

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

**ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD
DE *Mycobacterium tuberculosis* a MOXIFLOXACINO, UNA NUEVA
QUINOLONA POR EL SISTEMA BACTEC 460TB.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

María del Carmen García Colín.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARIA DEL CARMEN CORTES DECUIR.
VOCAL: Profesor: RAÚL GARZA VELASCO.
SECRETARIO: Profesor: EDUARDO RIVERA MARTÍNEZ.
1er SUPLENTE: Profesor: ESTRELLA CERVANTES GARCÍA.
2do SUPLENTE: Profesor: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER).

ASESOR DEL TEMA: Dr. Eduardo Rivera Martínez.
SUPERVISOR TÉCNICO: Q.F.B. Lina Edith Pérez González.
SUSTENTANTE: María del Carmen García Colín.

Agradecimientos

A mi asesor: Dr. Eduardo Rivera Martínez

Por su paciencia y compartir sus conocimientos durante la revisión. Con respeto y admiración para usted, Gracias.

A mi supervisor técnico: QFB Lina Edith Pérez González

Gracias amiga, por tus comentarios, consejos y apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A mis maestros: QFB Raúl Garza Velasco

QFB Ma. Del Carmen Cortes de Cuir,

Gracias por sus consejos durante la revisión de este trabajo.

A mis compañeras: Lina, Rosa Aurora, Edith, Elia María, Ma. Elena, Silvia y Ma. Teresa. Por enseñarme sus conocimientos y la amistad brindada.

A todas aquellas personas que de una u otra forma participaron para la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres

Tey y Pancho, Por que, me enseñaron que con responsabilidad, trabajo, respeto y amor los sueños se pueden convertir en realidad. Por todo lo que me han dado en la vida. Los amo.

A mi esposo

Santos, te agradezco esos calidos abrazos que han estado ahí cuando e tenido que reír y llorar. Te amo

A mis hijos

Bruno, Paola y Aranza, mis bellos tesoros, gracias por comprender a mamá cuando no podía estar con ustedes. Por sus sonrisas, abrazos y besos, por que son el amor de mi vida. Los amo

A mis hermanos

Lula, Cris, Ady y Paco, por los bellos momentos que hemos pasado juntos. Los amo

A mis Abuelos

Goyo y Goya, mis dos angelitos que todos los días me cuidan.

A las mujeres de mi vida

Abuelita Pancha, Chelo, Goya, Tey, Lula, Cris, Ady, Angie, Pao, Aranza, Sarai y Sofia.

En la sangre traemos orgullo y lucha.

A mis sobrinos

Samuel, Abraham y el bebe.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Transmisión de la tuberculosis	2
2.2 <i>Mycobacterium .tuberculosis</i>	4
2.2.1 Cultivo	6
2.2.2 Identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.2.3 Métodos automatizados	10
2.3 Susceptibilidad	13
2.4 Efecto de las fluoroquinolonas en el tratamiento de la tuberculosis	16
2.4.1 Quinolonas y estructura básica	17
2.4.2 Espectro del antibiótico	19
2.4.3 Mecanismo y sitio de acción	20
2.4.4 Características de moxifloxacino	21
2.5 Situación mundial de la tuberculosis	23
2.6 Multidrogorresistencia en el mundo y México	25
3. Justificación	27
4. Objetivos	29
5. Hipótesis	30
6. Parte experimental	31
6.1 Material	31
6.2 Método	32

7. Resultados	40
8. Discusión	47
9. Conclusiones	51
10. Apéndice	52
11. Bibliografía	65

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas que afectan a la humanidad ya que existen evidencias paleopatológicas de tuberculosis espinal en esqueletos del Neolítico y precolombinos y en el antiguo Egipto.

En los siglos XVII y XVIII esta enfermedad causó la muerte de la cuarta parte de los adultos en Europa. En este tiempo se conocían las características de la enfermedad, sin embargo, se desconocía su origen y fue hasta mediados del siglo XIX cuando se empezaron a conocer los conceptos básicos de la tuberculosis.^{5,37,49}

La tuberculosis, fue descrita por primera vez por Villemin en 1865 como una enfermedad infecciosa y transmisible y fue hasta 1882 que Roberto Koch hizo la caracterización del agente causante de la enfermedad. Esto constituyó una impresionante confirmación de los criterios que él había establecido para identificar el agente etiológico de esta enfermedad infecciosa, dando así inicio a la época dorada de la bacteriología médica.^{32,49}

Actualmente la tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública en el mundo ya que de acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2005 hubo 8.8 millones de nuevos casos, de los cuales 7.4 millones están en Asia y África subsahariana. Causó la muerte de 1.6 millones de personas entre ellas 195, 000 infectadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VHI).^{10,13} Para América Latina, los casos nuevos son de 650 mil por año y 50 mil defunciones.¹⁵

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Transmisión de la tuberculosis

La transmisión de esta enfermedad se lleva a cabo por vía aérea a través de la inhalación de uno o más bacilos contenidos en el núcleo de una gotita de “Pfluger”, (pequeñas partículas), las cuales, han sido eliminados por pacientes con tuberculosis pulmonar activa (bacilíferos) a través de la tos o estornudo. Solamente las partículas menores de 10 micras (1 a 5 μm), constituidas por los núcleos que quedan al evaporarse las gotitas de “Pfluger”, pueden transmitir la infección, ya que se dispersan fácilmente con cualquier corriente de aire, pudiendo mantenerse suspendidas en el ambiente y permanecer por largo tiempo. Las gotitas de “Pfluger”, contienen entre 1-5 bacilos por microgota, siendo realmente infecciosas. Se considera que debe llegar un mínimo de 10-200 microgotas para que se inicie la infección. La zona del pulmón infectada es la mas ventilada con elevada tensión de oxígeno donde *Mycobacterium tuberculosis* encuentra las condiciones ideales para multiplicarse (región subpleural del lóbulo inferior),^{3,10,32} (figura 1)

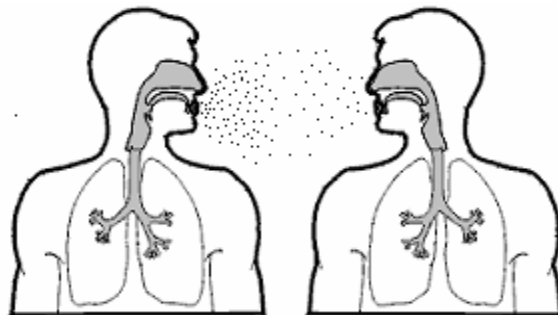


Figura 1. Mecanismo de transmisión (vía aérea) de TB.

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* se inicia cuando una persona sensible a la enfermedad inhala las gotitas en aerosol que contienen microorganismos viables. Los cuales al llegar a los pulmones, son ingeridos por el macrófago alveolar (MA), es la célula clave en la respuesta inmunológica a la tuberculosis. Este MA, habiendo ingerido el bacilo exitosamente, procesa antígenos bacterianos y los presenta a los linfocitos T específicos. Antes de que se desarrolle la acción celular inmune (4-8 semanas), los bacilos tuberculosos crecen sin ningún impedimento, lo que les permite pasar a la corriente sanguínea y diseminarse a otros lugares donde pueden morir o persistir y en algún momento de la vida estos se pueden multiplicar. Una vez que estos llegan a pulmón se suscita una reacción inflamatoria localizada, que puede afectar ganglios regionales, de donde se lleva a cabo la diseminación linfática y hematógena inicial que siembra bacterias donde hay una presión de oxígeno elevada (ápices pulmonares, epífisis de huesos y corteza renal), esta primera etapa suele ser asintomática y se le denomina tuberculosis primaria.^{3,36,37}

A demás de la vía respiratoria el bacilo de la tuberculosis puede infectar tubo digestivo, el sistema genitourinario, la conjuntiva y la piel. La vía de infección más frecuente y más importante es la respiratoria.

La infección primaria a través del tubo digestivo se produce como consecuencia de la ingestión de bacilos en alimentos contaminados, sobre todo en la leche. Este tipo de transmisión es poco frecuente en países tecnológicamente avanzados, pero aún se produce en algunos países en vías de desarrollo en los que la infección de ganado vacuno con *Mycobacterium bovis* es endémica. A veces se produce infección secundaria de este tipo especialmente en niños, al deglutir las

secreciones de origen respiratorio. Después de la penetración en las membranas mucosas del tubo digestivo, los bacilos se encuentran en los ganglios linfáticos regionales. Es posible que se produzca la infección primaria del tracto genitourinario, pero rara vez se da en condiciones naturales. La infección a través de la conjuntiva tiene lugar fácilmente en condiciones experimentales; no se sabe la frecuencia con que aparece en condiciones naturales, porque los ganglios linfáticos cervicales, en los que la infección aparecería en primer lugar, se infectan con facilidad por otros canales. La infección en la piel se produce mediante abrasiones u otros traumatismos y es poco frecuente, pero da lugar a verrugas tuberculosas.

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Es el agente etiológico de la tuberculosis, es un bacilo que pertenece al orden de los Actinomycetales; familia *Mycobacteriaceae*; género *Mycobacterium* y se caracteriza por contener ácidos micólicos en su pared celular. Pertenece al denominado “complejo *Mycobacterium tuberculosis*” que incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG, *M. microfi* y *M. africanum*. Las otras especies de micobacterias llamadas “atípicas” o “no tuberculosas”(MNT), también son patógenas para el hombre, especialmente ante situaciones de inmunodeficiencia.^{9,10, 32} Se aíslan del suelo, agua y otros habitats, son oportunistas, a veces con frecuencia pueden ser residentes transitorios de boca y faringe, pueden aislarse de especímenes clínicos. Algunas especies parecen ser inocuas, pero otras producen enfermedad en el humano, son capaces de invadir los tejidos y pueden

causar una enfermedad pulmonar grave, indistinguible de la tuberculosis; No se contagian de persona a persona y son resistentes a la quimioterapia antituberculosa.³

Mycobacterium tuberculosis, es un bacilo de bordes redondeados, ligeramente curvo, inmóvil, no esporulado, aerobio estricto, obtiene su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono, su temperatura óptima es de 37°C y llega a medir de 1 a 4 µm de longitud y 0.2 a 0.6 µm de diámetro, es un microorganismo intracelular facultativo, puede vivir en el interior de los macrófagos por varios años sin causar enfermedad^{8,9,32,39}. Muestra desarrollo lento, ya que su tiempo de generación es de 12 a 18 horas, en contraste de 15 minutos para las enterobacterias. Ante circunstancias metabólicas adversas entra en un “estado de latencia”, lo cual le da la capacidad de que un cuadro infeccioso se transforme en crónico.¹⁰

El bacilo es resistente al frío, la congelación y a la desecación, sobreviviendo por largos periodos de tiempo en esputos secos; y por el contrario es muy sensible al calor, luz solar, luz ultravioleta y pasteurización. Sus condiciones ideales para crecer incluye un pH de 7.4 y una presión de oxígeno entre 100 y 140 mmHg.^{5,49}

Otra característica importante es la composición de su pared celular, la cual, esta formada por tres capas donde se encuentran los ácidos micólicos, la cera D, glucoproteínas, trehalosa 6,6 dimicolato, sulfátidos y micósidos.^{9,39}

El 60% del total de los componentes son lípidos y esta característica le confiere resistencia y evita ser destruido por los macrófagos así como resistir la desecación.⁵

Por su alto contenido de lípidos, la pared celular de las micobacterias tienen la capacidad de ligarse a la fucsina fenicada, no siendo decoloradas por el alcohol ácido y la capacidad de formar complejos coloreados con los derivados de trifenilmetano (auramina – rodamina) que también resiste la acción del alcohol ácido estas propiedades parece que están relacionadas con la presencia de los ácidos micólicos en la pared de las micobacterias.^{8,9,32}

Las cepas virulentas de *M. tuberculosis* forman “cordones serpentinos” microscópicos en los cuales los bacilos ácido-alcohol resistentes se encuentran ordenados en cadenas paralelas, la formación de estos cordones esta dada por la presencia de trehalosa 6,6 dimicolato, que ha sido asociado con la virulencia.⁸

2.2.1 Cultivo

El cultivo es el método de laboratorio más sensible y específico para demostrar la presencia de micobacterias y en particular, de *Mycobacterium tuberculosis*, es el estándar de oro para el diagnóstico de la tuberculosis. Tiene mayor sensibilidad que la baciloscopia, ya que sólo requiere la presencia de 10 bacilos por mililitro.¹⁰

Para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* se requieren medios de cultivo especiales, se les clasifica como selectivos y no selectivos, dentro de los medios selectivos se encuentra:

- a) Lowenstein – Jensen.
- b) Pretagnani.
- c) ATS (Medio American Thoracic Society).
- d) 7H10 de Middlebrook.
- e) 7H11 de Middlebrook.

Los tres primeros contienen en su base huevo entero coagulado o Yema de huevo fresco, leche entera, sales definidas, harina de papa y verde de malaquita como inhibidor, la concentración de esta varía de acuerdo al medio. Lowenstein – Jensen tiene una concentración de 0.025%. Se necesita en promedio 3 a 8 semanas para el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis*. El Middlebrok 7H10 (medio líquido) y el Middlebrok 7H11 que contiene agar en vez de la base de huevo; ambos contienen sales definidas, vitaminas, cofactores, glicerol y un suplemento (OADC – oleico, albúmina, dextrosa, catalasa) el cual los enriquece y favorece el desarrollo de las micobacterias. Estos medios son transparentes y permiten la fácil detección de crecimiento después de 10 a 12 días de incubación, se usan ampliamente para el aislamiento y pruebas de susceptibilidad.

El medio sólido de Lowenstein - Jensen es el más utilizado, las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* crecen a 37°C, el crecimiento suele ser de colonias mates, secas, muy pálidas y generalmente rugosas.^{9,31}

Existen medios líquidos como el Dubos, el cual contiene un producto que disminuye la tensión superficial, es el Tween 80, un detergente que permite que el líquido nutritivo empape los bacilos, formando colonias aisladas y acelerando el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.^{8,32}

Los medios selectivos, contienen agentes antimicrobianos para suprimir la contaminación de bacterias y hongos y mejorar la recuperación de las micobacterias. Estos medios, son los antes mencionados, su composición es la misma además de, penicilina, ácido nalidíxico, cicloheximida, lincomicina, carbenicilina, anfotericina B, polimixina B y lactato de trimetropina. La concentración de las sales varía de acuerdo al medio.⁹

2.2.2 Identificación de *Mycobacterium tuberculosis*

a) Tinción

Debido a su alto contenido lípidico, las paredes celulares de las micobacterias tienen la capacidad única de ligarse a la fucsina fenicada, no siendo decolorada por el alcohol – ácido. Esta reacción ácido-alcohol resistente de las micobacterias, junto con su tamaño y forma característica, constituye una ayuda valiosa para la detección temprana de la infección y en el control del tratamiento.^{5,8,9,31,32}

Existen dos tinciones fundamentales para la observación de micobacterias: la de Ziehl-Neelsen (figura 2) y Kinyoun que demuestra la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, y la tinción de Truant (fluorocromica), que permite que las micobacterias capturen un complejo de fluorocromos y se vean fluorescentes, se requiere de un microscopio de luz ultravioleta y de un cuarto oscuro, esta técnica es mas sensible que la tinción de Ziehl-Neelsen y Kinyoun. (Apéndice)^{9,24}

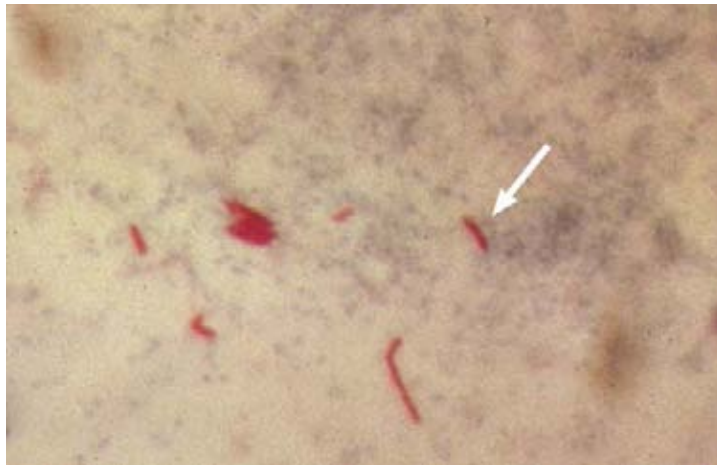


Figura 2. Morfología microscópica de *Mycobacterium tuberculosis* por tinción de Ziehl – Neelsen.

b) Pruebas bioquímicas

Para su identificación se requiere de pruebas, donde las de mayor importancia son: temperatura óptima de desarrollo, velocidad de desarrollo, producción de pigmento, actividad de catalasa, acumulación de niacina, reducción de nitratos.

Es característico que los bacilos tuberculosos tengan débil actividad de catalasa, que desaparece al calentarlos a 68°C, prueba de niacina y reducción de nitratos positiva, lo que permite diferenciarlo de las micobacterias atípicas.^{9,24,32}

Tabla 1. Principales pruebas bioquímicas del complejo *M. tuberculosis*

Especie	Pigmento	Niacina	Reducción de nitratos	Catalasa a 68°C
M.tuberculosis	(-)	(+)	(+)	(-)
M.africanum	(-)	(-)	(-)	(-)
M.bovis	(-)	(-)	(-)	(-)
M.bovis, BCG	(-)	(-)	(-)	(-)
M. microti	(-)	(-)	(-)	(-)

*La temperatura óptima de desarrollo para todas las especies del complejo es de 37°C y la morfología colonial es rugosa.

**La velocidad de crecimiento para el complejo M.tuberculosis es de 12 a 25 días.

El Mycobacterium tuberculosis presenta máximo desarrollo a 37°C y muy poco o mínimo desarrollo a 30°C o 42°C. En los medios a base de huevo se detectan colonias a los 12 días de la inoculación, el tiempo promedio de recuperación es de

21 días. Seis o más semanas se puede requerir para que aparezcan colonias características.^{9,31}

2.2.3 Métodos automatizados

En la actualidad se dispone de tres sistemas automatizados y semiautomatizados: sistema radiométrico Bactec, el sistema no radiométrico MB/Bact Mycobacteria Detection (Organon Técnica Dirham, NC) y el sistema ESP culture System II-Myco (Difco Laboratorios, Detroit, Michigan). Así como dos alternativas posibles para los laboratorios sin sistemas automatizados son, el método manual Septi-Check System (BBL) y el sistema MGIT (Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Todos ellos tienen la metodología del Bactec, pero el marcaje radiactivo ha sido sustituido por la incorporación de un compuesto de rutenio (que emite fluorescencia detectable a medida que disminuye la tensión parcial de O₂ del medio, como consecuencia del metabolismo microbiano), u otras sustancias, de modo que la positividad del cultivo se basa en la detección del consumo de oxígeno por las micobacterias, o en la disminución de la presión de la atmósfera del vial, o en la liberación de CO₂ del medio de cultivo. La detección de micobacterias a partir de muestras clínicas es más sensible en comparación con los medios tradicionales.^{5,9,10}

El método radiométrico BACTEC TB 460, utiliza un medio líquido (Middlebrook 7H12, enriquecido), tiene como única fuente de carbono al ácido palmítico marcado con un isótopo radiactivo natural con carbono 14 (C¹⁴); éste emite radiaciones beta, inofensivas para el personal de laboratorio. Cuando en el medio se inocula una muestra previamente descontaminada (método de Petroff), las micobacterias presentes, empiezan a metabolizar los ácidos grasos marcados con

C¹⁴ causando la liberación del isótopo en forma de CO₂ marcado con C¹⁴ al medio ambiente, desde donde es aspirado y llevado a una cámara de ionización ó detectado en una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de bacilos en crecimiento, presentes en la muestra. Esta señal eléctrica se registra y se expresa como índice de crecimiento (GI).⁴² Este método es semiautomatizado y de alta sensibilidad y especificidad para la detección de crecimiento de todas las micobacterias y, en especial, de *M. tuberculosis*, tiene una eficacia en la recuperación de micobacterias de un 95%, mayor que otros medios de cultivos convencionales como el Lowenstein-Jensen, cuya recuperación es de 70%. Además este método radiométrico permite identificar y diferenciar al complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG, *M. africanum*, *M. microti*), de las micobacterias atípicas, así como su patrón de susceptibilidad a las drogas de primera línea (isoniacida, rifampicina, estreptomycin y etambutol). Obteniendo un resultado tanto de aislamiento, identificación y pruebas de susceptibilidad en un promedio de 20 días.³²



Figura 3 Sistema semiautomatizado BACTEC 460 TB

2.3 Susceptibilidad

En 1943, la estreptomicina, un antibiótico aislado por Waksman de un microorganismo del suelo, *Streptomyces griseus*, demostró poseer un notable efecto quimioterapéutico sobre la tuberculosis experimental de los cobayos.

⁴⁹Poco después se usó por primera vez con pacientes humanos. El uso de la estreptomicina inició la primera etapa de la quimioterapia antituberculosa, ayudó a la curación de muchos enfermos, pero también dio lugar a la existencia de enfermos crónicos y resistentes lo que originó el resurgimiento de mutantes resistentes constituyendo así un problema en el control de la tuberculosis. ^{40,49}

En 1952 se descubre la isoniacida lo que permite desarrollar el primer tratamiento con fines curativos de la tuberculosis. En 1961 se tienen las primeras pruebas de susceptibilidad y en 1968 se estandarizan los métodos de pruebas de susceptibilidad por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Las pruebas de susceptibilidad son de ayuda para el médico clínico, para determinar el patrón de resistencia que presenta la cepa aislada, donde se debe considerar primero, que la resistencia a las drogas es al azar independientemente de la exposición a los medicamentos y la frecuencia de los bacilos mutantes drogorresistentes.³²

En teoría los mutantes resistentes escapan a la acción de la droga de diferentes formas:

- 1) Mediante alteraciones estructurales en los componentes microbianos que interfieren o impiden la penetración del fármaco.
- 2) Mediante el desarrollo de vías metabólicas no susceptibles.
- 3) Mecanismos eficientes de degradación o destrucción de la droga.

Cuando el bacilo se pone en contacto con la droga, esta causa la muerte de los bacilos sensibles y favorecerá la multiplicación de los resistentes. Con el tiempo y como resultado de la acción del medicamento como agente selectivo, la población resistente substituirá a la originalmente sensible.

Este fenómeno llamado mutación-selección es la causa del fracaso cuando se utiliza un solo medicamento (monoterapia) y es la razón fundamental del uso simultáneo de 3 o más medicamentos en el tratamiento.^{40,46} En un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* se ha estimado en alrededor de un mutante en 10^6 bacterias para Isoniacida, una en 10^6 para la estreptomicina, una en 10^7 para rifampicina y una en 10^6 para etambutol.^{5,10,32} Estas son las premisas que hay que considerar para realizar pruebas de susceptibilidad.⁴⁶

Los criterios para definir la drogorresistencia en *Mycobacterium tuberculosis* fueron establecidas en bases empíricas sobre la proporción de mutantes resistentes.

Los procedimientos usados como criterios para las pruebas de susceptibilidad son:

- 1) La proporción crítica de mutantes resistentes a la droga.
- 2) La concentración crítica de droga presente en el medio.^{23,32}

El método BACTEC 460 TB, para ensayos de susceptibilidad de micobacterias a los medicamentos está basado en el mismo principio básico empleado en el método convencional; la única diferencia reside en que se usa un medio líquido y en vez de contar las colonias, el crecimiento se controla radiométricamente y los resultados se pueden anunciar en 4 a 5 días. La susceptibilidad a los medicamentos en el método BACTEC 460 TB, se determina siguiendo la versión modificada del método proporcional convencional. La proporción crítica para resistencia se considera como un 1% para todos los medicamentos contra la

tuberculosis. Esto significa que si el 1% o más de la población micobacteriana de ensayo es resistente, el cultivo se considera resistente a efectos de informe del laboratorio. La resistencia se determina comparando el índice de crecimiento (GI) del control con los frascos de 12B que contienen el medicamento ensayado.^{11,42}

El principio básico del ensayo radiométrico de susceptibilidad con el método BACTEC 460 TB a los medicamentos para micobacterias es semejante al utilizado en el procedimiento de aislamiento primario. Cuando crecen micobacterias en el medio 7H12 (frascos 12B), que contiene sustrato marcado con C¹⁴, Utilizan el sustrato y se produce CO₂¹⁴. La cantidad de CO₂¹⁴ detectada refleja el índice de crecimiento (GI). Cuando se agrega al medio un medicamento contra la tuberculosis, se inhibe el crecimiento si los organismos del ensayo son susceptibles. Esta inhibición puede detectarse al disminuir o aumentar muy ligeramente, los valores diarios de GI comparado con los del control. Sin embargo, si los organismos son resistentes, no tiene lugar ninguna inhibición o es mínima. La diferencia en los valores de GI con respecto a los del día anterior nos indica si un microorganismo es sensible o resistente. Los valores negativos de GI indican una disminución mientras que los valores positivos de GI indican un aumento en el crecimiento. Cuando los frascos de control alcancen un valor de GI > 30, los resultados deben interpretarse como se indica en el esquema con respecto al control:^{32,42,43}

$\Delta GI(\text{control}) > GI(\text{medicamento})$	—————▶	susceptible
$\Delta GI(\text{control}) < GI(\text{medicamento})$	—————▶	resistente
$\Delta GI(\text{control}) = GI(\text{medicamento})$	—————▶	indeterminado

En la actualidad se utilizan varias drogas para tratar la tuberculosis y algunas son consideradas drogas bactericidas de primera elección e incluyen, isoniacida, rifampicina, estreptomina, pirazinamida y etambutol. Sin embargo, por la aparición de resistencia microbiana o por factores propios del paciente como infección por VIH a veces se necesita recurrir a fármacos de segunda elección como son ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, amikacina, kanamicina, rifabutina, como drogas alternativas al tratamiento de la tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR).^{2,12}

2.4 Efecto de las fluoroquinolonas en el tratamiento de la tuberculosis

Diversas razones justifican el creciente interés por el uso de nuevos fármacos y en especial de las nuevas quinolonas por su particular actividad *in vitro* e *in vivo* frente al género *Mycobacterium*, estas son:

a) Actividad intrínseca frente al género *Mycobacterium*: Las nuevas quinolonas solamente son activas frente a algunas especies, las de mayor interés clínico.

b) Capacidad para penetrar y actuar en el interior de las células bacterianas: La fisiopatología de las infecciones por micobacterias es la capacidad de estos microorganismos para penetrar y multiplicarse en el interior de los macrófagos.

c) Resistencia a los fármacos antituberculosos: Las nuevas quinolonas son activas frente a algunas especies y cepas de micobacterias resistentes a otros fármacos antituberculosos.

d) Las quinolonas se han utilizado con éxito en el tratamiento de infecciones respiratorias producidas por microorganismos sensibles.^{14, 18}

La actividad in Vitro, la eficacia en modelos experimentales de infección, la penetración tisular y celular, los resultados en estudios clínicos preliminares y la baja toxicidad, sugieren que las quinolonas pueden ser agentes alternativos cuando aparece resistencia a los fármacos antituberculosos convencionales. Pudiendo permitir ciclos terapéuticos cortos o intermitentes. Considerando la capacidad de las micobacterias de desarrollar resistencia estas deben ser usadas con otros fármacos antituberculosos.¹⁸

2.4.1 Quinolonas y estructura básica

Las quinolonas comenzaron a usarse en la década de los 60's, siendo su prototipo el ácido nalidíxico. A este siguieron compuestos más potentes como el ácido oxolínico y la cinoxacina, usándose principalmente en infecciones de vías urinarias.¹⁴ Tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3 (figura 4). La potencia y el espectro aumentan de manera significativa cuando llevan un átomo de flúor en la posición 6. Frente a bacterias gram negativas también aumenta la potencia si en la posición 7 hay un grupo piperacínico (norfloxacino, ciprofloxacino) o un grupo metil-piperacínico (ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino). Además, sustituyentes metilo en el grupo piperacínico mejoran la biodisponibilidad oral. Aquellos compuestos que llevan en la posición 7 un doble anillo derivado del anillo pirrolidónico aumentan su actividad sobre bacterias Gram positivas (moxifloxacino). Un grupo metoxi en la posición 8 mejora la actividad frente a anaerobios (moxifloxacino, gatifloxacino).^{4, 20}

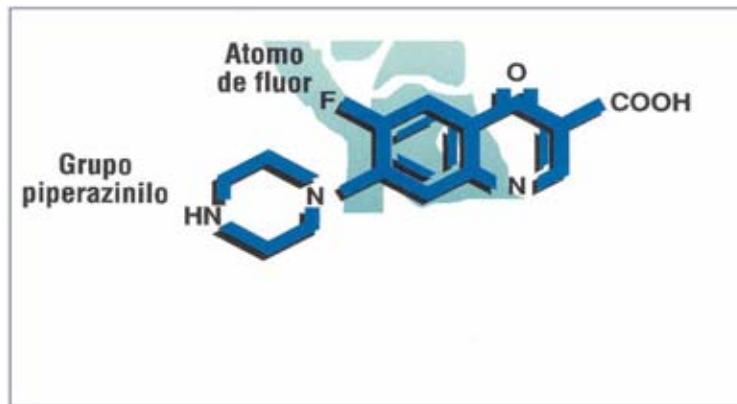


Figura 4. Estructura básica de las quinolonas

En la década de los 80's se apreció que estos nuevos agentes de quinolonas, las fluoroquinolonas como Norfloxacin, Ciprofloxacina, Perfloxacin, podían utilizarse en el tratamiento de infecciones sistémicas.⁸

Han demostrado ser activas frente a una gran variedad de microorganismos y entre ellos, contra numerosas micobacterias. Han despertado interés por su peculiar mecanismo de acción y por la ausencia cruzada con otros medicamentos. Su principal ventaja es que permite el tratamiento oral de diferentes infecciones en los pacientes externos como osteomielitis, que antes requerían la hospitalización para administrar antibióticos parenterales.^{27,29} También constituyen el primer tratamiento oral eficaz para las infecciones sistémicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a su penetración favorable a muchos tejidos, a su amplio espectro de actividad, a sus efectos colaterales benignos y a las pocas probabilidades de provocar resistencia, se les considera cada vez más para usos clínicos más amplios, sobre todo cuando se sospecha que hay microorganismos

resistentes a otros fármacos o cuando los regímenes terapéuticos estándar no son bien tolerados.²⁹

El volumen de distribución es alto, en muchos casos superior al volumen total de agua del cuerpo, lo que supone que alcanza concentraciones intracelulares superiores. Su concentración en tejido prostático, bilis, pulmón, neutrófilos y macrófagos es superior a la concentración sérica.²⁰ Al igual que las cefalosporinas las quinolonas se pueden clasificar en generaciones:

1. Primera generación: ácido nalidíxico, ácido pipemídico.
2. Segunda generación: norfloxacin.
3. Tercera generación: ciprofloxacino, ofloxacino,
4. Cuarta generación: levofloxacino, moxifloxacino.

2.4.2 Espectro del antibiótico

Las fluoroquinolonas son muy eficaces contra casi todos los microorganismos aerobios Gram negativos, incluyendo muchos microorganismos resistentes a los β -lactámicos o a los aminoglucósidos. Su actividad contra los microorganismos Gram positivos suele ser moderada, pero es buena contra los estafilococos incluyendo al *Staphylococcus aureus*. Resistentes a la meticilina, y algunos estreptococos.²⁹

Otros estudios sugieren que ayudan a prevenir y seleccionar a los mutantes resistentes cuando las fluoroquinolonas se prueban a diferentes concentraciones en placa.

La concentración bactericida mínima (CBM) de las quinolonas es de 1-4 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI).²⁰

2.4.3 Mecanismo y sitio de acción

Las quinolonas son antibióticos bactericidas de acción rápida que inhiben la actividad enzimática de la subunidad alfa de la DNA girasa bacteriana, una topoisomerasa tipo II cuya acción es convertir el DNA “suelto” a su forma de super cadena; sin la girasa, el DNA bacteriano no puede ser replicado. La DNA girasa consiste en dos subunidades, subunidad alfa y la subunidad beta, las quinolonas afectan a la subunidad alfa. Un paso importante en el mecanismo de acción de las quinolonas es la formación de un complejo “Quinolona-Enzima-ADN” que contiene ADN roto. La unión de una quinolona a la ADN- girasa provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN responsable de la inhibición de la enzima. Además, la acción de la girasa es requerida para la replicación de plásmidos, de ahí que las fluoroquinolonas pueden reducir la resistencia mediada por plásmidos.(Figura 5) ^{12, 20, 44}

La acción específica sobre las topoisomerasas II y IV evita la catalización de reacciones de encadenamiento, anudamiento y enrollamiento. La creciente actividad antibacteriana de las fluorquinolonas, es que son inhibidores potentes de la síntesis de ácidos nucleicos, bloqueando la acción de la DNA girasa. ^{14,25,33,50}

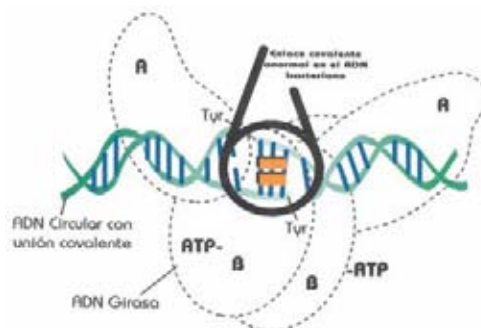


Figura 5. Mecanismo y sitio de acción de las quinolonas

2.4.4 Características de moxifloxacino

Moxifloxacino, (1-Ciclopropil-7-((S,S)-2,8-diazabicyclo[4,3,0]non-8-il)-6-fluoro-8-metoxi-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolona ácido carboxílico-hidroclorado)(figura.6) esta nueva fluoroquinolona (BAY 12-8039) fue sintetizado por los laboratorios Bayer AG (Ieverkusen, Alemania) y tiene las siguientes características químicas:

1. Peso molecular 437.9 g/mol
2. Apariencia material cristalino
3. Olor inodoro
4. Color sustancia amarilla
5. Sabor amargo
6. Punto de fusión aproximadamente a 250° C.
7. Solubilidad en agua (24 mg/ml a 25 ° C) y en HCl 0.1M (4.8mg/ml a 25°C).
8. Estabilidad en solución acuosa es estable y ligeramente estable en medio ácido, alcalino y a elevadas temperaturas.

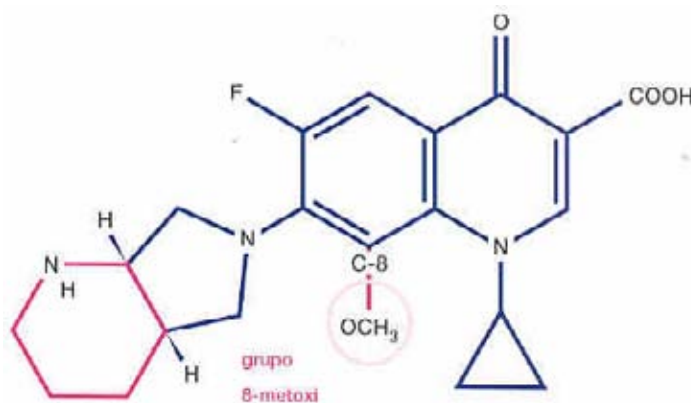


Figura 6. Estructura química de Moxifloxacino.

moxifloxacino, es una nueva fluoroquinolona con una amplia actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como contra anaerobios y patógenos atípicos, (microorganismos intracelulares como *Chlamydia*). También es eficaz frente a microorganismos resistentes a los beta-lactámicos y macrólidos y muy rara vez induce resistencia en condiciones experimentales. ⁴

En un estudio de ratones infectados por vía intravenosa con *M. tuberculosis*, se inició el tratamiento el día siguiente a la infección. La administración de clinafloxacinó careció de efecto contra *M. tuberculosis*, mientras que esparfloxacinó y moxifloxacino destruyeron el bacilo. La administración seis veces a la semana de los dos últimos medicamentos tuvo un efecto bactericida proporcional a la dosis, sin embargo, los resultados demostraron que moxifloxacino resultó ser más bactericida que la misma dosis de esparfloxacinó.^{4,30,38,45}

En otros estudios moxifloxacino fue comparada con otras fluoroquinolonas como ciprofloxacino, levofloxacino, esparfloxacinó, presentando mayor actividad para *M. tuberculosis-MDR*. Así como para otras micobacterias (*M. kansasii*, *M. avium-intracellulare*.) y micobacterias de rápido crecimiento (*M. fortuitum*.)^{21,38,45,47}

En pacientes HIV-seropositivos frecuentemente no toleran el régimen tradicional y las fluoroquinolonas pueden ser usadas como tratamiento alternativo.

2.5 Situación mundial de la tuberculosis.

Cada segundo, una persona en el mundo es infectada por el bacilo de la tuberculosis. Entre 5 y 10% de las personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*, pero no con el virus de la inmunodeficiencia adquirida, enferman o se hacen infectantes en alguna etapa de su vida.²⁸

Un tercio de la población mundial está ya infectada por *Mycobacterium tuberculosis* y cada año 8.8 millones de nuevos casos se producen de este reservorio de infectados, 1.9 millones de personas mueren de la enfermedad, los pobres y marginados en el mundo en desarrollo son los más afectados, cerca de 200,000 personas infectadas con el virus VIH murieron de tuberculosis en el 2005.¹³ Un 95% de casos y un 98% de defunciones por tuberculosis (TB), ocurren en los países de bajos recursos.⁴¹

La mayor incidencia y mortalidad de tuberculosis (TB), se localiza en el sur de Asia y África subsahariana, en el sur de Asia con una mortalidad del 33% y África con 29%.¹³(figura 7).

En México de acuerdo a la información proporcionada por el sistema Único de información para la vigilancia Epidemiológica, de la dirección General de epidemiología de la secretaria de salud, Hasta diciembre del 2005 se reportaron 16,336 casos siendo Veracruz el estado con mayor número de pacientes con tuberculosis, seguido de Baja California Norte, Tamaulipas, Guerrero y Chiapas. (sistema Nacional de Epidemiología 2005). A pesar de lo anterior está considerado como un país de prevalencia media de tuberculosis (TB), con un poco más de 15,000 casos nuevos de tuberculosis pulmonar, con una tasa descendente de morbimortalidad a partir de 1997 (datos de la Dirección General de

Epidemiología); sin embargo, los datos no concuerdan con aquéllos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en donde el subregistro puede llegar hasta el 40%, cuestión que ya ha sido analizada por Báez y colaboradores.⁴¹ Con este panorama general de la tuberculosis (TB) como problema de salud y sobre todo el incremento de cepas multidrogorresistente (MDR) es importante buscar nuevas alternativas de fármacos más eficaces.

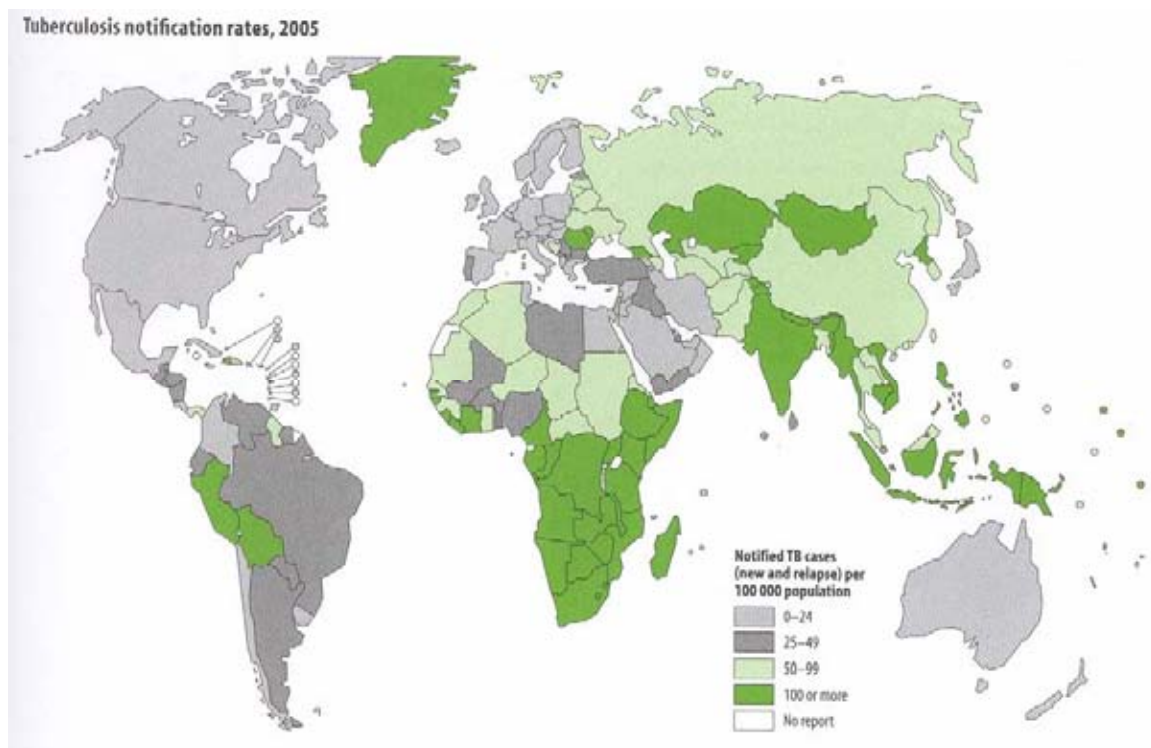


Figura 7. Tasas de notificación mundial de casos nuevos y recaídas de tuberculosis en el 2005 (por cada 100,000 habitantes).¹³

2.6 Multidrogorresistencia en el mundo y México

Evitar la selección de resistencia debe ser la primera y más importante indicación del tratamiento de la tuberculosis. Un enfermo con tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) es mucho más difícil y costoso de curar y es por ello que las instituciones de la salud deben tener presente las medidas básicas de los programas de control.

La realidad es que, a tan solo 50 años de la introducción de los primeros fármacos para el tratamiento de la tuberculosis, el uso indiscriminado de los mismos ha ocasionado que existan extensas zonas del mundo donde existe un elevado porcentaje de casos portadores tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR). Esto se define como aquellas cepas que son resistentes a isoniacida y rifampicina, fármacos de primera línea.

Se calcula que hay aproximadamente 300,000 casos de tuberculosis en el mundo con multirresistencia; En un estudio realizado con 17,690 muestras de 49 países, entre el 2000 y 2004, el 20% correspondió a tuberculosis multidrogorresistente. ²⁸

En México ha sido posible reducir la mortalidad por tuberculosis debido a la utilización de quimioterapia y a los programas para su prevención y control, que aseguran la administración de un tratamiento efectivo bajo la estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES). De esta manera en el 2002, la incidencia de tuberculosis pulmonar, reportada en nuestro país fue de 15.2 por 100,000 habitantes. ⁶

En México se registran anualmente entre 15 y 16,000 casos nuevos por año, con casi 2,400 muertes por año, con una prevalencia de tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) del 2.9% (390 casos).⁴¹

3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que constituye un problema de salud pública a nivel mundial ya que se ha estimado que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada. De acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que en 2005 hubo 8.8 millones de nuevos casos de tuberculosis, de los cuales 7.4 millones se localizan en Asia y África subsahariana. La tuberculosis causó la muerte de 1.6 millones de personas, entre ellas 195.000 infectadas por el Virus de la inmunodeficiencia Humana (VHI).^{13, 50,}

²⁷ Entre 1980 y 2005 se notificaron a la OMS más de 90 millones de casos de tuberculosis; entre 1995 y 2005 los programas de DOTS notificaron 26.5 millones de casos, y entre 1994 y 2004 registraron 10.8 millones de nuevos casos bacilíferos en tratamiento.¹³ La tuberculosis es la mayor fuente mundial de muertes por agente único, responsable de 7% de mortalidad y 26% de fallecimientos que pudieron evitarse. En México se reportan oficialmente cerca de 20,000 casos anuales, aunque se estima que otro tanto no están diagnosticados.³⁶

Se estima que cada caso infectante contamina a 10 sujetos por año, pero de éstos sólo 0 a 5% enferma, por predisposición genética o especial virulencia de la bacteria o inóculo.³⁶

La tuberculosis ha resurgido a consecuencia de diversos factores como son:

- 1) La pandemia causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1).
- 2) Las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas (MNT) ó MOTT por sus siglas en ingles.
- 3) La aparición de cepas multidrogorresistentes (MDR) como resultado de tratamientos incompletos.

4) Fallas en los programas de salud pública.^{12,15}

El problema de la tuberculosis no se limita solamente a la incidencia creciente sino a la aparición de cepas resistentes a los medicamentos antifímicos existentes y a la coinfección con el VIH-1.^{22,40} Es por ello que se buscan alternativas terapéuticas, como los macrólidos, roxitromicina, claritromicina y las fluoroquinolonas, las de mayor interés son ciprofloxacina y ofloxacina, las cuales no presentan resistencia cruzada con las drogas antituberculosas, la eficacia clínica es conocida, a pesar de que tienen limitada actividad bactericida y son las dos fluoroquinolonas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud como drogas de segunda línea. en el tratamiento de la tuberculosis multidrogorresistente^{5,27,50}

4. OBJETIVOS

4.1 Estandarizar la prueba de susceptibilidad de moxifloxacino en el medio 12B (Middlebrook 7H12), por el método radiométrico, BACTEC 460 TB.

- Utilizando las cepas de ATCC *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923. Los factores a considerar son: Tiempo de incubación y Temperatura de incubación.
- Estandarizar la prueba utilizando dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis*; resistente (H37Rv) y sensible, con comportamiento estable a diversas concentraciones de moxifloxacino.

4.2 Evaluar la actividad *in vitro* de la quinolona moxifloxacino, por el método radiométrico BACTEC 460 TB utilizando cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, sensibles y resistentes, aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias.

4.3 Determinar la reproducibilidad de esta prueba para, moxifloxacino y micobacterias por el método radiométrico BACTEC 460 TB.

5. HIPÓTESIS

- Moxifloxacino será estable en el medio líquido 12B para determinar la prueba de susceptibilidad.
- La prueba de susceptibilidad con moxifloxacino para *M. tuberculosis* se lograra estandarizar por el método radiométrico BACTEC 460 TB.
- Las cepas sensibles y resistentes a los antifimicos convencionales serán inhibidas por moxifloxacino en mas del 90% a concentraciones fácilmente adquiribles en suero y tejido.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Material

a) **Sal.** La sal pura, fue enviada por Bayer,AG. Con el nombre de BAY 12-8039.

b) **Medio de cultivo.**

- ❖ Frascos de medio liquido 12B, (medio Middlebrook – 7H12).
- ❖ Frascos con fluido diluyente, Se utiliza para hacer diluciones 1:100 del control de crecimiento durante los ensayos de susceptibilidad de medicamentos y contribuye a dispersar a las micobacterias durante la dilución.

c) **Reactivos.**

- ❖ Equipo para tinción de Gram.
- ❖ Equipo para tinción de Ziehl-Neelsen.
- ❖ Estándar para ajustar al 1.0 McF.

d) **Varios.**

- ❖ Equipo semiautomatizado BACEC 460 TB (Becton - Dickinson).
- ❖ Estufa (37°C con 5% CO₂).
- ❖ Campana de flujo laminar, Holten, clase II.

e) **Cepas de referencia.**

- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922*.
- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923*

- ❖ Control *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv sensible a todos los antifímicos y cepa control resistente (cepa silvestre que por su estabilidad se considera control).*

*Estas cepas son utilizadas en el laboratorio como control positivo en pruebas de susceptibilidad.

f) Aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

- ❖ Se incluyeron 105 cepas *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistente, obtenidas en el laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

6.2 Método

FASE I Determinar la estabilidad de moxifloxacino en el medio líquido 12B, utilizando el sistema BACTEC 460 TB

1. Preparación de la solución madre

- a) Se preparo la solución de moxifloxacino con agua desionizada estéril para obtener una concentración final de 1.280 mg/ml (solución madre**).
- b) De la solución madre se hicieron diluciones seriadas 1:2 para que al agregar 0.1 ml (100µl) de cada dilución a cada frasco con un volumen igual a 4.0 ml de medio líquido 12B (Middlebrook 7H12),

obteniendo las siguientes concentraciones finales de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 µg/ml.

** La concentración final fue preparada de acuerdo con las instrucciones de manufacturación.

2. Determinación de la estabilidad y de la actividad de moxifloxacino en el medio líquido (medio 12B) Middlebrook 7H12

Tomando en cuenta las características químicas de moxifloxacino y la metodología que se sigue para la realización de pruebas de susceptibilidad en el sistema BACTEC 460 TB, se realizaron pruebas para verificar la estabilidad de moxifloxacino en el medio 12B (Middlebrook 7H12), para esta prueba utilizamos dos cepas de ATCC, *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923.

Por otra parte, consideramos dos grupos de frascos con medio líquido 12B, cada uno con 10 frascos, (20 frascos en total para cada cepa), la mitad fueron preincubados por 7 días con la droga a diferente concentración y la otra mitad fueron inoculados con la droga en el momento de la realización de la prueba.

De los 10 frascos preincubados, 9 fueron inoculados con 0.1ml de cada una de las diferentes diluciones a probar, (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 µg/ml), el décimo frasco fue preincubado pero sin droga (frasco control). La preincubación se realizó con una temperatura igual a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Pasados los

7 días de incubación se hizo una suspensión bacteriana de cada cepa a probar (a partir de un cultivo de 24hr de incubación), esta suspensión bacteriana se ajusto al 0.5 de Mc Farland, para obtener una concentración final igual a 1×10^4 UFC/ml. De esta suspensión bacteriana se inoculo 0.1 ml a los 20 frascos (preincubados y sin incubar), para obtener un inóculo final de 1×10^3 UFC/ml. Los frascos que no fueron preincubados, antes de adicionar la suspensión bacteriana fueron inoculados con 0.1ml de cada una de las diluciones de la droga a probar. Una vez inoculados los 20 frascos de 12B, se metieron a incubar a 37°C, realizando antes una lectura basal en el sistema BACTEC 460 TB, considerando que el crecimiento de estas bacterias es más rápido que el *Mycobacterium tuberculosis*, se realizaron lecturas cada 2 h. hasta obtener un valor de GI ≥ 30 en nuestro frasco control y así obtener nuestra concentración mínima inhibitoria (CMI). Se considero como susceptible a la concentración cuya lectura fue menor a la de los frascos control.

Para *Escherichia coli* la concentración mínima inhibitoria, por este método fue de 0.0625 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para *Staphylococcus aureus* fue de 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Este resultado se obtuvo en los dos grupos de frascos (los preincubados y los no incubados).

En forma paralela se determino la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el método microdilución en placa recomendado por la NCCLS (Comité Nacional de Estándares para el Laboratorio Clínico de los Estados Unidos), siendo el resultado similar en ambos

microorganismos, esta prueba se realizó por duplicado para cada cepa, obteniendo los mismos resultados en ambas.

FASE II: Estandarización de la prueba de susceptibilidad a moxifloxacino por el método radiométrico BACTEC 460TB para *M. tuberculosis*

Una vez demostrada la estabilidad del moxifloxacino en el medio líquido 12B (Middlebrook 7H12) por 7 días a 37°C, se prosiguió a la realización de la prueba con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (sensible) y la cepa resistente que por su estabilidad es utilizada en el laboratorio como cepa control.

Para la realización de la prueba se utilizaron 10 frascos por cada cepa, estos frascos fueron estabilizados previamente (ensayados en el aparato sin inóculo tanto de suspensión bacteriana como solución de la droga esto se realizó con el fin de establecer en el frasco una atmósfera de CO₂ al 5% y eliminar aquellos frascos que den un valor de GI mayor de 20). Los frascos de medio líquido 12B (Middlebrook 7H12) con las diferentes concentraciones a probar de moxifloxacino, fueron preparados el mismo día que se realizó la prueba, es decir a cada frasco se le adiciono 0.1ml de cada dilución a probar de la droga y 0.1ml de suspensión bacteriana (aproximadamente al estándar de Mc Farland N°1, que tiene una concentración bacteriana igual a 3X10⁸ UFC/ml.) Una vez inoculados los frascos se incubaron a 37°C. Las lecturas se realizaron diariamente (cada 24 +/- 2 horas).

Lo antes mencionado se realizó como a continuación se comenta:

1. Preparación del inóculo (Mc farland al N°1) y obtención de nuestro primo cultivo

1. Cultivos de 3 semanas de incubación en medio sólido (Lowenstein – Jensen).
2. Con ayuda de un aplicador de madera estéril se tomo una pequeña cantidad de colonias del tubo,
3. Se transfirieron las colonias a un tubo estéril con tapón de rosca conteniendo de 4 a 5 perlas de vidrio y 6 a 7 gotas de agua estéril.
4. Las colonias fueron Homogeneizadas en un agitador de torbellino (vortex), hasta obtener una suspensión con un mínimo de aglutinaciones (la suspensión debe ser moderadamente turbia).
5. Se dejo reposar durante un mínimo de 30 minutos para permitir que sedimenten las partículas grandes.
6. Con una pipeta Pasteur se transfirió la suspensión homogénea sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y se ajusto la turbidez al estándar de Mc. Farland N°1, añadiendo mas agua estéril si era necesario.
7. Se realizó un frotis y se tiño por Ziehl – Neelsen, y por rotación se sembró una gota de la suspensión anterior en agar sangre de carnero para asegurarnos que el cultivo no estuviera contaminado.
8. De la suspensión bacteriana obtenida se tomaron 0.1ml con una jeringa de insulina y se inoculo un frasco de medio líquido 12B, previamente rotulado con número de cepa y fecha. Se incubo a 37°C y se realizaron lecturas cada 24+/- 2 horas en el BACTEC 460 TB, hasta obtener un GI con una lectura entre 500 y 999, estos valores son dados por la concentración de CO₂ producida por el metabolismo, durante el crecimiento de las micobacterias, donde se considera

que se tienen al menos 1,000,000 UFC/ml. Esto constituyo nuestro primo cultivo.

2. Realización de la prueba de susceptibilidad

1. Se rotularon los frascos adecuadamente (concentración correspondiente, número de cepa y fecha)
2. Se limpio el tapón con un algodón impregnado en alcohol al 70%.
3. Se inoculo en cada frasco 0.1ml de cada dilución de moxifloxacino.
4. Se inocularon 0.1ml del primo cultivo previamente homogeneizado con la misma jeringa de insulina.
5. Una vez inoculada la serie de frascos se limpio el tapón con un algodón impregnado de solución de fenol al 5%.
6. Se incubaron los frascos a 37°C por 24 horas, realizando lecturas diarias en el equipo BACTEC 460 TB.
7. Para el frasco control se realiza una dilución de 1:100, transfiriendo 0.1ml del primocultivo a un frasco que contiene 9.9 ml. de un fluido diluyente, (PBS tween 20, este fluido de dilución no contiene sustancias que tengan en su molécula al elemento carbono, esto es para que no haya competencia con el carbono marcado del medio líquido de 12B). Después de mezclar completamente (invirtiendo el frasco un mínimo de diez veces), Se inocularon 0.1ml de esta dilución en el frasco control de medio liquido 12B, este frasco no contiene medicamento.

3. Interpretación de las lecturas:

Estos ensayos se realizaron por duplicado y se determinó como susceptible cuando la diferencia de lecturas de un día a otro en el frasco control era mayor a la diferencia de lecturas de un día a otro de cada frasco con las diferentes concentraciones de la droga. Para aplicar este criterio la lectura del frasco control debe tener un GI mayor de 30.

Los resultados de la estandarización con las cepas control de *Mycobacterium tuberculosis* (sensible y resistente) mostraron que las concentraciones mínimas inhibitorias con moxifloxacino se encontraban entre 0.125 y 0.5 µg /ml por lo que se decidió determinar la susceptibilidad de las 105 cepas, con las siguientes concentraciones de 2,1,0.5,0.25,0.125 y 0.0625 µg /ml. de moxifloxacino.

FASE III: Determinar la actividad de moxifloxacino por el sistema radiométrico BACTEC 460TB y reproducibilidad de la prueba de susceptibilidad

1.- Determinar la actividad de “moxifloxacino” en el medio líquido BACTEC 12B contra 105 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, resistentes y sensibles, obtenidas en el laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Para la realización de la fase II trabajamos con 105 cepas provenientes de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias, dichas cepas tenían diferente patrón de sensibilidad. El procedimiento realizado fue igual a lo

mencionado anteriormente (Fase I), las muestras se aislaron de cultivos sólidos de Lowenstein – Jensen, se sembraron en el medio líquido 12B realizando una suspensión aproximadamente al 1.0 de Mc. Farland, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, realizando lecturas diariamente hasta obtener un GI entre 500 y 999 (se considera se tiene al menos 1000,000 micobacterias por ml.)

Posteriormente se prosiguió a la realización de las pruebas de sensibilidad (ver anteriormente Fase I), tomando el rango de concentración de moxifloxacino entre 2.0 µg/ml - 0.0625 µg/ml.

2.- Reproducibilidad de la prueba de susceptibilidad por el método radiométrico BACTEC 460 TB

Las 105 cepas fueron probadas por duplicado para comprobar la reproducibilidad del método y se calculó el coeficiente de variación tomando el total de pruebas realizadas dividiendo el número de discrepantes entre el total de pruebas.

La detección de susceptibilidad a los antituberculosos primarios, se efectuó de acuerdo a las indicaciones del fabricante del BACTEC 460TB con una concentración específica de cada droga antituberculosa:

estreptomicina 6µg/ml, isoniacida 0.1µg/ml, rifampicina 2µg/ml y etambutol 7.5µg/ml.

La resistencia a pirazinamida se determinó detectando la producción de la enzima pirazinamidasa, de esta forma, las cepas productoras de la enzima son consideradas susceptibles.

7. RESULTADOS

FASE I: Estabilidad.

- Cepas de ATCC :

1.-*Escherichia coli* ATCC 25922

2.-*Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

- Variables a considerar :

1.-Temperatura de incubación

2.-Tiempo de incubación

3.-Composición del medio.

En esta etapa, lo primero fue saber que moxifloxacino, no se inactivara una vez que se utilizara la sal de acuerdo al método propuesto por el sistema BACTEC 460 TB, para pruebas de sensibilidad. El tiempo de incubación, temperatura y la composición del medio no afectaron la actividad de moxifloxacino. A demás fue importante controlar el tiempo de lectura, ya que se considero el tiempo de generación de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y por lo tanto las lecturas se realizaron cada 2 horas hasta que el frasco control nos diera un valor de GI ≥ 30 y poder determinar así la concentración mínima inhibitoria (MIC). (Tabla 1)

Tabla 1.- Resultados del MIC de moxifloxacino con las cepas control de ambos grupos.

Grupo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
Preincubados	0.25 µg/ml.	0.0625µg/ml
Sin Incubación	0.25µg/ml	0.0625µg/ml

Como se observa la concentración mínima inhibitoria de moxifloxacino (MIC) obtenida en ambos grupos es la misma. Estos resultados se validaron con un método estándar propuesto por la NCCLS para la realización de pruebas de sensibilidad en microplaca, obteniendo los siguientes resultados.

Staphylococcus aureus MIC=0.25 µg/ml.

Escherichia coli MIC=0.0625 µg/ml.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) que se obtuvo en BACTEC 460 TB vs el método estandarizado fue la misma para cada cepa.

FASE II: Estandarización de la prueba de susceptibilidad.

Los resultados obtenidos con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y MTB-MDR (cepa Salvaje) se presentan en la tabla 2. Como se observa, la concentración mínima inhibitoria (MIC) para ambas cepas fue igual a 0.5 µg/ml, este ensayo se realizó por duplicado para cada cepa. Pfyffer et al en un estudio multicéntrico

evaluando a drogas de segunda línea con nuevos fármacos, reporta las siguientes concentraciones mínimas de inhibición, para ciprofloxacino $\leq 0.5-2.0\mu\text{g/ml}$ y ofloxacino $\leq 0.5-4.0\mu\text{g/ml}$.¹¹

Una vez conocido el MIC se determinaron las condiciones de trabajo así como las concentraciones que se utilizarían en la parte III de nuestro análisis. (tabla 2)

Tabla 2.- Resultados del MIC de las cepas control (*Mycobacterium tuberculosis* sensible y resistente). Utilizando el sistema BACTEC 460 TB

Cepas control de Mtb	Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$).	
	1er ensayo	2do. ensayo
<i>M.tuberculosis</i> H37Rv. (cepa sensible)	0.5 $\mu\text{g/ml}$.	0.5 $\mu\text{g/ml}$
<i>M.tuberculosis</i> . (cepa resistente)	0.5 $\mu\text{g/ml}$.	0.5 $\mu\text{g/ml}$

De acuerdo a lo anterior decidimos ajustar el rango de diluciones a ensayar en la parte III. (tres menores a 0.5 $\mu\text{g/ml}$. y tres mayores a esta dilución.)

FASE III Determinación de la actividad de moxifloxacino por el método BACTEC 460 TB y reproducibilidad de la prueba.

Durante este periodo se recuperaron 105 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, provenientes de pacientes de consulta externa y hospitalizados.

El 99% de las cepas fueron aisladas de muestras clínicas del tracto respiratorio, (muestras de expectoración) y el 1% se aisló de una muestra de orina, las

muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Las cepas que se utilizaron provenían de pacientes a los cuales se les había solicitado prueba de sensibilidad a las drogas de primera línea. tabla 3.

Tabla 3.-Susceptibilidad antimicrobiana de 105 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes del INER.

Agente antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$).	Cepas resistentes n(%)
Ninguna	48 (45.7)
Rifampicina (2.0 $\mu\text{g/ml}$)	50 (47.6)
Isoniacida (0.1 $\mu\text{g/ml}$)	52 (49.5)
Estreptomina (6.0 $\mu\text{g/ml}$)	29 (27.6)
Etambutol (7.5 $\mu\text{g/ml}$)	18 (17.1)
Pirazinamida (0.01 $\mu\text{g/ml}$)	32 (30.4)

La tabla anterior nos muestra la resistencia que presentaban nuestras cepas a los antimicrobianos de primera línea, de estas 105 cepas 48 (47.7%) son sensibles y el 57 (54.2%) son resistentes a uno o más de los antimicrobianos. Tomando los criterios para establecer multidrogorresistencia,³⁰ de estas 57 cepas solo 47 (44.7%) fueron resistentes a isoniacida y rifampicina y solo 10 cepas (9.5%) fueron resistentes a una o más drogas excepto rifampicina e isoniacida.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), a moxifloxacino se efectuó por duplicado en las 105 cepas, los resultados fueron iguales en su mayoría, existiendo discordancia sólo en 13 determinaciones, esta discordancia fue de una concentración a la siguiente. (Tabla 4)

Como se observa en la tabla 4; 13% de las cepas fue inhibida a una concentración de 0.125 µg/ml., 43% a 0.25 µg/ml. y 38% a 0.5 µg/ml. Esto nos dice que el 94% de las cepas se inhibieron entre 0.125 y 0.5 µg/ml. y solo un 1% presento una inhibición menor y un 5% igual o mayor a 2.0 µg/ml.

Del 5%, solo 2 cepas presentaron una inhibición mayor de 8.0 µg/ml., estas cepas se obtuvieron de pacientes que tuvieron tratamiento previo con otras quinolonas.

En 8 de las pruebas discordantes la MIC se encontró entre 0.5 µg/ml y 0.25 µg/ml y en 5 entre 0.125 µg/ml y 0.25 µg/ml, teniendo un coeficiente de variación de 12.5%, no existiendo errores mayores ni críticos, es decir, la discordancia fue de una sola concentración y siempre fue a concentraciones bajas.

Tabla 4.- Resultados del MIC de las 105 cepas de *M. tuberculosis* ensayadas con moxifloxacino.

Combinación de drogas	Concentración mínima Inhibitoria (µg/ml).								Total
	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	8	»8.0	
Ninguna	0	8	23	17	0	0	0	0	48
RIF	0	0	1	1	0	0	0	0	2
HIN	0	1	2	0	0	0	0	0	3
SM	0	0	1	1	0	0	0	0	2
HIN-RIF	0	1	3	7	0	0	0	0	11
HIN-SM	0	0	0	2	0	0	0	0	2
HIN-RIF-SM	0	1	1	1	0	1	0	0	4
HIN-RIF-PZ	0	1	2	3	0	0	0	0	6
HIN-RIF-SM-EMB	0	1	0	0	0	0	0	0	1
HIN-RIF-SM-PZ	1	0	5	3	0	0	0	0	9
HIN-RIF-EMB-PZ	0	0	2	3	0	0	0	1	6
RIF-EMB-SM-PZ	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HIN-RIF-PZ-EMB-SM	0	1	5	1	0	2	0	1	10
TOTAL (%)	1(1)	14(13)	45(43)	40(38)	03(3)	02(2)	0	2(2)	105

RIF(Rifampicina), HIN(Isoniacida), EMB(Etambutol), SM(Estreptomicina) y PZ(Pirazinamida).

La tabla 5 Nos representa de una manera más simple los puntos de corte de las 105 cepas con respecto a las diferentes concentraciones de moxifloxacino

Tabla 5. Resultado del MIC de las 105 cepas con respecto a su sensibilidad.

Concentración de moxifloxacino (µg/ml)								
Cepas de M.tb	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	8.0	>8.0
Sensibles.	0	8	23	17	0	0	0	0
Monorresistentes	0	1	4	2	0	0	0	0
MDR.	1	5	18	21	0	3	0	2

Se observa que el mayor número de cepas se inhibió entre 0.125 – 0.5 µg/ml.

El MIC₅₀ y el MIC₉₀ de moxifloxacino se muestra en la tabla 6; como se observa el MIC₅₀ y el MIC₉₀ fue de 0.25µg/ml y 0.5µg/ml, respectivamente. Estos valores fueron determinados por duplicado y solo 13 cepas presentaron una discrepancia de una dilución a otra.

Tabla 6.- Resultados del MIC₅₀ y MIC₉₀ en las 105 cepas.

Patrón de susceptibilidad	cepas (n)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
Sensibles	48	0.25	0.5
Monorresistentes	7	0.25	0.5
MDR	50	0.5	0.5
Total	105	0.25	0.5

8. DISCUSIÓN

La tuberculosis es un problema mundial de salud que dista de encontrarse bajo control, ya que el surgimiento de cepas multirresistentes ha impedido lograr limitar la transmisión de la enfermedad y la aparición de nuevos casos. La coinfección que hay con el virus de la inmunodeficiencia adquirida, la pobreza, el hacinamiento, así como el aumento de infecciones por micobacterias atípicas, nos obliga a la búsqueda de antibióticos que sean cada vez más efectivos para el tratamiento.^{43,44} La quimioterapia actual para cepas sensibles, consiste en el uso de 3 o 4 drogas (isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol ó estreptomicina, las cuales se administran en dos fases, la inicial (2 meses) y la de sostén (4 meses).³⁴ El tiempo y la dosis de estos fármacos hace que con frecuencia el paciente abandone el tratamiento, lo cual resulta en el fracaso al tratamiento primario y crea cepas sensibles en resistentes. Es por eso que las industrias farmacéuticas invierten en la búsqueda de nuevos fármacos que tengan actividad sobre este tipo de micobacterias, que es una de las medidas necesarias para el control de la enfermedad.

En este estudio incluimos más del 50% de cepas resistentes a al menos a uno de los antifímicos primarios, aún cuando la frecuencia de resistencia de esta serie de cepas no representa la frecuencia de resistencia en la población de pacientes con este padecimiento, si implica una frecuencia elevada de resistencia a antifímicos primarios en la población que se atiende en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, que es un centro de referencia nacional para este padecimiento.

Algunos compuestos ya han sido utilizados en ensayos clínicos humanos, mientras que otros tan solo han sido experimentados en animales o en ensayos in vitro. Un primer grupo importante, ampliamente estudiado y utilizado son los derivados de las Rifamicinas y el segundo grupo lo constituyen los derivados de las fluoroquinolonas, algunos macrólidos, las oxazolidinonas, y los nitroimidazoles. La familia de las rifamicinas presenta resistencia cruzada, por lo tanto cuando se presenta resistencia a rifampicina ya no pueden ser utilizados. En cuanto a los demás las fluoroquinolonas principalmente ciprofloxacino y ofloxacino, actúan al mismo nivel y no presentan resistencia cruzada con los fármacos antituberculosos³. La eficacia clínica para el tratamiento de micobacterias de ciprofloxacino y ofloxacino es conocida, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las recomienda como drogas de segunda línea para el tratamiento de pacientes con tuberculosis multidrogorresistente.^{5,27,44} En el presente estudio se probó una quinolona, moxifloxacino, donde las condiciones que se requirieron para realizar la prueba de susceptibilidad con el método BACTEC 460 TB, no alteraron su actividad antimicrobiana. Ya que los resultados obtenidos con las cepas control *Staphylococcus aureus* ATCC y *Escherichia coli* ATCC fueron los mismos que se obtuvieron al realizar la prueba de susceptibilidad por un método estandar, tabla2. Dicha droga se probó su actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* con cepas control sensible y resistente. Se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (MIC) igual a 0.5 µg/ml. en ambos grupos. Pfyffer et al. realizaron un estudio multicentrico utilizando el Bactec 460 TB y un medio sólido como referencia, en este trabajo se reportaron las siguientes concentraciones ≤ 0.5 –2.0 µg/ml para

ciprofloxacino y $\leq 0.5 - 4.0 \mu\text{g/ml}$ para ofloxacino en cepas sensibles.¹¹ Heiffes et al. Reportan un rango de MIC para ciprofloxacino $0.25 - 2.0 \mu\text{g/ml}$ y para ofloxacino $0.25 - 2.0 \mu\text{g/ml}$.²³ Y el NCCLS sugiere los siguientes criterios de interpretación, susceptible $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$, moderadamente susceptible $2.0 \mu\text{g/ml}$ y resistente $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ y por lo tanto $\leq 2.0 \mu\text{g/ml}$ se considera susceptible. Dicho lo anterior concluimos que esta nueva quinolona podía ser utilizada con un grupo mayor de cepas tanto (sensibles y resistentes). En la tercera parte del presente trabajo, el 94% de las cepas ensayadas con moxifloxacino presento un MIC entre $0.25 - 0.5 \mu\text{g/ml}$. El 50% de las cepas presento un MIC igual a $0.25 \mu\text{g/ml}$ y para el 90% de las cepas el MIC fue de $0.5 \mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos con moxifloxacino muestran que la mayoría de las cepas son susceptibles a concentraciones fácilmente obtenibles en tejido pulmonar, aún aquellas resistentes a todos los antifímicos primarios, mostraron ser susceptibles a bajas concentraciones de moxifloxacino. Solo 4 de las cepas probadas requirieron concentraciones mayores a $0.5 \mu\text{g/ml}$ para inhibir su crecimiento y solo dos de ellas, concentraciones mayores de $2 \mu\text{g/ml}$. Estas dos cepas correspondieron a pacientes que habían recibido fluoroquinolonas para el tratamiento de su padecimiento, por lo que probablemente desarrollaron resistencia.

El método BACTEC 460 TB mostró ser reproducible en la determinación de la susceptibilidad cuantitativa de moxifloxacino en *Mycobacterium tuberculosis*, dando por resultado al analizar la determinación por duplicado, un coeficiente de variación aceptable para este tipo de pruebas, no representándose errores críticos ni mayores.

De acuerdo a nuestros valores y comparando con otros estudios moxifloxacino puede ser una nueva alternativa que en combinación con otras drogas de segunda línea, sirva para el tratamiento de pacientes con tuberculosis Multidrogorresistentes (MDR-TB).

9. CONCLUSIONES

- ❖ La temperatura de incubación, el tiempo de incubación y la composición del medio líquido 12B para cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, no cambian las características químicas y la actividad de moxifloxacino.
- ❖ La determinación del CMI en cepas *Mycobacterium tuberculosis* para moxifloxacino es confiable por el método radiométrico BACTEC 460 TB.
- ❖ Moxifloxacino in vitro tiene buena actividad contra cepas sensibles y cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.
- ❖ El 95.2% de las cepas de *M. tuberculosis* fueron inhibidas por moxifloxacino a una concentración menor o igual a 0.5 µg/ml.
- ❖ Solo cinco cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, presentaron resistencia a moxifloxacino.

10. APÉNDICE

TINCIÓNES

a) Zhiel – Neelsen

Composición:

❖ Carbofucsina:

○ Fenol (cristales)	2.5g
○ Alcohol, 95 %	5.0ml
○ Fucsina básica	0.5g
○ Agua destilada	100ml

❖ Alcohol ácido(3%):

○ HCL	3.0ml
○ Alcohol, 70%	100ml

❖ Azul de metileno:

○ Azul de metileno	0.5g
○ Acético glacial	0.5ml
○ Agua destilada	100ml

Fundamento:

Los bacilos acidorresistentes se denominan así por estar rodeados de una envoltura cerosa resistente a la tinción. Se requiere calor o un detergente (Tergitol) para que el colorante penetre a través de la cápsula. Una vez teñidas, las bacterias acidorresistentes resisten la decoloración, en tanto que las otras bacterias se decoloran con el alcohol ácido.

Procedimiento:

- Se coloca una gota de solución salina sobre la superficie de un porta objetos
- Se coloca con ayuda de un aplicador una colonia característica de micobacterias
- Homogeneizar la colonia en la gota de solución salina.
- Se deja secar a temperatura ambiente y posteriormente se fija al calor.
- Se cubre la superficie del porta objetos con Carbolfucsina.
- Se calienta con una lámpara de alcohol por la parte de abajo por 8 minutos.
- Se deja enfriar, y se enjuaga con agua de la llave.
- Se decolora con el alcohol ácido hasta que deje de salir colorante.
- Se coloca el azul de metileno por un minuto.
- Enjuagar con agua de la llave.

b) Kinyoun

Composición:

❖ Carbofucsina:

○ Fenol (cristales)	9g
○ Alcohol, 95 %	20ml
○ Fucsina básica	4g
○ Agua destilada	100ml
○ Tergitol N°7	5-6 gotas

❖ Alcohol ácido(3%):

○ HCL	3.0ml
○ Alcohol, 95%	100ml

❖ Azul de metileno:

○ Azul de metileno	0.5g
○ Acético glacial	0.5ml
○ Agua destilada	100ml

Fundamento:

Los bacilos acidorresistentes se denominan así por estar rodeados de una envoltura cerosa resistente a la tinción ácida. Se requiere calor o un detergente (Tergitol) para que el colorante penetre a través de la cápsula. Una vez teñidas,

las bacterias acidorresistentes resisten la decoloración, en tanto que las otras bacterias se decoloran con el alcohol-ácido.

Procedimiento:

- Se coloca una gota de solución salina sobre la superficie de un porta objetos
- Se coloca con ayuda de un aplicador una colonia característica de micobacterias
- Homogeneizar la colonia en la gota de solución salina.
- Se deja secar a temperatura ambiente y posteriormente se fija al calor.
- Se cubre la superficie del porta objetos con Carbofucsina.
- Dejar 5 minutos con el colorante, no calentar.
- Enjuagar con agua de la llave.
- Se decolora con el alcohol ácido hasta que deje de salir colorante.
- Se coloca el azul de metileno por un minuto.
- Enjuagar con agua de la llave.

c) Fluorocrómica (Técnica de Truant)

Composición:

❖ Auramina féenolica:

○ Auramina O	0.1g
○ Etanol, 95 %	10mL
○ Fenol	3g
○ Agua destilada	87mL

❖ Alcohol ácido(3%):

○ HCL	0.5mL
○ Alcohol, 70%	100mL

❖ Permanganato de potasio:

○ K_2HPO_4	0.5g
○ Agua destilada	100mL

Fundamento:

Los bacilos acidorresistentes se denominan así por estar rodeados de una envoltura cerosa resistente a la tinción ácida. Se requiere calor o un detergente (Tergitol) para que el colorante penetre a través de la cápsula. Una vez teñidas, las bacterias acidorresistentes resisten la decoloración, en tanto que las otras bacterias se decoloran con el alcohol-ácido.

Procedimiento:

- Se coloca una gota de solución salina sobre la superficie de un porta objetos
- Se coloca con ayuda de un aplicador una colonia característica de micobacterias
- Homogeneizar la colonia en la gota de solución salina.
- Se deja secar a temperatura ambiente y posteriormente se fija al calor.
- Se cubre la superficie del porta objetos con solución de Auramina - Rodamina
- Dejar 15 minutos con el colorante.
- Enjuagar con agua estéril.
- Se decolora por 2 minutos con el alcohol-ácido.
- Enjuagar con agua estéril
- Volver a decolorar por 2 minutos con el alcohol-ácido.
- Enjuagar con agua estéril.
- Se coloca el permanganato.
- Enjuagar con agua estéril.
- Dejar secar y observar en un microscopio de luz ultra violeta y en un cuarto oscuro.

d) Tinción de Gram:

Cristal violeta:

- Cristal violeta 2.0g
- Etanol,95% 30ml.
- Oxalato de HN4 0.8g.
- Agua destilada 100ml.

❖ Yodo de gram:

- Yoduro de potasio 2.0g.
- Yodo, cristales 1.0g.
- Agua destilada 100ml.

❖ Decolorante:

- Acetona 50ml.
- Etanol, 95% 50ml.

❖ Contracolor:

- Safranina 2.5ml.
- Etanol, 95% 100ml.
- Agua destilada 100ml.

Fundamento: Coloración diferencial utilizada para demostrar las propiedades tintoriales de todos los tipos de bacterias.

Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta tras la decoloración y aparecen de color azul intenso.

Las bacterias Gram negativas no son capaces de retener el cristal violeta tras la decoloración y se contra colorean de color rojo con la safranina.

Las características de la coloración de Gram pueden ser atípicas en cultivos muy jóvenes, viejos, muertos o en degeneración.

Procedimiento:

- ❖ Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar al aire.
- ❖ Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el porta objetos 3 o 4 veces por la llama de un mechero de Bunsen.
- ❖ Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
- ❖ Luego de un minuto de exposición al cristal violeta, lavar bien con agua destilada.
- ❖ Cubrir el preparado con yodo de Gram durante un minuto. Lavar nuevamente con agua.
- ❖ Decolorar con el alcohol acetona hasta que no salga colorante violeta.
- ❖ Lavar con agua corriente.
- ❖ Colocar la safranina por un minuto y volver a enjuagar con agua corriente.
- ❖ Dejar secar y observar.

PRUEBAS BIOQUIMICAS

a)Acumulaciòn de Niacina

Todas las micobacterias forman niacina como un derivado metabòlico, pero la mayor parte de las especies posee una enzima que convierte la niacina libre en ribonucleòtido de niacina *M. tuberculosis*, *M. simiae*, cepas ocasionales de *M. marinum* y *chelonei*, Asi como un numero de cepas de *M. bovis*, carecen de esta enzima y acumulan niacina como un derivado soluble en agua en el medio de cultivo. La cantidad de niacina presente en un cultivo inclinado es, en parte, reflejo del numero de colonias presentes en el tubo asi como la edad del cultivo.

Principio : El àcido nicotìnico reacciona con bromuro de cianògeno en presencia de una amina primaria (anilina) para formar un compuesto colorido.

Reactivos :

- Bromuro de cianògeno !0%.
- Bencidina.
- Soluciòn de NaOH al 4%.

Procedimiento :

- Adicionar 2ml de agua destilada estèril a un cultivo positivo de 4 semanas.
- Incubar a 37^aC por 30 minutos.
- Colocar 0.5 ml del extracto aun tubo de ensaye
- Añadir 0.5 ml de Bencidina

Reactivos :

- Solución amortiguadora de fosfatos M/15 pH 7
- Peróxido de Hidrógeno al 30%.
- Solución acuosa de Tween 80 al 10% Calentar ligeramente el agua para obtener mejor disolución. Conservar en refrigeración.

Procedimiento :

- En un tubo de 12 x 100 mm, colocar 0.5 ml de la solución amortiguadora pH 7.
- Agregar a cada tubo el contenido de una asa cargada de colonias. Colocar el tubo a baño María a 68°C durante 20 minutos.
- Retirar y enfriar a temperatura ambiente.
- Preparar una mezcla en partes iguales de la solución de Tween y el peróxido de hidrógeno y agregar 0.5 mL de este reactivo a cada tubo. Esta mezcla debe ser preparada en el momento de ser usada.

Lectura e interpretación : La formación de burbujas en la superficie se considera como resultado positivo. Si no hay burbujas, dejar en observación 20 minutos antes de informar un resultado como negativo.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A PIRAZINAMIDA.

(Método Wayne)

Se realiza la prueba de sensibilidad por el método de las proporciones, el medio de Lowenstein – Jensen debe ser acidificado a pH 5 antes de coagularlo. Con La pirazinamida (PZ) es una sustancia activa en pH ácido, por lo tanto si ese pH, el crecimiento de *M. tuberculosis* es lento y difícil, y algunas cepas no alcanzan a desarrollar. Por otra parte, si el pH es mayor de 5.5, la pirazinamida no es activa y la prueba daría un resultado de resistencia falso.

Fundamento:

Las cepas de *M. tuberculosis* que son sensibles a la pirazinamida poseen la enzima pirazinamidasa que metaboliza la pirazinamida en ácido pirazinoico. Las cepas pirazinamida resistentes han perdido su actividad de pirazinamidasa. Este método pone de manifiesto la presencia del ácido pirazinoico por la formación de una sal ferrosa de color de rosa.

Reactivos:

a) Agar:

- | | |
|-------------------------------|--------|
| • Caldo deshidratado de Dubos | 6.5g |
| • Agua destilada | 1000ml |
| • Disolver | |
| • Pirazinamida | 100mg |
| • Piruvato de sodio | 2g |
| • Agar | 15g |

Calentar la mezcla hasta fundir el agar,

Distribuir en volúmenes de 5ml en tubos de tapa de rosca (16 x125mm).

Esterilizar a 15 libras durante 15 min. y dejar solidificar los tubos en posición vertical.

b) Solución de sulfato ferroso amoniacal en agua destilada al 1%.

MAC FARLAND #1.

Patrón turbidimétrico para ajustar las suspensiones bacilares de la cepa en estudio. Tiene una turbidez semejante a la de una solución de 1 mg de masa bacilar suspendida en 1 ml de agua destilada y consiste en una solución de sulfato de bario (Ba_2SO_4) preparada de la siguiente manera:

- Solución acuosa de cloruro de bario al 1% 0.1ml
- Solución acuosa de ácido sulfúrico al 1% 9.9 ml

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **A.I. De la Iglesia y H.R.Morbidoni.** Mecanismos de acción y de resistencia e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: Nueva Información sobre viejos conocidos. Revista Argentina de Microbiología, Ene 2006;38(2):1-18
2. **Alfonso Velasco Martín, Pedro Lorenzo Fernández, José Serrano.** Farmacología Velásquez. Editorial Interamericana. 2ª edición.901-912pp.
3. **Alfred P. Fishman, MD.** Tratado de neumología. Editorial Doyma.1991,2ª edición,1661-1746.
4. **Baohong JI, Nacer Lounis, Caroline Maslo, Chantal Truffot-Pernot, Pascale Bonnafous, and Jacques Grosset.** In vitro and In Vivo Activities of Moxifloxacin and Clinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug 1998;42(8):2066-2069.
5. **Camirero Luna José A.** Guía de la tuberculosis para Médicos Especialistas, UICTER, febrero 2003.
6. **Castillejos-López MJ, Pérez-Padilla R, Quiñónez-Falconi F, et al.** 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.Méx.2006;Vol9(1).
7. **Christine H. Fenlon and Michael H. Cynamon.** Comparative In Vitro Activities of Ciprofloxacin and Other 4-Quinolone against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Mar 1986;29(3):386-388.

8. **Davis B.D., Dulbecco R., et al.** Tratado de microbiología, ed. Salvat, tercera edición, Buenos Aires, 1985, 589-604.
9. **Elmer W. Koneman, M.D. et al.** Diagnóstico microbiológico, Medica Panamericana, 3ª edición, Buenos Aires, 1992, 621-655.
10. **Fernando Cano Valle., Carlos Ibarra Pérez., José Morales Gómez.** Enfermedades respiratorias, temas selectos. Editorial Elsevier. 2006, 1ª edición, 101-114pp.
11. **Gaby E. Pfyffer, Donald A. Bonato, Adeleh Ebrahimzadeh, Wendy Gross Jacqueline Hotaling, John Kornblum, Adalbert Laslo, Glenn Roberts, Max Salfinger, Frankiska Wittwer, and Salman Siddiqi.** Multicenter Laboratory Validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against Classical Second – Line and newer Antimicrobial Drugs by Using The Radiometric Bactec 460 Technique and proportion Method with Solid Media. Journal Of Clinical Microbiology, Oct 1999; Vol 37(10):3179-3186.
12. **George J. Alangaden, Elias K. Manavathu, Sergei B. Vakulenko, Nikolai M. Zvonok and Stephen A. Lerner.** Characterización of Fluoroquinolone – Resistant Mutant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Selected in the Laboratory and Isolated from Patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug. 1995; Vol 39(8):1700-1703.
13. **Global tuberculosis control:** surveillance, planning, financing. WHO Report, 2007. Geneva, World health organization.
14. **Goodman GA, Goodman.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. 7ª edición, editorial Panamericana, México, 1985. 1047-1064.

- 15. Guadalupe del Carmen Álvarez Gordillo, José Eugenio Dorantes Jiménez y Dolores Molina Rosales.** La búsqueda de atención para la tuberculosis en Chiapas, México. *Rev Panam Salud Pública*, 2001;9(5):285-291.
- 16. H.S.Thangaraj, O. Adjei, B.W.Allen, F.Portaels, M.R.W. Evans, D.K.Banerjee and M.H..Wansbrough-jones.** In vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000;45:231-233.
- 17. J. Douglas Gay, Donald R. de Young, and Glenn D. Roberts.** In Vitro Activities of Norfloxacin and Iprofloxacin Against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* Complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, and *M. kansasii*, *antimicrobial Agents And Chemotherapy*, July 1984;26:94-96.
- 18. J.A. García-Rodríguez.** Activity of Quinolones against Mycobacteria ("in vitro and in vivo"), *Quinolones Bulletin*, October 1988.
- 19. Joan Fung-Tomc, Beatrice Minassian, Benjamin Kolek, Thomas Washo, Elizabeth Huczko and Daniel Bonner.** In vitro antibacterial spectrum of a new broad-spectrum 8-methoxy fluoroquinolone, gatifloxacin; *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 2000;45:437-446.
- 20. Juan Ignacio Alòs.** Quinolones; *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21(5):261-268.
- 21. Lanfranco Fattorini, Dejiang Tan, Elisabetta Iona, Maurizio Mattei, Federico Giannoni, Lara Brunori, Simona Recchia, and Graziella Orefici.** Activities of Moxifloxacin Alone and in Combination with Other

Antimicrobial Agents against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Balb/c Mice; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Jan 2003.360-362.

22. Laura J.V. Piddock and Vito Ricci. Accumulation of five Fluoroquinolones by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001;48:787-791.

23. Leonid B. Heifets. M.D., Ph.D., Sc.D., Drug Susceptibility in the Chemotherapy of Mycobacterial Infections, CRC, London, 1991.

24. Manual de procedimientos de laboratorio INDRE / SAGAR: 18 Tuberculosis. Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Organización Panamericana de la Salud, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Primera edición, junio 1996.

25. María Jesús Ruiz-Serrano, Luìs Alcalá., Lucìa Mtz, Marisol Dìaz, Mercedes Marín, María José Gonzàlez-Abad, and Emilio Bouza. In vitro Activities of Six Fluoroquinolones against 250 Clinical Isolates Of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptible or Resistant to First-Line Antituberculosis Drugs; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000;44(9):2567-2568.

26. Martin Braback, Kristian Riesbeck, and Arne Forsgren. Susceptibilities of *Mycobacterium marinum* to Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Telithromycin, and Quinupristin-Dalfopristin (Synercid) Compared to its Susceptibilities to Reference Macrolides and

Quinolones. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Apr.2002;46(4):1114-1116.

27. Mathias W.R. Pletz, Andres De Roux, Andreas Roth, Karl-Heinz Neumann, Harald Mauch, and Hartmut Lode. Early Bactericidal Activity of Moxifloxacin in Treatment of Pulmonary Tuberculosis: a Prospective, Randomized Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar,2004;48(3):780-782.

28. Napoleón González Saldaña. Estado actual de la tuberculosis en México y en el ámbito Mundial. *Vacunación hoy, México*. 2007;Vol15(86).

29. Nelson M. Gantz, George A. Pankey, Wayne Weart. Quinolonas: Papel que desempeñan. *Atención Médica México*, No. 12, Diciembre 1989.

30. Nicolas Veziris, Chantal Truffot-Pernot, Alexandra Aubry, Vincet Jarlier, and Nacer Lounis. Fluoroquinolone-Containing Third-Line Regimen against *Mycobacterium tuberculosis* In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct,2003;47(10):3117-3122.

31. Patricia González. Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos. *Revista Chilena de Infectología*, 2002;2(19):1-7.

32. Patrick R. Murray. *Manual of clinical microbiology*. ASM PRESS, 7ª edición, 2005, 399-429pp.

33. Peter M Hawkey. Mechanisms of quinolone action and microbial response; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003;51:29-35.

34. Rafael Laniado – Laborín. Tratamiento de la tuberculosis multifarmacorresistente, ¿esquema estandarizado ó individualizado?; *Rev Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.* 2005;Vol18(3).

- 35. Randall C. Walker, M.D.** The Fluoroquinolones; Mayo Clin Proc 1999; 74:1030-1037
- 36. Rogelio Perez-Padilla.** La tuberculosis en México, deuda añeja de salud pública. Gac Méd Mèx ,2001;137(1):93-94.
- 37. Rogelio Pérez- Padilla.** Enfermedades respiratorias. Editorial Trillas. 2007, 1ª edición, 190-200.
- 38. Roly D. Gosling, Leonard O. Uiso, Noel E. Sam, Emily Bongard, Esther G. Kanduma, Mramba Nyindo, Richard W. Morris, and Stephen H. Gillespie.** The Bactericidal Activity of Moxifloxacin in Patients with Pulmonary Tuberculosis; Am J Respir Crit Care Med, 2003; 168:1342-1345.
- 39. Romero Cabello.** Microbiología y parasitología humana; Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas, 1ª edición, editorial Panamericana, 323-328.
- 40. Romualdo Olvera Castillo, Lina E. Pérez González.** Resistencia secundaria en tuberculosis, Rev Inst Nal Enf Resp Méx, 1993; 6(4):185-190.
- 41. Salazar-Lezama MA, Torres-Cruz A, Valdez-Vázquez RR, et al.** Resultados del tratamiento de tuberculosis resistente en pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias: 2001 – 2003, Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 2004; Vol7(1): 15-21.
- 42. Salman H. Siddigi.** Manual de productos y procedimientos, sistema TB de BACTEC, Madrid – España, 1989
- 43. Seven E Hoffner, Lena Gezelius and Barbro Olsson-Liljequist.** In-Vitro activity of fluorinated quinolones and macrolides against drug –resistant

Mycobacterium tuberculosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1997;40:885-888.

44. S. Vacher, J.L. Pellegrin, F. Leblanc, J. Fourche and J. Maugein.

Comparative antimicrobial activities of afloxacin, ciprofloxacin and grepafloxacin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1999;44:647-652.

45. S.H. Gillespie and O. Billington. Activity of Moxifloxacin against

mycobacteria, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999;44:393-395.

46. Stanley W. Chapman and Harold M. Henderson. New and emerging

pathogens – multiply resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Current Opinion in Infectious Diseases. 1994; Vol 7:231-237.

47. Tao Lu and Karl Drlica. In vitro activity of C-8-methoxy fluoroquinolones

against mycobacteria when combined with anti-tuberculosis agents, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003;52:1025-1028.

48. Theodore M. Brody, Joseph Larner MD, Kenneth P. Minneman, et al.

Human Pharmacology Molecular to Clinical; 2^a Edición; 1999; Mosby; 687-688.

49. Victorino Farga C. Tuberculosis. Tratamiento de la tuberculosis, principios

generales. 2^a edición, Santiago de Chile: Mediterráneo, 1992.

50. Yoshikumi Onodera, Mayumi Tanaka and Kenichi Sato. Inhibitory activity

of quinolones againsts DNA Gyrase of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001; 47:447-450.