

**Trabajo Científico**

# **Asociación entre la evolución clínica de pacientes con tuberculosis y la resistencia al tratamiento de los aislados de *Mycobacterium***

## **Association between the clinical course of patients with tuberculosis and the treatment resistance of isolates of *Mycobacterium***

José de Jesús Alba R.<sup>1,2</sup>, José Luis Ortega S.,<sup>5</sup> Perla Karina Espino S.,<sup>6</sup> Julieta Luna H.,<sup>3</sup> Blanca Estela García P.,<sup>3</sup> Norma Urtiz E.,<sup>4</sup> Maribel Cervantes F.,<sup>4</sup> Estela Ruíz B.,<sup>4</sup> José Ramón Hernández S.,<sup>5</sup> Pablo Ruíz F.,<sup>6</sup> Aurora Martínez R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango

<sup>2</sup>Laboratorio de Asesores Especializados de la Laguna

<sup>3</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Durango

<sup>5</sup>Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo

<sup>6</sup>Centro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Coahuila

---

### **Resumen**

La tuberculosis ha incrementado por el surgimiento de cepas multidrogorresistentes (MDR). Se asoció la evolución clínica de pacientes con tuberculosis y resistencia al tratamiento. Se obtuvieron 268 muestras, la resistencia a fármacos se determinó por Alamar azul; 41.04% correspondieron a cepas sensibles a todos los fármacos; 17.91% MDR. La resistencia fue: isoniazida 28%, rifampicina 52%, estreptomicina 24% y etambutol 27%. De 268 pacientes, 197 eran vírgenes a tratamiento, de los cuales 44% presentaron resistencia primaria, pero de estos, solo 5% MDR. 71 pacientes (26.49%) con tratamiento previo presentaron resistencia secundaria, de los cuales 14.55% fueron MDR. Al final del seguimiento, 72% sanó, 21% permaneció enfermo y 7% falleció. Los pacientes con mejor pronóstico fueron con cepas sensibles, seguidos de pacientes con resistencia primaria y los de mal pronóstico fueron MDR.

---

### **Abstract**

The tuberculosis has increased by the emergence of multidrug-resistant strain (MDR). Was associated clinical course of patients with tuberculosis and treatment resistance. 268 samples were obtained, the resistance to drugs was determined for blue Alamar; 41.04% corresponded to strain sensitive to all the drugs; 17.91% MDR. The resistance was: isoniazid 28%, rifampin 52%, streptomycin 24%, and ethambutol 27%. Of 268 patients, 197 were virgins to treatment, of which 44% presented primary resistance, but of these, only 5% MDR. 71 patients (26.49%) with previous treatment presented secondary resistance, of which 14.55% was MDR. At the end of the follow-up, 72% recovered, 21% remained sick, and 7% died. The patients with better forecast were with sensitive strain, followed by patients with primary resistance and those of badly forecast they were MDR.

---

**Palabras clave:** : resistencia, rifampicina, isoniazida.

**Key words:** resistance, rifampin, isoniazid.

---

### **Correspondencia**

Dra en C Aurora Martínez Romero

Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio,  
Universidad Juárez del Estado de Durango

Av. Artículo 123 S/N Col. Filadelfia, CP 35010 AP No. 51

Gómez Palacio, Durango México

Tel. (871) 7 15 88 10

Fax. (871) 7 15 29 64

e-mail: quimicaaurora@hotmail.com

Fecha de recepción: 6 de septiembre de 2011

Fecha de recepción de modificaciones: 25 de noviembre de 2011

Fecha de aceptación: 15 de diciembre de 2011

## Introducción

La tuberculosis (TB) es considerada como un problema de salud, económico y social de gran magnitud.<sup>1</sup> En la actualidad, constituye uno de los problemas más importantes de salud pública en el mundo, a pesar de la disponibilidad de terapia anti-TB desde hace más de 50 años.<sup>2</sup> Según la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993), la TB es una enfermedad infecciosa generalmente crónica causada por las especies del género *Mycobacterium*, principalmente por *M. tuberculosis* en humanos y *M. bovis* en animales. *M. tuberculosis* se transmite del enfermo a un sujeto sano por la inhalación de material infectante mientras que *M. bovis* lo hace a través de la ingestión de leche de vaca contaminada.<sup>3</sup> En las últimas décadas esta enfermedad se ha visto potenciada por el surgimiento de cepas multidrogorresistentes (MDR) de *M. tuberculosis* y por la co-infección con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV).<sup>4,5</sup>

La presencia del HIV incrementa el riesgo de reactivación de la infección de la TB latente y ha aumentado dramáticamente la muerte por TB en años recientes. La MDR se define como la resistencia a por lo menos, isoniazida (INH) y rifampicina (RIF).<sup>2</sup> La TB afecta a millones de personas a nivel mundial, al respecto, la OMS ha declarado que existen 8 millones de nuevos y 2 millones de defunciones anualmente como consecuencia de esta enfermedad.<sup>6,7</sup>

La TB-MDR a la RIF e INH requiere una terapia prolongada y costosa cuyo nivel de curación es bajo. En varios países del Este de Europa con crisis económica y sistemas de salud deficientes, se presentan un número mayor de casos de TB-MDR, de manera similar ocurre en otros países en vías de desarrollo.<sup>8</sup> La OMS y la Unión Internacional Contra la TB y Enfermedades Pulmonares han implementado pruebas muy exactas para determinar la susceptibilidad a los medicamentos antifímicos, lo que ha facilitado la estandarización y control de calidad para las drogas anti-TB.<sup>9</sup>

Una encuesta realizada en América Latina por la OMS y la OPS entre 1986 y 1990, mostró que México presentaba una preocupante frecuencia de resistencia primaria del 19.1%. En contraste, entre 1989 y 1993 el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), evaluó 1811 aislamientos de diversos Estados de la República encontrando una resistencia primaria de 8.3%. Sin embargo, en 1995 Sifuentes y Cols, reportaron una resistencia primaria a INH del 9%, a RIF del 6% y la MDR en el 6% de los casos, así como tasas alarmantes de resistencia secundaria: 44% para INH, 35% para RIF y un 35% de MDR. En 1997, en una

encuesta realizada bajo los lineamientos de la OMS en tres Estados de la República Mexicana, por De la Fuente y Cols, se encontraron niveles de resistencia de 12.8% en casos nuevos y del 50% en casos de TB con tratamiento anterior con uno o más medicamentos de primera línea.<sup>10</sup> El Laboratorio de Salud Pública de Baja California, en un estudio realizado del 1º de enero de 1998 a 31 de abril de 1999 encontró una resistencia por lo menos a un fármaco antituberculoso en el 41% de los pacientes, de los cuales el 17% eran MDR. Así, Laniado-Laborín ha planteado la necesidad de regionalizar los laboratorios de diagnóstico de TB con el fin de facilitar la realización de estudios regionales y optimizar el tiempo de diagnóstico e inicio del tratamiento.<sup>11</sup>

Según la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, en la Comarca Lagunera de Durango y Coahuila en el año 2007 en las Jurisdicciones 2, 6 y 7, se reportaron 338 casos nuevos, treinta de los cuales presentaron falla terapéutica de etiología no especificada, aunque se especula que tal falla pudo haberse debido a la presencia de cepas resistentes.<sup>12</sup> El micrométodo colorímetro Alamar azul (MABA), descrito por Luna Herrera en año 2003 es una prueba eficiente en la determinación de la resistencia de las micobacterias ante los medicamentos anti-TB,<sup>13</sup> por lo que, su uso como una herramienta confiable, rápida, fácil de realizar y económica resulta muy favorable, sobre todo en países de escasos recursos. El MABA permite la reducción en tiempos y costos y aumenta la sensibilidad de la detección de la enfermedad.

La situación actual de la TB incluyendo la aparición de cepas MDR a los antifímicos, ha provocado que se den cambios sustanciales en el diagnóstico de esta enfermedad. Asimismo, dado que la TB es un problema de salud genera la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas para otorgar el tratamiento preciso a cada individuo afectado, por lo que es pertinente realizar el aislamiento, identificación y sobre todo determinar la sensibilidad de las cepas ante los fármacos anti-TB de primera línea, dada la alta incidencia y prevalencia de casos de TB en la región de la Comarca Lagunera, aunado a esto, surge la necesidad de conocer las causas de las fallas terapéuticas en los pacientes con TB, por las implicaciones económicas, sociales y sobre todo epidemiológicas. El conocimiento de las razones de las fallas permitirá disminuir de una manera eficiente el número de casos TB-MDR. La demora en el diagnóstico y tratamiento conlleva mayor deterioro de la salud del paciente e incrementa el riesgo en la comunidad, con lo cual aumenta la morbilidad y transmisión de la infección. Por esa razón, el objetivo del presente trabajo fue establecer con el MABA un diagnóstico rápido a partir de muestras pulmonares con TB, asociando la evolución clínica de pacientes con la resistencia al tratamiento de los aislados de *Mycobacterium*.

## Material y método

### Aislamientos clínicos

Se procesaron 268 muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de TB pulmonar (TBP), canalizados de diferentes hospitales y jurisdicciones de las ciudades de Gómez Palacio Durango y Torreón, Coahuila, México, con la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED) Unidad Gómez Palacio (17/2009), según acuerdos de la declaración de Helsinki.

Para preparar las muestras para cultivo se procedió a desarrollar la descontaminación de las muestras por el método de Petroff (Solución de NaOH al 4%), según la Nota Técnica No. 27 OPS/OMS.<sup>14</sup> Las cepas de referencia ATCC H37Rv 27294 sensible, H37Rv 35837 RIF resistente, H37Rv 35822 INH resistente, H37Rv 35820 estreptomicina (SM) resistente y H37Rv 35837 etambutol (EMB) resistente, fueron facilitadas por el Departamento de Inmunología de la ENCB del IPN.

### Condiciones de crecimiento y preparación de la suspensión bacteriana

Las muestras y las cepas de referencia se sembraron en los medios de cultivo Agar Middlebrook 7H10 (Beckton-Dickinson) y el medio convencional de Löwenstein-Jensen (Becton Dickinson), por duplicado. El caldo Middlebrook 7H9 con enriquecimiento ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa (OADC de Beckton-Dickinson),<sup>15</sup> se utilizó para llevar a fase logarítmica, el cual se llevó a incubación por 8 días ajustando la turbidez del tubo número 1 del Nefelómetro de McFarland (equivalente a 3X10<sup>8</sup> UFC/ml),<sup>16</sup> para el MABA, así como para la dilución previa de los antibióticos, los cuales se diluyeron 1:10 en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de enriquecimiento OADC, esta suspensión se preparó justo antes de la inoculación de la microplaca, para la determinación de sensibilidad a cuatro fármacos (INH, RIF, SM y EMB).

### Ensayo del micrométodo colorimétrico Alamar azul (MABA)

La resistencia a fármacos de los aislados fue determinada por el MABA, el cual utiliza un colorante óxido-reductor como indicador de viabilidad de crecimiento y metabolismo celular, cuya forma oxidada es azul y la reducida es rosa, cuantificándose en unidades relativas de fluorescencia, el cambio de color de detecta visualmente, esta propiedad se utiliza para medir la viabilidad de *M. tuberculosis* luego de la exposición a los medicamentos anti-TB.<sup>17</sup> Se procedió a realizar los experimentos según ha sido descrito por Luna-Herrera y cols.<sup>18</sup>

Las placas se colocaron en bolsa de plástico para evitar la evaporación y se incubaron a 37°C durante 5 días. Posteriormente, se adicionó como revelador el colorante resazurina, de acuerdo a las siguientes indicaciones: 20 µL de resazurina a los pozos de problemas y controles, se incubó nuevamente 24 h y se leyó tomando como punto de corte, para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI), el control 1:100. En el caso de no existir cambio de coloración en el primer control, se dejó incubando de 2 a 3 días más, si existió el cambio se adicionó el colorante a toda la placa.<sup>19</sup>

Los resultados de MABA se obtuvieron después de 8 días de incubación en promedio. La sensibilidad fue establecida determinando la CMI para cada fármaco, de donde se obtuvo el resultado de sensibilidad y resistencia global para cada uno de los antibióticos. La evolución clínica de los pacientes se determinó dando seguimiento durante un año. Cada mes, con las muestras de expectoración se realizó el BAAR, cultivo con Löwenstein-Jensen y Middlebrook, posteriormente, los pacientes se categorizaron como: resistencia secundaria (pacientes con tratamiento previo), resistencia primaria (pacientes sin tratamiento previo) y sensibles (pacientes sin tratamiento previo).

Una vez desarrolladas las cepas se procedió a determinar la resistencia a los fármacos por el MABA, aplicando el tratamiento acortado estrictamente supervisado por el médico tratante. Al realizar el seguimiento a cada paciente, algunos mostraron curación (BAAR negativo) desde el 2º y 3er mes, continuando el monitoreo hasta el 6º mes y así se fueron dando de alta, siguiendo los estudios respectivos con los pacientes que continuaban enfermos (bacilíferos). Una vez concluido el año de seguimiento se realizó el análisis estadístico correspondiente.

### Análisis estadístico

Para determinar la dependencia entre sensibilidad, resistencia y curso de la enfermedad, se realizó un análisis de asociación entre dos variables categóricas con dos posibles resultados, utilizando la prueba de Chi-cuadrada de Pearson.<sup>20</sup> El Programa estadístico utilizado fue SAS versión 9.01 (SAS Introductory guide for personal computers. SAS Institute Inc, US. Cary, NC. 2002).

## Resultados

Del total de la muestra, el 41.04% correspondió a cepas sensibles a todos los fármacos y 17.91% fueron MDR. Los porcentajes de resistencia obtenidos por el MABA se presentan en la Tabla 1. De los 268 pacientes, 197 eran vírgenes a

tratamiento, de los cuales el 44% presentaron resistencia primaria, pero de estos, solo el 5% fueron MDR. Los 71 pacientes (26.49%) con tratamiento previo presentaron resistencia secundaria de los cuales el 14.55% fueron MDR. En la Tabla 2, se expone la evolución de la enfermedad en los pacientes afectados por la TB. La correlación de la resistencia a fármacos obtenida por el MABA de las micobacterias con el curso clínico de la enfermedad, se realizó la prueba de Chi-cuadrada de Pearson para las variables INH, RIF resistentes y sensibles con el estado de salud: sanos, enfermos y defunciones, realizando tablas de frecuencias (Tablas 3 y 4).

**Tabla 1. Resultados de las pruebas de sensibilidad por el método Alamar azul.**

Sensibilidad	Isoniazida	Rifampicina	Estreptomicina	Etambutol
Sensibles	72%	48%	76%	72%
Resistentes	28%	52%	24%	28%

**Tabla 2. Evolución clínica de la enfermedad (N=268).**

Sanos	Enfermos	Defunciones
193 (72%)	57 (21%)	18 (7%)

**Tabla 3. Tabla de frecuencias para estado de salud para los fenotipos isoniazida, resistente y sensible: sanos, enfermos y defunciones.**

ISONIACIDA FENOTIPO Y ESTADO DE SALUD	
Procedimiento FREQ	
Tabla de FENOTIPO por SALUD	
FENOTIPO	SALUD
Frecuencia,	
Porcentaje,	
Pct fila ,	
Pct col ,	ENFERMO ,MUERTO ,SANO , Total
R ,	32 , 17 , 26 , 75
	, 11.94 , 6.34 , 9.70 , 27.99
	, 42.67 , 22.67 , 34.67 ,
	, 56.14 , 36.44 , 13.47 ,
S ,	25 , 1 , 167 , 193
	, 9.33 , 0.37 , 62.31 , 72.01
	, 12.95 , 0.52 , 86.53 ,
	, 43.86 , 6.56 , 86.53 ,
Total	57 18 193 268
	21.27 6.72 72.01 100.00

Estadísticos para Tabla de FENOTIPO por SALUD			
Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	2	82.0419	<.0001
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	2	79.2988	<.0001
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	53.0234	<.0001
Coeficiente Phi		0.5533	
Coeficiente de contingencia		0.4841	
V de Cramer		0.5533	

**Tabla 4. Tabla de frecuencias para estado de salud para los fenotipos rifampicina, resistente y sensible: sanos, enfermos y defunciones**

RINFAMPICINA FENOTIPO Y ESTADO DE SALUD	
Procedimiento FREQ	
Tabla de FENOTIPO por SALUD	
FENOTIPO	SALUD
Frecuencia,	
Porcentaje,	
Pct fila ,	
Pct col ,	ENFERMO ,MUERTO ,SANO , Total
R ,	55 , 18 , 66 , 139
	, 20.52 , 6.72 , 24.63 , 51.87
	, 39.57 , 12.95 , 47.48 ,
	, 96.48 , 100.00 , 34.20 ,
S ,	2 , 0 , 127 , 129
	, 0.75 , 0.00 , 47.39 , 48.13
	, 1.55 , 0.00 , 98.45 ,
	, 3.51 , 0.00 , 65.80 ,
Total	57 18 193 268
	21.27 6.72 72.01 100.00

#### Estadísticos para Tabla de FENOTIPO por SALUD

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	2	86.3075	<.0001
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	2	105.8846	<.0001
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	78.1587	<.0001
Coeficiente Phi		0.5675	
Coeficiente de contingencia		0.4936	
V de Cramer		0.5675	

Para los fenotipos INH resistente y sensible con el estado de salud, se determinó una Chi-cuadrada de 82.0419 con una p<0.0001 se observa que existe una mayor frecuencia 86.53% entre personas sanas con cepas sensibles respecto a sanos con cepas resistentes 13.47%; sin embargo, el porcentaje de defunciones es mayor 94.44% en cepas resistentes que en cepas sensibles 5.56%, siendo de mayor porcentaje dentro de las cepas resistentes, con las personas enfermas. Para los fenotipo RIF resistentes y sensibles con el estado de salud, se determinó una Chi-cuadrada de 86.3075 con una p<0.0001 se observó que existe mayor frecuencia 65.80% entre cepas sensibles respecto a pacientes sanos con cepas resistentes 34.20%; sin embargo, la frecuencia de defunciones fue mayor (100%) con cepas resistentes respecto a las sensibles (0%).

## Discusión

La situación actual de la TB, con la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos, ha provocado que se den cambios sustanciales en la concepción del diagnóstico de esta enfermedad, no bastando con la observación única de los BAAR en la muestra, sino resaltando la importancia del aislamiento, identificación taxonómica de la bacteria y la realización de estudios de sensibilidad que indique de manera

precisa el tratamiento de elección para cada paciente afectado, sobre todo a aquellos pacientes que porten una micobacteria MDR. En nuestra investigación, al estandarizar y desarrollar el MABA, dio buen resultado el introducir las placas costar de baja evaporación de 96 pozos en bolsas de polietileno, sin embargo, también se pueden sellar las microplacas con parafilm dando buenos resultados.<sup>21</sup>

Se determinaron los niveles de resistencia primaria y secundaria, así como la MDR a fármacos antituberculosos de primera línea. Los niveles de resistencia primaria y secundaria, así como MDR fueron más altos que los descritos por otros autores, aunque estos fueron estudios aislados con un número de muestra pequeño y con cepas de pacientes con TB sin importar si eran de diagnóstico o de pacientes con falla terapéutica. Resultados que proporcionaron información epidemiológica regional de los casos de TB.

Además, el estudio proporcionó también datos importantes a los epidemiólogos de los servicios de salud, con el fin de mejorar la atención a este padecimiento y así evitar la elevada tasa de resistencia y MDR, como se muestra en este estudio. Se observó la actividad del indicador redox resazurina, que cambió sus propiedades fisicoquímicas al estar sujetos a un potencial de reducción elevado, como el que se genera cuando la micobacteria resistente a los fármacos crece irrestricta en el medio de cultivo. Al término del periodo de incubación de 24 o 48 h se observó la placa para determinar si había un cambio de coloración azul a rosa.

Los resultados obtenidos en cuanto a la reproducibilidad del método en la determinación de la sensibilidad a fármacos anti-TB de primera línea: INH, RIF, SM y EMB, en cepas aisladas de pacientes con TB aplicando el MABA, al respecto, Collins y Franzblau en 1997, utilizaron ensayos colorimétricos para determinar la susceptibilidad a las drogas anti-TB, ellos reportaron valores de concordancia de 87.9% y 97% con el método de proporciones en agar y el sistema radiométrico BACTEC-460, respectivamente, en donde se utilizaron tres cepas micobacteriales: H37Rv y H37Ra de *M. tuberculosis* y *M. avium*, en donde concluyeron que la diferencia entre la CMI de H37Rv y H37Ra de *M. tuberculosis* fueron significativas con nueve de los medicamentos probados y no se observó diferencia significativa entre la CMI determinada con BACTEC 460 y el método MABA.<sup>17</sup> Un año después, Franzblau y cols, utilizaron el MABA para conocer la CMI de la INH, RIF, SM y del EMB de 34 aislamientos de *M. tuberculosis*, utilizaron como revelador el indicador óxido-reductor tetrazolio, usado para obtener la medición de susceptibilidad de la bacteria.<sup>21</sup>

En ese trabajo, se hizo también un comparativo con el método BACTEC 460 es otro método radiactivo usado para determinar

la susceptibilidad de los medicamentos, en donde se encontró que de 19 aislamientos, 16 resultaron sensibilidad a 0.1 $\mu$ g/mL de INH en el método BACTEC 460 y la CMI por el MABA fue de  $\leq$ 0.25  $\mu$ g/mL.<sup>21</sup> El indicador óxido-reductor resazurina se identificó como indicador óptimo para el MABA,<sup>22</sup> lo que permitió su empleo para determinar la susceptibilidad de la micobacteria frente a fármacos anti-TB, mostrando muy buena correlación con el método de proporciones en agar.

Los resultados de este trabajo respecto a la sensibilidad obtenida por el MABA, coinciden también con una evaluación realizada para ver la exactitud del MABA, en donde se detectó de una manera muy rápida la resistencia a la RIF e INH en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* en Perú,<sup>23</sup> en el cual, se manifiesta que el MABA es una alternativa excelente como prueba a la sensibilidad a los medicamentos antimicobacteriales, considerando las ventajas de la susceptibilidad a los medicamentos fenotípica, tales como ensayos de microdilución, costo-beneficio, velocidad y resultados cuantitativos de la CMI.

En este trabajo de investigación se observó que el MABA es un método conveniente para determinar la sensibilidad a los aislamientos antimicobacterianos, es rápido y su aplicación requiere de mínima tecnología. También, estas observaciones coinciden con el trabajo realizado por Franzblau y cols, en 1998; al respecto, Collins y Franzblau, además de las observaciones antes mencionadas, concluyen que el MABA es sobre todo útil para el escaneo de medicamentos antimicobacteriales.<sup>17</sup>

También, para verificar la sensibilidad y especificidad de MABA se publicó en el año 2005, por Kumar y cols, que realizaron un comparativo con el método colorimétrico en microplaca rápido basado en la nitrato reductasa, con el método en microplaca MABA, para determinar *M. tuberculosis* de aislamientos clínicos, los resultados reproducibles fueron obtenidos en siete días por las dos técnicas.<sup>23</sup> De igual manera, se evidencia la elevada sensibilidad y especificidad de los métodos colorimétricos para la detección rápida de MDR-TB.<sup>19</sup> Al respecto, se ha evaluado el MABA en cepas de *M. tuberculosis* con una sensibilidad (89%) y especificidad (100%) de resistencia a INH y RIF.<sup>16,24</sup> Se observó que MABA es un método conveniente para determinar la sensibilidad a los aislamientos antimicobacterianos, es rápido y su aplicación requiere de mínima tecnología.

La estandarización del método MABA se llevó a cabo con 5 cepas de referencia, que presentan resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea (SM, INH, RIF y EMB) utilizando el método descrito en material y métodos.

Se determinó la CMI para cada muestra y para cada fármaco (CMI del antibiótico necesaria para impedir el 99% o menos del crecimiento bacteriano), de acuerdo con el cambio de color del indicador redox de azul a rosa, utilizando como referencia los controles positivos del 100%, 10% y 1% de la actividad bacteriana. Se obtuvieron los niveles de resistencia a fármacos por el método de MABA y fueron corroborados por la ENCB del IPN del departamento de inmunología celular, encontrándose elevada concordancia con los resultados obtenidos previamente (>90%).

Los niveles de resistencia primaria y secundaria, en este estudio fueron del 56% y 45%, respectivamente. Así como una MDR del 47% y un 8% de cepas resistentes a todos los fármacos de primera línea. Los cuales, son más altos que los reportados por otros investigadores, como el obtenido por el INDRE en 1993 que fue del 8.3% de resistencia primaria, ese estudio fue similar al hallazgo obtenido en el año 1995 por De la Fuente y colaboradores, que obtuvieron una resistencia primaria de 9% para INH y 6% para RIF y una resistencia secundaria de 44% para INH y 35% para RIF y una MDR del 35%, el INDRE en 1997 encontró una resistencia primaria del 12.8%.

La implementación de la técnica de diagnóstico MABA, dará la oportunidad de ser en nuestra Región el primer Laboratorio Regional de Referencia, ya que el Gobierno Federal a través de CENAVECE, INDRE, en el Proyecto Salud-2004-01-089, contemplan el MABA como estrategia para el control y preventión de resistencia y MDR realizando estudios a nivel laboratorios regionales en los diferentes Estados de la República Mexicana. De otro lado, las técnicas de biología molecular aplicadas al estudio de la TB han permitido comprender la dinámica de la transmisión, patogenicidad y factores de riesgo asociados con la enfermedad. Al evaluar las muestras con falla terapéutica, de las 268 muestras procesadas, 126 (47%) de las cepas fue MDR, el 121 (45%) observó resistencia secundaria y 21 (8%) cepas mostraron resistencia a los cuatro fármacos (RIF, INH, SM y EMB). De manera semejante, en Iraq, Nema y colaboradores en el año 2009, encontraron de un total de 411 pacientes con TBP, que la resistencia a RIF, INH, SM y EMB fue en 52 (24.4%), 22 (10.3%), 21 (9.9%) y 8 (3.8%) de aislamientos, respectivamente.

La MDR y la resistencia a los cuatro fármacos fue de 52 (24.4%) y 24 (11.3%), respectivamente.<sup>25</sup> Ando y cols, en el año 2010, al analizar el perfil de la drogo-sensibilidad de 63 aislamientos realizados, detectaron cinco grupos, de los cuales el grupo I (20%) fue resistente a la INH (0.2 µg/mL) y sensible a la INH (0.1 µg/mL), y los del grupo V (5%) fueron altamente resistentes a la INH. Seis de los aislamientos fueron MDR y un

aislamiento fue extremadamente MDR (XDR).<sup>26</sup> Aunque, la eficiencia del MABA ha sido aprobada en algunos países de América Latina como Colombia, Argentina, Perú y República de Cuba. En México, han sido muy pocos los estudios realizados con este fin, Luna-Herrera y colaboradores han realizado el MABA para determinar la drogo-sensibilidad de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*,<sup>18</sup> es necesario realizar más estudios de sensibilidad, linealidad, crecimiento, no solo para *Mycobacterium* sino también para otro tipo de microorganismos,<sup>19,20,27-30</sup> en donde se ha probado la sensibilidad y el beneficio económico del MABA.

Considerando los resultados de la presente investigación se sugiere para un estudio posterior la inclusión de aislamientos clínicos de individuos considerados de alto riesgo de desarrollar TB, con el objeto de determinar la farmacorresistencia y otorgar oportunamente el tratamiento apropiado.

## Conclusiones

Se estableció con el MABA un diagnóstico rápido a partir de muestras pulmonares con TB, asociando la evolución clínica de pacientes con la resistencia al tratamiento de los aislados de *Mycobacterium*. Se subraya el uso de la metodología fenotípica de MABA por la facilidad en su montaje e interpretación de resultados, lo cual la convierte en una herramienta útil en la determinación rápida de la farmacorresistencia de *M. tuberculosis*.

La determinación de la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea, INH, RIF, SM y EMB, en cepas de *Mycobacterium*, fue exitosa aplicando el MABA, por lo que este ensayo, en primer lugar, permite con los cultivos realizados previamente, determinar la CMI a los fármacos de primera línea y posteriormente, aplicar el tratamiento adecuado con la determinación de resistencia y MDR a los medicamentos específicos para esta enfermedad.

Los resultados demuestran tasa elevada de resistencia a RIF e INH y de MDR en cepas de *Mycobacterium* aisladas de pacientes con TB en la Comarca Lagunera. El resultado de la CMI de cada fármaco permitió determinar estadísticamente la asociación de la sensibilidad a fármacos de aislamientos antimicobacterianos con el curso clínico de la TB entre la población sana, enferma y defunciones. En la evolución de los pacientes MDR, los que fallecieron pertenecían a esta categoría y el resto permanecieron enfermos.

Los resultados del estudio muestran que los pacientes con mejor pronóstico fueron aquellos que tenían cepas sensibles, seguidos

de los que tenían resistencia primaria no MDR y los de mal pronóstico fueron los MDR. Lo que permite tomar medidas apropiadas como la modificación de la dosis terapéutica para lograr el control de la TB y la prevención de la morbilidad. Se determinó estadísticamente que existe una asociación determinante entre la MDR y las defunciones, por lo que es un indicador epidemiológico de riesgo para el paciente infectado con este tipo de cepas, así como para la población expuesta.

La TB es una enfermedad que requiere mayor atención por parte de las autoridades del sector salud, principalmente de la disponibilidad de técnicas que acorten los tiempos para hacer diagnósticos, principalmente en lo que se refiere a la resistencia y MDR en la Comarca Lagunera.

## Agradecimientos

Especial agradecimiento al Departamento de Genética y Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad Autónoma de Coahuila y al Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por la confianza otorgada al permitir el uso de su equipo y respectivas instalaciones. Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Químicas Unidad Gómez Palacio de la Universidad Juárez del Estado de Durango, por el financiamiento en la realización del presente proyecto.

## Referencias

- Jimenez-Arellanes MA, Cornejo-Garrido J, León-Díaz R. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010; 41(1):22-9.
- Hristea A, Otelea D, Paraschiv S, Macri A, Baicus C, Moldovan O. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance mutations to rifampin and isoniazid by real-time PCR. Indian J Med Microbiol. 2010; 28(3):211-6.
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. Diario oficial. Primera sección. 20. Dirección general de medicina preventiva. 1995; 1-12. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/006ssa23.html> [Acceso Noviembre 2009].
- Kibiki GS, Mulder B, Dolmans WM, de Beer JL, Boeree M, Sam N. M. tuberculosis genotypic diversity and drug susceptibility pattern in HIV-infected and non-HIV-infected patients in northern Tanzania. BMC Microbiol. 2007; 7:51.
- Scott KH, Moll AP, Gandhi NR, Eksteen FJ, Babaria P, Coovadia Y. Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Aspirates, Rural South Africa. Emerg Infect Dis. 2010; 16(3):557-60.
- Ritacco V, Lopez B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2008; 103(5):489-92.
- Suarez J, Ranguelova K, Schelvis JP, Magliozzo RS. Antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: peroxidase intermediate bypass causes poor isoniazid activation by the S315G mutant of *M. tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). J Biol Chem. 2009; 284(24):16146-55.
- Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, Cirillo DM. Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. J Clin Microbiol. 2006; 44(7):2485-91.
- Van Klingerden B, Dessens-Kroon M, van der Laan T, Kremer K, van Soelingen D. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex by use of a high-throughput, reproducible, absolute concentration method. J Clin Microbiol. 2007; 45(8):2662-8.
- Castillejos LM, Pérez PR, Quiñones FF, García SF. Implicaciones de los polimorfismos de un solo nucleótido en *Mycobacterium tuberculosis* y humanos en el manejo clínico de la tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp. 2006; 19(1):38-46.
- Laniado-Laborin R. Urge regionalizar los laboratorios de salud pública de México. Salud Pública de México. 2000; 42(3):171-77.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Distribución de casos de TB diagnosticados según Municipio; 2007. Disponible en: [www.e-pages.dk/coahuilagobmx/44/34](http://www.e-pages.dk/coahuilagobmx/44/34). [Acceso Febrero 2010].
- Luna-Herrera J, Martínez-Cabrera G, Parra-Maldonado R, Enciso-Moreno JA, Torres-Lopez J, Quesada-Pascual F. Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol. 2003; 22(1):21-7.
- OPS/OMS. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. 2008; Nota técnica No. 26 y 27. Disponible en: [www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloskopía.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloskopía.pdf). [Acceso octubre 2009].
- Chauca JA, Palomino JC, Guerra H. Evaluation of the accuracy of the microplate Alamar Blue assay for rapid detection of MDR-TB in Peru. Int J Tuberc Lung Dis. 2007; 11(7):820-2.
- de la Iglesia AI, Stella EJ, Morbidoni HR. Comparison of the performances of two in-house rapid methods for antitubercular drug susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(2):808-10.

17. Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(5):1004-9.
18. Luna-Herrera J, Costa MC, Gonzalez GH, Rodriguez AI, Castilho PC. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59:548-2.
19. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(2):175-83.
20. Bhattacharyya GK, Johnson RA. Statical concepts and methods. 1st ed. EUA: Wiley. 1977.
21. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(2):362-6.
22. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000; 267(17): 5421-6.
23. Kumar M, Khan IA, Verma V, Qazi GN. Microplate nitrate reductase assay versus Alamar Blue assay for MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9(8):939-41.
24. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(4):500-5.
25. Nema FM, Cabms HM. Pattern of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in previously treated cases in Iraq. *IRAQI JMED SCI*. 2009; 7(2):41:9.
26. Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T. Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(5):1793-9.
27. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(7):2612-7.
28. Uzunoglu S, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Sezgin C, Karabulut B. Comparison of XTT and Alamar blue assays in the assessment of the viability of various human cancer cell lines by AT-101 (-/- gossypol). *Toxicol Mech Methods*. 2010; 20(8):482-6.
29. Sykes ML, Avery VM. Development of an Alamar Blue viability assay in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream form strain 427. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 81(4):665-74.
30. Pettit RK, Weber CA, Pettit GR. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009; 8:28.