J, Drobniowski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 1997; 3:465-8.
- Wilson TM, Collins DM: *app C*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Microbiol* 1996; 19:1025.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2000. World Health Organization, editor, Geneva, WHO/CDS/TB/2000.275; 2000. p.87-102.
- World Health Organization. Global DOTS expansion plan. Progress in Tb control in high-burden countries. World Health Organization, editor, Geneva, WHO/CDS/STB/2001.11; 2001^a. p.35-39.
- World Health Organization. Stop TB Annual Report 2000. Forging new partnerships to stop '1TB. World Health Organization, editor, Geneva, WHO/CDS/STB/2001.12; 2001^b. p.3-11.
- Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Babst A, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2324-7.
- Yew WW, Chau CH. Drug resistant tuberculosis in the 1990s. *Eur Respir J* 1995; 8:1184-92.
- Zhang Y, Young DB. Molecular mechanisms of isoniazid a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol* 1993; 1:109.

VII 1.2 bibliografía del autor relacionadas con la tesis

- World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Global Project and Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 1994-1997. 1997. Antituberculosis drug resistance in the world. WHO/TB/97.229. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Montoro E, Valdivia JA, Leao SC. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110 restriction fragment lenght polymorphism analysis and by the double repetitive element PCR method. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3099-3102.
- Rodríguez C, Suarez R, Herrera H, Montoro E. Estudio de la resistencia a las drogas en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico de La Habana. *Rev. Enferm Infec Microbiol* 1998; 18:227-31.
- Pablos-Méndez A, Ravaglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, Cohn DL, Lambregts-van Weezenbeek CSB, Kim SJ, Chaulet P, Nunn P, for the World Health Organization-International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *N Engl J Med* 1998; 338:1641-49.
- Montoro E, López M, Echemendía M, Valdivia JA. Utilización de la prueba de la pirazinamida para la determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Cubana Med Trop* 1999; 51:53-4.

- **Montoro E**, Echemendía M, D. Lemus, J. A. Valdivia. Estudio de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba 1997-98. Avances en Biotecnología Moderna. Libro de Reportes Cortos. 1999; 5:10.
- Marrero A, Carreras L, Valdivia JA. **Montoro E**, González E, Torres R, *et al* Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos, ed. Ciencias Médicas, La Habana, 1999.
- **Montoro E**. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba y en las Américas. Rev Latinoam Microbiol 2000; 42:117.
- World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Global Project and Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world. Report No. 2 Prevalence and trends WHO/CDS/TB/2000.278. World Health Organization, Geneva, Switzerland..
- Llop A, Tamargo I, Pérez M, Toraño G, Ramírez M, Bravo L, Sosa J, Llanes R, **Montoro E**, Bravo J, Borges M. Antimicrobial Resistance and Microbiological Surveillance. Section I. Surveillance of Bacterial Resistance to antimicrobial agents en: Salvatierra-González R and Benguigui Y, Editores, Antimicrobial Resistance in the Americas: Magnitude and Containment of the Problem, PAHO/HCP/HCT/163/2000. Washington, DC, USA 2000.
- **Montoro E**, Grande E. Diagnóstico de Tuberculosis pulmonar en pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Rev Panam Infect 2000; 4:120-7.

- Montoro E, Suárez O, Valdivia J.A. Micobacterias. Capítulo 36 en: Llop, Valdés-Dapena, Suazo, Editores, Microbiología y Parasitología Médica, Ciencias Médicas, La Habana 2001, p.363-85.
- Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbar F, Kin SJ, World Health Organization-International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Antituberculous Drugs Resistance Surveillance. Global trends in resistance to N Engl J Med 2001; 344:1294-1303.
- Montoro E, Echemendía M, Lemus D, Valdivia JA. Contribución del Laboratorio Nacional de Referencia en la vigilancia y control de la resistencia de *M. tuberculosis*. Hallazgos de baja circulación de cepas Multidrogorresistentes en Cuba. Rev Latinoam Microbiol 2002; 44:448.
- Lemus D, Montoro E, Johansson J, Echemendía M, Ridell M. Determinación rápida de resistencia en *M. tuberculosis* utilizando el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5 difenil bromuro de tetrazolio (MTT). Rev Latinoam Microbiol 2002; 44:449.
- Montoro E. Comportamiento de la resistencia a las drogas antituberculosas en Cuba. Rev. Latinoam Microbiol 2002; 44(4).
- Lemus D, Johansson J, Montoro E, Echemendía M, Ridell M. Aplicación del Microensayo MTT para la detección rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Latinoam Microbiol 2002; 44(4).
- Echemendía M, Lemus D, Valdivia J.A, Montoro E. Estudio de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK. Rev Latinoam Microbiol 2002; 44(4).

- Nicolau E, Lemus D, Echemendía M, **Montoro E**. Determinación rápida de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* empleando la técnica de la Nitratasa. Rev Latinoam Microbiol 2002; 44(4).

VIII.3 bibliografía del autor no relacionadas con la tesis

- Ferrá C, **Montoro E**, Díaz R, Jimenez C, Valdivia JA. *Mycobacterium fortuitum*. Determinación de la susceptibilidad mediante la técnica de difusión en disco. Rev Cubana Med Trop 1992; 44:17-20.
- Ferrá C, Ramírez M, **Montoro E**, Jimenez C. Estudio de la sensibilidad de *M. fortuitum* por el método de microdilución en caldo determinando CMI. Rev Cubana Med Trop 1992; 44:109-11.
- Montoro E, Echemendía M, Valdivia JA. Estudio de la resistencia a 7 drogas antibacilares de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Cuba. Bol COLAB AT 1992; 8:7-13.
- Ferrá C, **Montoro E**, Gutierrez AM. Estudio de Micobacterias No Tuberculosas aisladas en Cuba durante el período 1985-1989. Rev Cubana Med Trop 1992; 44:205-7.
- Montoro E, Díaz R, Crespo F, Ferrá C, Valdivia JA. Diagnóstico serológico de "tuberculosis pulmonar por la técnica de CIE. Rev. Acta Cientif SVBE 1994; 3:25-7.
- Montoro E, Díaz R, Vazquez S, Laferté J, Suarez R, Valdivia JA. Evaluación de un ELISA para el diagnóstico serológico de tuberculosis. Rev Cubana Med Trop 1994;46:90-3.

- Díaz R, Montoro E, Maestre JL, Echemendía M, Valdivia JA. Polymerase Chain Reaction for the detection of *M. tuberculosis* complex. Rev Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89:211-2.
- Llop A, Rico O, Rodríguez ME, Capó V, Ruiz A, Montoro E. Ulcera de Buruli en el Distrito Amansie-West, región Ashanti, Ghana. Rev Cubana Med Trop 1994; 46:120-6.
- Montoro E, Díaz R, Echemendía M, Valdivia JA. Aplicación del enzimoinmunoensayo para el diagnóstico de la tuberculosis. Bol SVM 1994; 14:29.
- Díaz R, Montoro E, Echemendía M, Morales J, Valdivia JA. Detección de plásmidos en cepas de *M. fortuitum*. Bol SVM 1994; 14:24.
- Díaz R, Montoro E, Díaz C, Echemendía M, Valdivia JA. Purificación y análisis de restricción de DNA en micobacterias. Avances Biotecnología Moderna. Libro de Reportes Cortos 1994;2.
- Montoro E, Echemendía M, Díaz R, Roque H, Valdivia JA. Identificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando tiras de papel para la técnica de niacina. Rev Cubana Med Trop 1995; 47:135-6.
- Díaz R, Montoro E, González R, Echemendía M, Valdivia JA. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during an outbreak of HIV-infected patients by DNA finger printing. j\mJ Trop Med Hyg 1995; 53:155.
- Montoro E, Díaz R, Echemendía M, Valdivia JA. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis in patients with AIDS in Cuba. Rev Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91:191.

- Llop A, Montoro **E**, Rodríguez ME, Capó V, Ruiz R. Estudio de úlcera de Buruli en Ghana. Experiencia cubana. Rev Enferm Infec Microbiol 1996; 16:211-4.
- Montoro **E**, Capó V, Rodríguez ME, Ruiz A, Llop A. Buruli Ulcer in Ghana. Rev Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92:31-2.
- Rodríguez ME, Montoro **E**, Capó V, Ruiz A, Llop A. *Mycobacterium ulcerans*. Presentación de un caso. Rev Leprología-Fontilles 1997; XXI:83-8.
- Díaz R, Gómez R, Montoro **E**, Cabanas M, Marrero M, Echemendía M *et al*. Contribución al control de la Tuberculosis en Cuba. BolIPK 1998; 8:334-5.
- Llop A, Tamargo I, Pérez M, Toraño G, Ramírez M, Bravo L, Sosa J, Llanes R, Montoro **E**, Bravo J, Borges M. Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia epidemiológica en Cuba. Rev Panam Infect 1999; 3:S33-40.
- Montoro **E**, Fuentes M, Rodríguez C. Aplicación del antígeno recombinante de 38 KDa de *Mycobacterium tuberculosis* para la detección de anticuerpos IgG. Avances Biotecnología Moderna. Libro de Reportes Cortos 1999; 5:7.
- Montoro **E**, Blanco F, Pinto M, Echemendía M, Valdivia JA. Estudio Molecular de *Mycobacterium tuberculosis* por el método PCR con Doble Elemento Repetitivo. Avances Biotecnología Moderna. Libro de Reportes Cortos 1999; 5:7.
- Montoro **E**. Avances en el estudio de *Mycobacterium habana*. Rev Latinoam Microbiol 2000; 42:122.
- Díaz R, Gómez R, Marrero A, Montoro **E**, Valdivia JA. Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando la secuencia de inserción IS6110. Rev Latinoam Microbiol 2000; 42:470.

- Mederos L, Montoro E, Lemus D, Echemendía M. Aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes seropositivos al VIH. Rev Latinoam Microbiol 2000; 42:377.
- Montoro E. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba y en las Américas. Rev Latinoam Microbiol 2000; 42:117.
- Montoro E, Cardoso S, Estrada I, González J. Identificación rápida de micobacterias mediante la técnica de PCR y análisis con enzimas de restricción (PRA). Rev Latinoam Microbiol 2000; 42:593.
- Montoro E, Echemendía M, Valdivia JA. Caracterización de la región de promotores del RNA ribosomal en cepas de *Mycobacterium habana* y *Mycobacterium simiae*. Rev Cubana Quím 2001; 13:102.
- Delgadillo PR, Palomino JC, Luna HJ, RELACTB (Montoro E). Evaluación multicéntrica de la determinación de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a antimicobacterianos de primera linea por el micrométodo colorimétrico del alamar azul. Enferm Infec Microbiol 2001; 21:65.
- Salas LP, Rivera S, León L, Montoro E, González J. Caracterización parcial de los promotores del rRNA de diferentes aislados clínicos del género *Mycobacterium*. Enferm Infec Microbiol 2001; 21:104.
- Mederos LM, Poidevín L, Echemendía M, Lemus D, Montoro E. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis en pacientes seropositivos al VIH durante el período 1998-99. Rev Argent Hosp Nac Baldomero Sommer 2001; 3:80-6.

- Montoro E, Sotolongo A, Maestre J.L. Utilización de la técnica de PCR y análisis con enzimas de restricción (PRA) para la identificación de Micobacterias. Rev Latinoam Microbiol 2002; 44:271.
- Montoro E, Rivera S, González J. Diferencias a nivel genético entre *Mycobacterium habana* y *Mycobacterium simiae*. Rev Latinoam Microbiol 2002; 44:233.
- Díaz R, González R, Rumbaut R, Joanes J, González Ochoa E, Díaz-Jidy M, van Soolingen D, Montoro E, Mederos L, Ferrá C, J. Pérez, Valdivia JA. An outbreak of tuberculosis among HIV-infected patients in Havana, Cuba: a retrospective molecular epidemiology study. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6:155.
- Mederos L, Rodriguez F, Blanco F, Lemus D, Echemendía M, Montoro E. Reporte de *Mycobacterium avium-intracellulare* asociado a micobacteriosis renal. Rev Cubana Med Trop 2003; 55:58-60.

VIII.4 presentación en eventos científicos

Los resultados que se exponen en esta tesis, han sido presentados en los siguientes eventos:

X FORUM Nacional de Ciencia y Técnica. Ciudad de La Habana, Diciembre/1995.

- Diagnóstico y caracterización micro biológica, clínica y epidemiológica de la primera epidemia de Tuberculosis en pacientes seropositivos al VIH en Cuba. Mención Especial.
Presentación oral.

XXVI Congreso Paraguayo de la Unión Latinoamericana de Sociedades de Tisiología y Enfermedades Respiratorias ULASTER. VII Conferencia Regional Latinoamericana de UICTER/IUATLD. Asunción, Paraguay, Octubre/1996.

- Estudio longitudinal de la resistencia a las drogas antibacilares de *M. tuberculosis* en Cuba. Presentación en cartel.

IV Congreso Nacional de Higiene y Epidemiología. I Congreso Nacional de Infectología. Ciudad de La Habana, Noviembre/1996.

- Vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis* en Cuba. Presentación en cartel.

V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. Congreso 60 Aniversario del IPK. IPK, Ciudad de La Habana, Marzo/1997.

- Importancia de la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis* en Cuba. Presentación oral.
- Estudio de la resistencia de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en pacientes del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico. Presentación oral.

XIX Congreso Brasileño de Microbiología. Rio de Janeiro, Brasil, Noviembre/1997.

- Mesa Redonda: “Resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas”. Presentación oral

I Simposio Latinoamericano “Tuberculosis* 97” IPK, Ciudad de La Habana, Diciembre/1997.

- Resistencia de *M. tuberculosis* en Cuba. Presentación oral.

Simposio “Investigaciones de contactos y eliminación de la TB”. IPK, Ciudad de La Habana, Abril/1998.

- Mesa Redonda. Cultivos y pruebas de resistencia en la eliminación de la TB. Presentación oral.

XIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. II Congreso de Microbiología del MERCOSUR. II Congreso Paraguayo de Microbiología. Asunción, Paraguay, Noviembre/1998.

- Simposio “Avances en el estudio de la Tuberculosis”. Comportamiento de la vigilancia de la resistencia en Cuba”. Presentación oral.

Simposium “ Evaluación Interna y Externa del Programa de Tuberculosis en Etapa de Eliminación”. IPK, Ciudad de La Habana, Abril 30/1999.

- Evaluación de la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antibacilares. Presentación oral.

V Reunión RELACTB, Salvador de Bahía, Brasil, Octubre 20-23/1999.

- Participación en la sesión MDR-TB. “Drug resistance surveillance in Cuba 1997- 1998”. Presentación oral.

Biotecnología Habana'99. CIGB, Ciudad de La Habana, Diciembre/1999.

- Estudio de la resistencia de *M. tuberculosis* en Cuba 1997-98. Presentación en cartel.

XV Congreso Latinoamericano de Microbiología y XXXI Congreso Nacional de Microbiología. Mérida, México, Abril /2000.

Symposium Resistencia bacteriana: La epidemia silente del nuevo milenio.
Coordinador.

“Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba y Las Américas”. Conferencia

Evento Cubano-Gallego de Salud Pública y Epidemiología. Jomada Iberoamericana de la Federación de Asociaciones de alumnos de salud pública y epidemiología. IPK, Ciudad de La Habana, Junio/2000.

- Resultados de la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis* en Cuba. Conferencia

Reunión territorial Programa TB pulmonar. Provincias orientales. MINSAP/MININT.

Holguín, Mayo/2000.

Vigilancia de la resistencia y control de calidad. Conferencia.

II Taller Nacional de Tuberculosis. Región Occidental. MINSAP-MININT. Matanzas,

Junio/2000.

Control de calidad y comportamiento de la resistencia. Conferencia.

Taller Pre-Congreso: "Resistencia a Antibióticos". CNIC, Ciudad de La Habana, Junio/2000.

Vigilancia de la resistencia del *M. tuberculosis* en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK. Conferencia.

XIII Seminario científico del CNIC, Ciudad de La Habana, Junio/2000

Vigilancia de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* en el Laboratorio

Nacional de Referencia del IPK. Presentación en cartel.

Ier Congreso Internacional de Enfermedades Infecto-Contagiosas Infecciosas 2K. Sto

Domingo, Rep. Dominicana, Julio/2000

- Vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis* en Cuba y las Américas. Conferencia.

Seminario "TB al 2001". Sto. Domingo, Rep. Dominicana. 19-22 Marzo/2001. Profesor

invitado.

- Importancia de la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis* en los PNC. Conferencia.

Reunión Nacional de Vice-directores de Laboratorios Sanitarios. Holguín, Abril/ 2001.

- Pruebas de resistencia y control de calidad en Tuberculosis. Conferencia.

XXXIII Congreso Mexicano de Microbiología. Monterrey, México, Abril/2002.

- Contribución del Laboratorio Nacional de Referencia en la vigilancia y control de la resistencia de *M. tuberculosis*. Hallazgos de baja circulación de cepas MDR en Cuba. Presentación en cartel.
- Determinación rápida de resistencia en *M. tuberculosis* utilizando el 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio (MTT). Presentación en cartel.

Convención Internacional "Salud Pública 2002". Ciudad de La Habana, Mayo/2002.

- Taller Internacional de Tuberculosis: El Laboratorio Nacional de Referencia en el marco del Programa de Control. Conferencia
- Perfeccionamiento de la vigilancia y control de la resistencia de *M. tuberculosis* en Cuba. Presentación en cartel.
- Determinación rápida de resistencia de *M. tuberculosis* por el método colonmétnc MTT. Presentación en cartel.

Reunión anual del Proyecto de Acción Concertada. Unión Europea. Amberes, Bélgica, Julio/2002.

- Rapid drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* with MTT colonmetnc and Nitrate reductase assays. Presentación oral.

X Congreso de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS). París, Francia, Julio/2002.

- Rapid and simple MTT colorimetric method for determining resistance of *M. tuberculosis* to anti tuberculous drugs. Presentación en cartel.

Curso Avanzado en Inmunología "El sistema inmune en la protección y susceptibilidad a Tuberculosis". Escuela Superior de Inmunología "Ruggero Ceppellini", Nápoles, Italia, Septiembre/2002.

Rapid and simple MTT colorimetric method for determining resistance of *M. tuberculosis* to anti tuberculous drugs. Presentación en cartel.

XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM). VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical. IPK, Ciudad de La Habana, Noviembre/2002.

- Contribución del Laboratorio Nacional de Referencia en la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*. Hallazgos de baja circulación de cepas multidrogorresistentes en Cuba. Presentación oral.
- Determinación rápida de resistencia en *M. tuberculosis* utilizando el 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolium (MTT). Presentación oral.
- Comportamiento de la resistencia a las drogas antituberculosas en Cuba. Presentación en poster.
- Determinación rápida de resistencia en *M. tuberculosis* empleando la técnica de la Nitratasa. Presentación en poster.

IX Jomada Científica de los Laboratorios de Referencia Internacional "Carpermor", México DF, Diciembre/2002.

- Actualización en métodos diagnósticos de *M. tuberculosis*.



Capítulo IX. Anexos

Anexos

Anexo 1

IPK

LAB. NAC. DE REFERENCIA E INVESTIGACIONES EN TUBERCULOSIS Y MYCOBACTERIA.

Cuestionario para el envío de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* para estudio de resistencia

1. Nombre (s) y apellidos 2. Sexo 3. Edad 4. Nacionalidad

5. Raza 6. Unidad de salud

7. Municipio y provincia

8. Material examinado

9. Examen directo:

Fecha más reciente:
Codificación:

10. Examen por cultivo:

Fecha:
Codificación:

11. Ha sido tratado anteriormente

con drogas antituberculosas?
Sí No Fecha/s
Cúales P

12. Fecha del diagnóstico

13. Fecha de inicio del tratamiento

14. Se realizó prueba HIV

Si No

Fecha de prueba:
Resultado:

Positivo Negativo

Observaciones:

Sobre la pregunta No. 11 este dato es fundamental. Debe ser de veracidad confiable para la definición de resistencia primaria, por lo cual, el interrogatorio debe ser exhaustivo, cuando se reporte un caso como virgen de tratamiento. Si después de la prueba la cepa resulta resistente el dato se confirmará con un nuevo interrogatorio.

Otros datos que considere importante.

Firma y Nombre del funcionario encuestador:.

Anexos

Anexo 2 Elaboración del medio de cultivo Lówenstein-Jensen Modificado (UIT).

En un erlenmeyer de 2000 mL se preparó la solución salina la cual se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Reactivos	Cantidad
Fosfato monopotásico	2,4 g
Sulfato de Magnesio	0,24 g
Citrato de magnesio	0,6 g
Asparagina	3,6 g
Glicenna bidestilada	12 mL
Verde malaquita	0,4 g
Agua destilada	600 mL

En otro erlenmeyer, se cascaron asépticamente los huevos, se homogenizaron y se filtraron a través de un dispensador estéril, hasta obtener un volumen de 1000 mL. Posteriormente se mezclaron los 600 mL de la solución salina con los 1000 mL de huevos homogenizados y se ajustó el pH entre 6,8 y 7,2. Seguidamente se depositaron 300 mL de medio en 4 erlenmeyers para adicionar los volúmenes de cada antimicrobiano para alcanzar la concentración crítica correspondiente a cada uno de ellos, el resto del medio se utilizó para la preparación de los tubos controles.