



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA ALAMAR AZUL  
EN EL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO PARA  
DETERMINAR PATRONES DE SENSIBILIDAD A  
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS DE PRIMERA Y  
SEGUNDA LÍNEA EN MICOBACTERIAS NO  
TUBERCULOSAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA  
LUIS ARMANDO NARVÁEZ DÍAZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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: Raúl Garza Velasco**

**VOCAL:**              **Profesor: Adriana Guadalupe Mejía Chávez**

**SECRETARIO:**      **Profesor: Heleodora González González**

**1er. SUPLENTE:**    **Profesor: Alejandro Camacho Cruz**

**2° SUPLENTE:**      **Profesor: Norma Trejo Medina**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Laboratorio de Neumología, Hospital General de México**

**ASESOR DEL TEMA: M. en C. Heleodora González González** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Julieta Luna Herrera** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: Luis Armando Narváez Díaz** \_\_\_\_\_

---

## AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por el gran interés y apoyo incondicional que me ha brindado durante mi formación profesional, cada uno de ustedes tiene un lugar especial en mi corazón. *Abigail*, gracias por creer en mí; tengo guardadas cada una de tus palabras de aliento y admiración aquí dentro. *Martha Rolón-Campise*: eres la persona que me ha inspirado a ir más allá de mis límites y tomar caminos que no esperaba terminar, muchas gracias prima.

A mis amigos y ex-sobrevivientes del TEC de Monterrey, *Ana, Leslie y Carlos*; estos años han sido increíbles a su lado, gracias por estar presentes en las buenas y en las malas, nuestra amistad se vuelve cada vez más fuerte, indestructible.

A mis amigos de la Facultad de Química de la UNAM. *Alfonso y Daniela*; desde que los conocí en primer semestre supe que estarían en esta hoja y en todas las páginas de mi vida, los amo. *Alfredo y Luz*; no solo encontré a los mejores compañeros para mis materias, tuve la suerte de contar con su preciada amistad, e incluso formamos un grupo de gente que viene y va, pero ustedes permanecerán siempre, gracias. *Mariela*, tú más que nadie sabe lo difícil que ha sido para mí llegar hasta este punto, gracias por permitirme formar parte de la gran persona que eres y por hacerme descubrir la mejor versión de mi mismo. *Tania, Diego, Ramón y Erick*: nuestra amistad es reciente pero tenemos mucha vida para enriquecerla, gracias por compartir los buenos viajes y estos últimos semestres.

Un agradecimiento a mi universidad, la *UNAM*, la mejor casa de estudios de México; por pintar mi espíritu color azul y oro. A todos los compañeros que conocí en la Facultad de Química de la UNAM, cada uno es parte de mi presente.

A todo el *staff* del laboratorio de Neumología del Hospital General de México: *Susana Reyna, Margarita Gálvez, Graciela Leaños, Martha Castañeda, Leticia Rojas, Juan Carlos, Francisco Salinas*, por estos tres años en los cuales he aprendido mucho de ustedes, gracias por compartir sus experiencias y por ser mi segunda familia. A mis compañeras del laboratorio de neumología del HGM; *Ingrid de León, Coral y Anaid*: les deseo mucho éxito, gracias por sus buenos deseos.

Vecinita (*Cindy*), aún siento las buenas vibras que me enviaste a seis calles de distancia, siempre tendremos las playas, te adoro.

*Rocío Liliana y Sandra Rivera*: gracias por todo el apoyo que me han brindado en esta etapa y por todo el tiempo que hemos reído, las quiero mucho.

A mis amigos del Laboratorio de Inmunoquímica II de la ENCB: *Jorge, Chío-Chan, Liz, Marthita, Ariadna, Ana, Nayeli, Shantal*; mil gracias por hacerme sentir como en casa, por ustedes tengo mi segunda alma máter en el IPN.

Un agradecimiento muy especial a la *Dra. Julieta Luna Herrera*: Te doy las gracias por incluirme en tu grupo de alumnos, por la confianza, paciencia y dedicación que tuviste en mí desde el principio. Mi admiración, amistad, respeto y cariño están contigo.

---

## DEDICATORIA

Primeramente, a mi padre, *Armando Narváez Hernández*, por ser el mejor consejero, mi apoyo económico y emocional, mi fuerza, mi pared. Cada palabra de este escrito es para ti, admiro todo lo que has construido y cambiado de tu vida, tengo mucho que aprender de ti: eres un guerrero.

A mi asesora, jefa y amiga, *Heleodora González González*, por permitirme formar parte del equipo del laboratorio de Neumología en el Hospital General de México. Has vuelto de este perfeccionista un profesional envidiable, tus consejos me han guiado durante estos últimos tres años, tu experiencia me ha dado más conocimiento que todos los artículos y libros que he leído, tu calidez humana me ha demostrado que sí se puede brindar un servicio excelente en salud pública, mi infinita gratitud hacia ti.

A *María del Rocío López Álvarez*, por ser mi mejor maestra, al mostrarme con tu experiencia la pasión que no había encontrado en mi carrera, gracias a ti, encontré mi rumbo profesional.

Este trabajo está dedicado a mi madre, *María Teresa Díaz Rodríguez*, por ser esa joya que adorna e ilumina mi existencia. Misión cumplida: me has hecho un hombre de bien como se lo prometiste a Dios, te doy gracias por darme la vida, te pago entregándote mi corazón día con día.



---

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo técnico del Laboratorio de Inmunoquímica II, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Doctora Julieta Luna Herrera y con el apoyo financiero de CONACYT.

## PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

Narváez-Díaz, L., González-González, H., Hernández-Solís, A., Cicero-Sabido, R., Ramírez-Casanova, E., Leños-Miranda, G., Rojas-Bautista, L., Castañeda-Salgado, M., Vázquez-Sánchez, J., Luna-Herrera, J. (2011). *Implementación de la técnica Alamar Azul para la determinación de sensibilidad a fármacos en Micobacterias No Tuberculosas de importancia clínica*. En: XXXVI Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. Puebla, Puebla: Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica.

---

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. El género <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.1. Clasificación	2
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1. Micobacterias No Tuberculosas (MNT)	4
2.1.1. Clasificación de Runyon	4
2.1.2. Micobacteriosis. Epidemiología y manifestaciones clínicas	6
2.1.3. Diagnóstico de laboratorio	10
2.1.4. Identificación	14
2.2. Tratamiento contra micobacteriosis	19
2.2.1. Fármacos antituberculosos de primera línea	20
2.2.2. Fármacos antituberculosos de segunda línea	22
2.3. Pruebas de laboratorio para determinar susceptibilidad a fármacos	25
2.3.1. Método de las proporciones de Canetti	28
2.3.2. Técnica Alamar Azul	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>5. MATERIAL Y METODOLOGÍA</b>	<b>35</b>
5.1. Cepas de Micobacterias No Tuberculosas (MNT)	35
5.2. Preparación de soluciones <i>Stock</i> de fármacos antituberculosos	37
5.3. Método modificado de las proporciones de Canetti	37
5.3.1. Preparación del medio de cultivo	38
5.3.2. Preparación de inóculo y cuenta de placas	39
5.4. Microensayos colorimétricos por la técnica Alamar Azul	40
5.4.1. Dilución de fármacos	41
5.4.2. Preparación de la microplaca	41
5.4.3. Revelado de placa e interpretación	43
5.5. Análisis estadístico	45
5.5.1. Curvas ROC	45
5.5.2. Tablas de contingencia 2x2	46
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
6.1. Método de las proporciones	50
6.2. Microensayos de Alamar Azul	51
6.3. Análisis estadístico	53
6.3.1. Curvas ROC y diagramas de distribución de puntos	53
6.3.2. Tablas de contingencia	55
6.3.3. Evaluación general de la actividad de los antibióticos	55
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>69</b>
<b>APÉNDICE 1. Fotografías de los microensayos Alamar Azul en MNT.</b>	<b>84</b>
<b>APÉNDICE 2. Distribución de resultados, diagrama de distribución de puntos, curvas ROC y parámetros estadísticos comparativos.</b>	<b>89</b>

---

## ABREVIATURAS

**AA:** Alamar Azul

**AK:** Amikacina

**BAAR:** Bacilos ácido-alcohol resistentes

**CC:** Concentración Crítica

**CDC:** Centro para el Control y Prevención de Enfermedades

**CLA:** Claritromicina

**CIP:** Ciprofloxacino

**E:** Etambutol

**H:** Isoniazida

**KN:** Kanamicina

**LEV:** Levofloxacino

**LJ:** Medio Lowenstein Jensen

**MAC:** Complejo *Mycobacterium avium – intracellulare*

**MIC:** Concentración Mínima Inhibitoria

**MNT:** Micobacterias No Tuberculosas

**MOX:** Moxifloxacino

**MTB:** Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

**NCCLS:** Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico

**OFL:** Ofloxacino

**R:** Rifampicina

**RIB:** Rifabutina

**ROC:** *Receiver Operating Characteristic*

**MP:** Método de las proporciones modificado



---

## RESUMEN

Se estandarizó el microensayo colorimétrico de Alamar Azul (AA) para la determinación de sensibilidad a una batería de fármacos potencialmente útiles para el tratamiento clínico de infecciones causadas por Micobacterias No Tuberculosas (MNT) utilizando un grupo de 30 cepas de MNT que incluyó aislados clínicos del Laboratorio de Neumología del Hospital General de México y cepas de la colección del Laboratorio de Inmunoquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. El género y especie se determinó por técnicas moleculares (PCR y secuenciación). El microensayo de AA se estandarizó para los fármacos; estreptomycin, rifampicina, etambutol, claritromicina, kanamicina, amikacina, ciprofloxacino, moxifloxacino, levofloxacino, ofloxacino y rifabutina. Como estándar de oro se realizó el método de las proporciones modificado del *National Jewish Center*. Por el microensayo se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y por medio del análisis de curvas ROC y tablas de contingencia se compararon con aquellas obtenidas por el método de referencia estableciendo las concentraciones críticas del ensayo.

Para cada cepa, se determinó su sensibilidad a los diferentes fármacos, lo cual se logró en un máximo de 3 días por el método de AA. De las 4 fluoroquinolonas estudiadas, aquella que fue más activa fue el moxifloxacino y el aminoglicósido más activo contra las diferentes especies analizadas fue la kanamicina. Los aislados clínicos de *Mycobacterium fortuitum* estudiados fueron sensibles a todas las quinolonas. En comparación, los aislados del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) fueron resistentes a este grupo de fármacos. Todos los aislados pertenecientes a la especie *Mycobacterium abscessus* resultaron sensibles a rifampicina pero mostraron una variabilidad en su susceptibilidad a las quinolonas, los aminoglicósidos y la claritromicina. Los puntos de corte obtenidos están correlacionados con los valores séricos máximos alcanzados clínicamente. AA es un microensayo rápido, económico y de metodología sencilla, que puede ser implementado en instituciones de salud, así como en laboratorios de microbiología clínica.

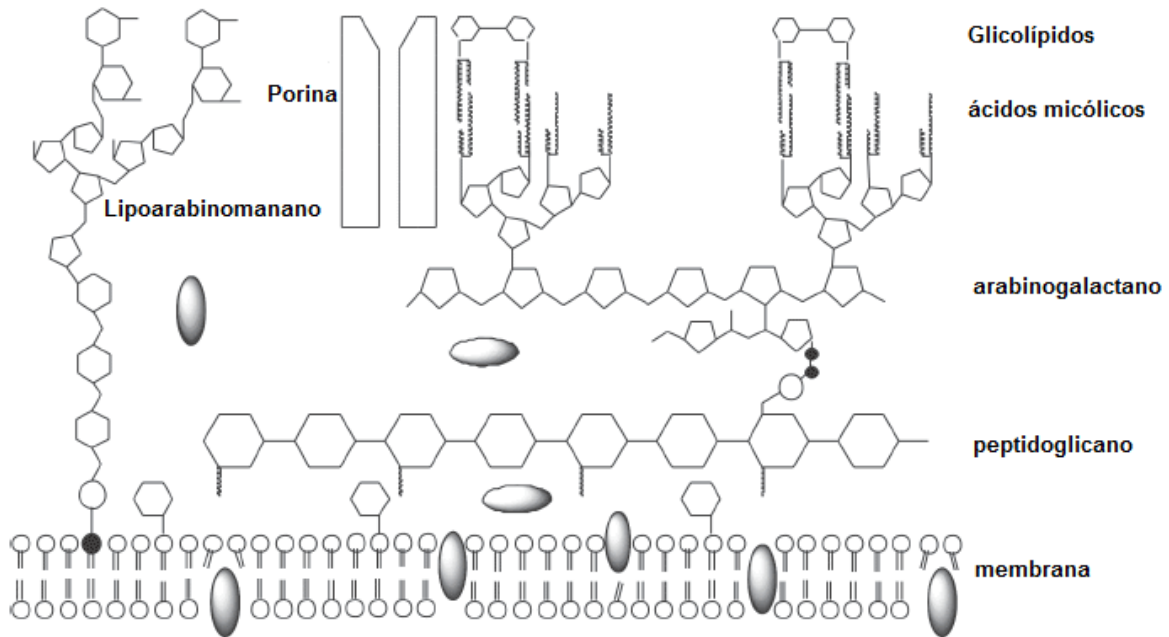
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El género *Mycobacterium*

Las micobacterias pertenecen al orden *Actinomycetales* y a la familia *Mycobacteriaceae*, que contiene al género *Mycobacterium*. Se integra por bacterias aerobias estrictas con forma bacilar pleomórfica (bacilos rectos, bacilos ligeramente curvos y cocobacilos), miden de 0.2-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2-7  $\mu\text{m}$  de largo. No presentan esporas, flagelos ni cápsula. Resisten la congelación y la desecación e incluso, pueden permanecer vivas por varias semanas sobre diversas superficies; sin embargo, son sensibles al calor extremo, la luz solar y luz ultravioleta [73]. La reproducción de las micobacterias se lleva a cabo por fisión binaria, su tiempo de división oscila entre 14 y 24 horas y sus condiciones óptimas de crecimiento se manifiestan a un pH de 7,4 bajo una presión de oxígeno de 100-140 mm Hg [18].

Su DNA posee un contenido elevado de G+C (62-71%) y presentan una pared celular con abundante contenido lipídico (30% del peso seco), así como ceras con ácidos micólicos de 60 a 90 átomos de carbono [79]. La pared celular se divide en cuatro capas; la más externa está compuesta por glicolípidos con trehalosas acetiladas tales como la trehalosa 6-6' dimicolato (factor cordón), las siguientes están constituidas por un complejo macromolecular con ácidos micólicos de 60 a 90 átomos de carbono, una capa de arabinogalactanos unidos a la capa anterior y la capa interna con peptidoglicano [10, 41] (Figura 1). En conjunto, esta pared posee una permeabilidad escasa que le confiere la propiedad de presentar ácido-

alcohol resistencia (resistencia a la decoloración con alcohol-ácido en las tinciones diagnósticas), una protección natural contra moléculas hidrofílicas, entre ellas algunos agentes antimicrobianos y la dificultad para ser destruida por los macrófagos, fungiendo como su primordial factor de virulencia [18, 89].



**Figura 1.** Representación esquemática de la composición de la pared celular del género *Mycobacterium*. La membrana citoplasmática está encapsulada por una capa de peptidoglicano, el cual se encuentra unido a arabinogalactano a través de una región disacárido fosfato. Las cadenas de ácidos micólicos se muestran perpendiculares a la membrana citoplasmática, con sus cadenas expuestas interactuando con cadenas micólicas de trehalosa dimicolato. Otro componente asociado a la pared micobacteriana es el lipoarabinomanano, que está sujeto a la membrana por medio de uniones fosfatidilinositol. Los solutos hidrofílicos y pequeños se difunden a través de porinas, mientras que los compuestos hidrofóbicos, utilizan la ruta de lípidos. Los óvalos coloreados representan proteínas [14].

### 1.1.1 Clasificación

El género *Mycobacterium* posee más de 140 especies que pueden ser clasificadas diversamente:

- Saprófitas. También llamadas micobacterias ambientales, se encuentran en la naturaleza (suelo y agua principalmente).

- Patógenas o de interés clínico. Son todas aquellas micobacterias que originan diversas enfermedades en el ser humano.

Por etiología clínica, las especies micobacterianas patógenas para el ser humano son clasificadas de la siguiente manera:

Tuberculosis. Comprende al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) de 8 especies que comparten más del 95% en homología de su DNA: *M. tuberculosis* (agente más frecuente de tuberculosis), *M. africanum* (causante menor de casos en el continente africano), *M. bovis* (responsable de la tuberculosis bovina), *M. canetti*, *M. microti* (causante de tuberculosis murina) [4, 5, 18, 19] y las más recientes, *M. caprae* (tuberculosis en cabras), *M. pinnipedii* (tuberculosis en focas, lobos marinos) y *M. mungi* (aislada en mangostas) [1, 7, 27].

Lepra. Enfermedad cutánea desfigurativa ocasionada por *Mycobacterium leprae*, cuyo reservorio se encuentra únicamente en humanos y armadillos [79].

Micobacteriosis. Diversas patologías originadas por micobacterias que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, llamadas micobacterias no tuberculosas (MNT) [67, 99].

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Micobacterias no tuberculosas (MNT)

Durante las últimas cinco décadas las micobacterias que no pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* han sido denominadas como micobacterias atípicas, micobacterias ambientales, micobacterias oportunistas, micobacterias no clasificadas, micobacterias anónimas o *Mycobacteria Other Than Tuberculosis* (MOTT) [57, 67, 99], pero fue en el año 1979 cuando se propone el nombre de Micobacterias No Tuberculosas (MNT), el cual es empleado actualmente [99]. Se han descubierto más de 140 especies y poseen diversas características de crecimiento. Algunas son capaces de producir pigmentos no hidrosolubles que varían desde el amarillo tenue hasta el rojizo [33] y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, no obstante pueden detectarse biopelículas en sistemas de agua, tinas, albercas y a nivel nosocomial [24]. Cerca de la mitad de las especies conocidas son potencialmente patógenas (Tabla 1), comúnmente cuando el individuo implicado presenta un estado de salud inmunocomprometido [96].

#### 2.1.1 Clasificación de Runyon

Las MNT se clasifican en cuatro grupos, de acuerdo al intervalo de crecimiento y a la capacidad para producir pigmento (Tabla 2).

Tabla 01. MNT potencialmente patógenas de reciente aparición [15, 64, 91].

Especie	Año	Lugar de aislamiento	Patologías asociadas
<i>M. celatum</i>	1993	Ganglios linfáticos, muestras respiratorias.	Enfermedad pulmonar, diseminada, linfadenitis.
<i>M. interjectum</i>	1993	Ganglio linfático	Linfadenitis cervical
<i>M. intermedium</i>	1993	Espujo	Enfermedad pulmonar
<i>M. branderi</i>	1995	Muestras pulmonares	Enfermedad pulmonar, tenosinovitis ulcerativa.
<i>M. conspicuum</i>	1995	Espujo, líquido pleural, sangre.	Enfermedad diseminada
<i>M. lentitilavum</i>	1996	Espujo, ganglio linfático, aspirado gástrico, biopsia vertebral, sangre.	Enfermedad pulmonar, diseminada, linfadenitis, espondilodiscitis.
<i>M. triplex</i>	1996	Espujo, LCR, ganglios linfáticos.	Enfermedad pulmonar, diseminada, linfadenitis.
<i>M. heidelbergense</i>	1997	Ganglio linfático	Linfadenitis cervical
<i>M. mageritense</i>	1997	Espujo, sangre.	Infecciones posquirúrgicas y de catéter.
<i>M. bohemicum</i>	1998	Espujo, ganglios linfáticos.	Linfadenitis
<i>M. tusciae</i>	1999	Ganglios linfáticos	Linfadenitis
<i>M. goodii</i>	1999	Muestras pulmonares, biopsias, exudados	Celulitis, bursitis, osteomielitis, infecciones postraumáticas, infecciones de heridas quirúrgicas, enfermedad pulmonar.
<i>M. wolinskyi</i>	1999	Biopsias	Celulitis, osteomielitis, infecciones de heridas quirúrgicas.
<i>M. heckeshornense</i>	2000	Muestras pulmonares, biopsia pulmonar.	Enfermedad pulmonar
<i>M. elephantis</i>	2000	Espujo, ganglio linfático.	Enfermedad pulmonar y ganglionar.
<i>M. septicum</i>	2000	Sangre	Bacteriemia por infección de catéter.
<i>M. immunogenum</i>	2001	Muestras pulmonares, sangre, líquido sinovial, raspado corneal.	Enfermedad pulmonar, diseminada, queratitis, artritis.
<i>M. lacus</i>	2002	Líquido sinovial	Bursitis postraumática
<i>M. palustre</i>	2002	Espujo, ganglios linfáticos.	Linfadenitis
<i>M. boenickei</i>	2004	Espujo y lesiones cutáneas.	Enfermedad cutánea
<i>M. brisbanense</i>	2004	Seno nasal	Sinusitis
<i>M. canariense</i>	2004	Sangre	Infección por catéter
<i>M. houstonense</i>	2004	Lesión cutánea, pulmón.	Enfermedad pulmonar, cutánea.
<i>M. neworleansense</i>	2004	Cutáneo	Posiblemente lesión cutánea
<i>M. cosmeticum</i>	2004	Lesiones cutáneas	Lesiones granulomatosas subcutáneas
<i>M. chimaera</i>	2004	Muestras pulmonares	Enfermedad pulmonar
<i>M. nebraskense</i>	2004	Espujo	Enfermedad pulmonar
<i>M. parascrofulaceum</i>	2004	Muestras pulmonares	Enfermedad pulmonar
<i>M. parmense</i>	2004	Ganglio linfático	Linfadenitis
<i>M. saskatchewanense</i>	2005	Muestras pulmonares	Enfermedad pulmonar
<i>M. florentinum</i>	2005	Espujo, ganglio linfático.	Enfermedad pulmonar, ganglionar.
<i>M. arupense</i>	2006	Ganglio linfático, biopsia, líquido pleural.	Enfermedad pulmonar, ganglionar.
<i>M. colombiense</i>	2006	Sangre	Enfermedad diseminada
<i>M. bollettii</i>	2006	Espujo, aspirado gástrico.	Enfermedad pulmonar
<i>M. aubagnense</i>	2006	Muestras pulmonares, líquido sinovial.	Enfermedad pulmonar, diseminada.

**Tabla 2.** Clasificación de Runyon para MNT [67]

GRUPO DE RUNYON	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS
<b>I. FOTOCROMOGENOS</b>	Producen pigmento únicamente en presencia de luz. Crecimiento lento.	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. habana</i>
<b>II. ESCOTOCROMOGENOS</b>	Producen pigmento en presencia o ausencia de luz. Crecimiento lento.	<i>M. flavescens</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i>
<b>III. NO CROMOGENOS</b>	No producen pigmento. Crecimiento lento	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. ulcerans</i>
<b>IV. DE CRECIMIENTO RÁPIDO</b>	Crecimiento rápido. *Producción de pigmento presente o ausente.	<i>M. fortuitum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>*M. duvalii</i>

\*Existen versiones modificadas de la clasificación de Runyon donde se separan las MNT de crecimiento rápido en fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas. Ejemplo: *M. duvalii*, escotocromógena de crecimiento rápido [33].

### 2.1.2 Micobacteriosis. Epidemiología y manifestaciones clínicas

Se define como micobacteriosis al conjunto de patologías ocasionadas por micobacterias no tuberculosas [19]. En ocasiones se desarrolla una serie de cuadros clínicos que pueden ser similares a tuberculosis pero el agente etiológico no pertenece al complejo MTB [3].

Hace 40 años se presentaban casos clínicos esporádicamente y la enfermedad se describía como variante de tuberculosis o alguna afección dermatológica. Sin embargo, conforme han transcurrido los años, las micobacteriosis han aumentado en frecuencia, en gran parte debido a la presencia de enfermedades que ocasionan un compromiso inmunológico [5]. La patología se ha vuelto común en los últimos 15 años debido a la epidemia del VIH-SIDA, presentándose casos

complicados de micobacteriosis y tuberculosis simultánea en el paciente [46]. Actualmente, la frecuencia de MNT aislados clínicos del género, es de 5 a 30%, correspondiendo el resto al complejo MTB. Esto depende de la región y del tipo de laboratorio clínico que procesa las muestras [18, 19].

Geográficamente, la prevalencia y frecuencia de la enfermedad varía de un lugar a otro. Se ha demostrado que en México, es mayor la frecuencia de aislados clínicos identificados como *M. fortuitum*, *M. kansasii* y *M. chelonae* en la región norte, mientras que en zonas conurbadas la presencia predominante corresponde al complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) [12]. A pesar de presentarse una amplia variabilidad geográfica, se pueden asociar las patologías tomando en cuenta los factores de riesgo que se tienen en común: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tabaquismo, antecedentes de tuberculosis, bronquiectasias y epidemia de VIH, entre otros [19, 67].

La transmisión se lleva a cabo principalmente por exposición directa (ingestión y traumatismos) con el reservorio natural; tal es el caso de *Mycobacterium marinum*, causante del granuloma de la pecera, que habita en el interior de algunos peces de agua salada, peceras, albercas y agua fresca. Otro ejemplo es *Mycobacterium szulgai*, aislado comúnmente en zonas mineras [95]. También puede ocurrir la exposición por medio de sistemas de conducción de agua y grifos, donde se han aislado especies como *M. gordonae*, *M. kansasii* y *M. fortuitum*. Por este medio pueden ocurrir casos intrahospitalarios [18, 67, 93].



Las micobacteriosis pueden ocurrir a nivel pulmonar o extrapulmonar (diseminada, cutánea, linfadenitis, meníngea) [46] y las manifestaciones clínicas son diversas, dependiendo de la especie de MNT causante de la patología (Tabla 3).

**Tabla 3.** Patologías ocasionadas por las MNT más frecuentes aisladas clínicamente y su distribución geográfica [3].

Enfermedad	Especies etiológicas frecuentes	Especies etiológicas inusuales	Región geográfica
<b>Pulmonar</b>	1. Complejo MAC 2. <i>M. kansasii</i> 3. <i>M. abscessus</i> 4. <i>M. xenopi</i> 5. <i>M. malmoense</i>	1. <i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> 2. <i>M. fortuitum</i> <i>M. celatum</i> 3. <i>M. asiaticum</i> <i>M. shimodii</i> 4. <i>M. haemophilum</i> 5. <i>M. smegmatis</i>	1. Mundial 2. E.U., minas de carbón, Europa. 3. Mundial, más en E.U. 4. Europa y Canadá. 5. Reino Unido, norte de Europa.
<b>Linfadenitis</b>	1. Complejo MAC 2. <i>M. scrofulaceum</i> 3. <i>M. malmoense</i>	1. <i>M. fortuitum</i> 2. <i>M. chelonae</i> 3. <i>M. abscessus</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. haemophilum</i>	1. Mundial 2. Mundial 3. Reino Unido, Escandinavia.
<b>Cutánea</b>	1. <i>M. marinum</i> 2. <i>M. fortuitum</i> 3. <i>M. chelonae</i> 4. <i>M. abscessus</i> 5. <i>M. ulcerans</i>	1. Complejo MAC <i>M. kansasii</i> <i>M. nonchromogenicum</i> 2. <i>M. smegmatis</i> 3. <i>M. haemophilum</i>	1. Mundial 2. Mundial 3. E.U. 4. E.U. 5. Australia, regiones tropicales, África, este de Asia.
<b>Diseminada</b>	1. Complejo MAC 2. <i>M. kansasii</i> 3. <i>M. chelonae</i> 4. <i>M. haemophilum</i>	1. <i>M. abscessus</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. malmoense</i> 2. <i>M. genavense</i> 3. <i>M. simiae</i> 4. <i>M. conspicuum</i> <i>M. marinum</i> <i>M. Fortuitum</i>	1. Mundial 2. E.U. 3. E.U. 4. E.U., Australia.

De todos los aislados clínicos de MNT, entre un 75 y 94% provienen de los pulmones [22, 43]. Cuando se manifiesta una **micobacteriosis pulmonar**, se tiene como antecedente principal la enfermedad pulmonar crónica, siendo los agentes causales de mayor frecuencia el complejo MAC y *M. kansasii* [35, 99]. La mayoría de los pacientes que presentan la enfermedad son adultos mayores y la

sintomatología es variada y poco específica, incluyendo tos crónica, producción de esputo, fatiga, disnea, hemoptisis y pérdida de peso. El estudio radiológico, a diferencia de la tuberculosis, revela cavidades delgadas con menor infiltración, bronquiectasias, nódulos aislados y daños en zonas específicas de la pleura [29, 42, 71].

La **linfadenitis** por MNT es una infección localizada en ganglios linfáticos (submandibular, submaxilar, cervical o preauricular) y ocurre principalmente en niños entre 1 y 5 años de edad. No hay sintomatología asociada, únicamente se presenta el crecimiento ganglionar, e incluso, llega a la ruptura y fistulización. La diferenciación de un nódulo no tuberculoso de base en el examen histopatológico del ganglio donde hay presencia de granulomas caseosos. El cultivo puede dar positivo hasta en un 50% de los casos [100].

Las infecciones **cutáneas** más frecuentes por MNT se encuentran localizadas en la superficie de la piel y el tejido subcutáneo. El paciente presenta la formación de abscesos o heridas puntiformes. También puede ocurrir la infección por MNT de crecimiento rápido debido a traumatismos, causando infecciones en articulaciones, bursas y huesos [3, 5].

Ya que las MNT son resistentes a diversos agentes desinfectantes, puede ocurrir la inoculación accidental en el hombre, por medio de material quirúrgico no estéril y el uso de soluciones contaminadas, empleadas en cirugía y cosmetología. Un ejemplo, es la administración de mesoterapia, un tratamiento cosmetológico para perder peso, por el cual se han reportado numerosos brotes de infecciones

cutáneas ocasionados por *M. abscessus*, *M. chelonae* y la especie recién clasificada como *Mycobacterium cosmeticum* [25, 26, 39]. También se han documentado casos de micobacteriosis intrahospitalaria debido a la contaminación de catéteres intravenosos e intraperitoneales [51] y la manifestación de infecciones posquirúrgicas muy peligrosas ocasionando queratitis por *M. chelonae* y *M. fortuitum* [80], endocarditis, abscesos y heridas que no cierran adecuadamente [13].

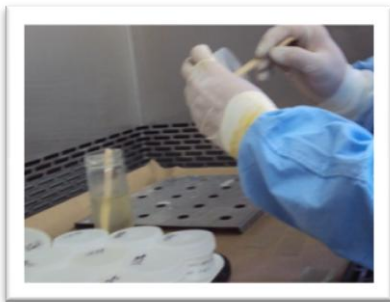
La **micobacteriosis diseminada** es de fatal pronóstico y se manifiesta por episodios febriles prolongados de origen desconocido. Se puede presentar en pacientes inmunosuprimidos que no tienen VIH (con trasplante renal o cardiaco, leucemia, uso crónico de corticoesteroides, etc.) y en aquellos con VIH que se encuentran en el estado más avanzado de la enfermedad. Además de la fiebre continua, estos últimos padecen de sudoración nocturna, pérdida excesiva de peso, dolor abdominal, diarrea, hepatoesplenomegalia, anemia y fosfatasa alcalina elevada [3, 54].

### 2.1.3 Diagnóstico de laboratorio

Al manifestar los diversos signos y síntomas de algún tipo de micobacteriosis, el siguiente paso es el diagnóstico adecuado de la enfermedad. Para los casos pulmonares, se requiere un estudio radiológico, así como baciloscopía y/o cultivo de expectoración u otra muestra pulmonar [9].

La **baciloscopía** es una técnica directa que permite la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Consiste en realizar un extendido proveniente

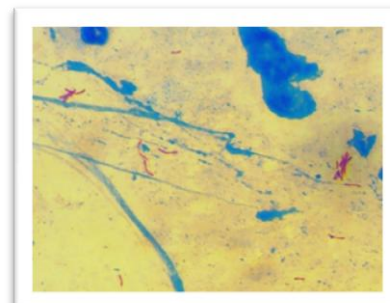
de la muestra, el cual después de ser fijado, es teñido por la tinción de Ziehl-Neelsen (Figuras 2 y 3). Ésta consiste en agregar fucsina básica y calentar a emisión de vapores para permear la pared celular y permitir que el colorante penetre a los bacilos. Posteriormente, se realiza una decoloración con una mezcla de alcohol-ácido, lo cual retirará el exceso de fucsina de la preparación y únicamente quedarán teñidos de rojo los BAAR. Se aplica azul de metileno como contraste y se observa en el microscopio óptico [8] (Figura 4).



**Figura 2.** Preparación de un extendido de expectoración.



**Figura 3.** Tinción de Ziehl-Neelsen.



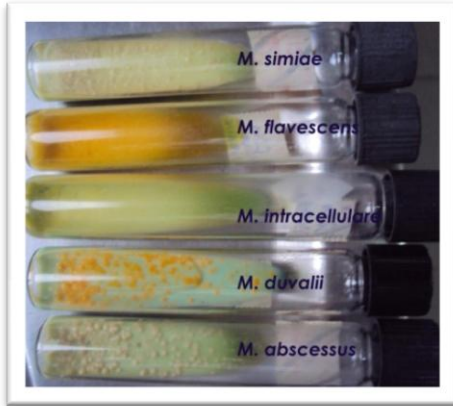
**Figura 4.** Observación microscópica de BAAR en esputo.

El **cultivo** es una técnica más sensible y específica que la baciloscopía, ya que permite el aislamiento de la cepa proveniente de una muestra clínica y es realizado tanto a muestras de origen pulmonar como extrapulmonar. Se descontamina la muestra por el método de Petroff (con hidróxido de sodio al 4%), ajustando el pH a neutro con ácido clorhídrico 1.0 N. El resultado final del procedimiento se siembra en medios de cultivo tradicionales como el Lowenstein-Jensen (LJ) [9] (Figura 5) o medios de mayor enriquecimiento para el desarrollo de micobacterias como el Middlebrook 7H11 (capa delgada) y el método automatizado BACTEC MGIT que utiliza Middlebrook 7H9 (Becton & Dickinson ®), incubándose a 37°C.



**Figura 5.** Muestras y material necesario para cultivo.

Un cultivo tarda en resultar positivo según la carga bacilar de la muestra clínica, el tiempo de crecimiento de la especie de micobacteria aislada y el medio de cultivo empleado. En el medio Lowenstein-Jensen (Figura 6), la obtención de la cepa puede tardar hasta 3 semanas (en el caso de MNT de crecimiento lento), mientras que en los medios Middlebrook 7H9 y 7H11 intervalo de tiempo es mucho menor (Figuras 7 y 8).



**Figura 6.** Cultivos de MNT en medio Lowenstein-Jensen.



**Figura 7.** Cultivo de MNT en medio Middlebrook 7H9 (MGIT, Becton & Dickinson®).



**Figura 8.** Cultivo de MNT en medio Middlebrook 7H11 (Becton & Dickinson®).

#### 2.1.4 Identificación

La **identificación** de MNT se realiza por métodos convencionales, cromatográficos y moleculares. Dentro de los convencionales se encuentran las pruebas bioquímicas, las cuales son numerosas y su interpretación es complicada debido a la variabilidad del fenotipo, falta de reproducibilidad, o bien, crecimiento pobre de la cepa. Se llevan a cabo para identificar MNT de crecimiento lento (Tabla 4). Ejemplos de ellas son: catalasa semicuantitativa, catalasa termoestable, producción de niacina, reducción de nitratos, ureasa, hidrólisis de Tween 80, arilsulfatasa, fosfatasa ácida, pirazinamidasa, crecimiento en cloruro de sodio, tiacetazona, picrato y oleato, entre otras [64, 84]. Estas pruebas son obsoletas para identificar MNT de crecimiento rápido debido a la variabilidad de resultados entre una misma especie. Para este caso se diseñó un método donde se evalúa la capacidad de crecer en diversos azúcares como única fuente de carbono (Tabla 5), sin embargo, su validez aplica sólo para las MNT no pigmentadas y por ello se han dejado de utilizar.

La **cromatografía** también puede ser empleada para identificar MNT. Se utiliza la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía de gases (GC) (Tabla 6). El fundamento consiste en la extracción y separación de los lípidos del resto de los componentes celulares y se aplica un tratamiento para permitir su volatilidad o migración. Los componentes lipídicos principales de la pared celular de las micobacterias son los ácidos micólicos y existe una variabilidad de estos patrones micólicos entre cada especie, por lo cual esta técnica resulta un buen método para identificar MNT [16].

Tabla 4. Identificación bioquímica de micobacterias de crecimiento lento [63, 84].

Especie	NIA	NIT	AS	Tw80	URE	NaCl	C-SQ	C-68°	INH 1	INH 10	HIDRO	P-NB	OLE	PZA	PIGMENTO
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	V	+	+	+	NO
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	V	-	-	-	+	V	+	V	-	-	NO
<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	NO
* <i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	V	V	+	NO
* <i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NO
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-	+	ND	+	NO
<i>M. celatum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	ND	ND	NO
<i>M. terrae</i>	-	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-	NO
<i>M. triplex</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	NO
<i>M. triviale</i>	-	+	-	V	-	-	+	+	+	+	ND	+	ND	-	NO
* <i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	V	NO
* <i>M. microti</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NO
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+	V	-	-	V	+	-	V	+	-	+	NO
<i>M. kansasii</i>	-	+	V	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	FOTO
<i>M. marinum</i>	-	-	V	+	+	-	V	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	FOTO
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	+	-	+	-	FOTO
<i>M. simiae</i>	V	-	-	-	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	FOTO
<i>M. lentiflavum</i>	-	-	-	-	-	-	V	V	+	ND	+	+	V	V	ESCOTO
<i>M. scrofulaceum</i>	-	V	-	-	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	ESCOTO
<i>M. gordonae</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	V	+	V	-	ESCOTO
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	+	ESCOTO
<i>M. szulgai</i>	-	+	-	V	+	+	+	+	-	ND	-	+	+	+	ESCOTO

NIA: Niacina; NIT: nitratos; AS: arilsulfatasa (3 días); Tw80: Tween 80; URE: ureasa; NaCl: NaCl 5%; C-SQ: catalasa semicuantitativa; C-68°: catalasa termoestable (68°C); INH 1: isoniazida 1 µg/mL; INH 10: isoniazida 10 µg/mL; HIDRO: hidroxilamina; P-NB: ácido p-nitrobenzoato; OLE: oleato; PZA: pirazinamidasa; + : positivo; - : negativo; V : variable; ND: no determinado; FOTO: fotocromógena; ESCOTO: escotocromógena; NO: no cromógena. \*Micobacterias que pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.



**Tabla 5.** Identificación bioquímica de micobacterias de crecimiento rápido [63, 84].

Especie	AS	NaCl	McC	CH	M	I	S	C	Nit	30°C 37°C	42°C	PIGMENTO
<i>M. thermoresistibile</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	ESCOTO
<i>M. aurum</i>	V	V	-	+	+	+	-	+	V	+	-	ESCOTO
<i>M. neoaurum</i>	-	ND	-	ND	+	+	ND	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. gadium</i>	-	ND	ND	-	ND	+	+	-	+	+	-	ESCOTO
<i>M. flavescens</i>	-	+	-	-	V	-	+	-	+	+	V	ESCOTO
<i>M. novocastrense</i>	-	+	+	-	ND	ND	ND	ND	+	+	+	FOTO
<i>M. alves</i>	+	-	-	-	-	-	ND	-	+	+	-	NO
<i>M. brumae</i>	-	-	-	+	-	+	ND	+	+	+	-	NO
<i>M. elephantis</i>	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	+	NO
<i>M. porcinum</i>	+	+	ND	ND	+	+	-	-	+	+	-	NO
<i>M. peregrinum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	NO
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	NO
<i>M. boenickei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	NO
<i>M. houstonense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NO
<i>M. neworleansense</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	NO
<i>M. brisbanense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	NO
<i>M. mucogenicum</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	V	+	-	NO
<i>M. mageritense</i>	+	+	+	V	+	V	ND	V	V	+	+	NO
<i>M. canariensis</i>	+	-	+	-	+	+	ND	-	-	+	-	NO
<i>M. abscessus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	NO
<i>M. chelonae</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	NO
<i>M. immunogenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	NO
<i>M. septicum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	NO
<i>M. smegmatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. wolinskyi</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	NO
<i>M. goodii</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	NO ESCOTO

AS: arilsulfatasa (3 días); NaCl: crecimiento en 5% de NaCl; McC: crecimiento en agar de McConkey sin cristal violeta; CH: Captación de hierro; M: manitol; I: inositol; S: sorbitol; C: citratos; Nit: Nitratos; 30°C, 37°C y 42°C: temperaturas de incubación; +: positivo; -: negativo; V: variable; ND: no determinado; ESCOTO: escotocromógena; FOTO: fotocromógena; NO: no cromógena.

**Tabla 6.** Métodos cromatográficos para identificar MNT [16].

Tipo de cromatografía	Fundamento	Ventajas	Desventajas
<b>TLC (Capa fina)</b>	Los extractos son depositados en placas de cristal o aluminio actuando de soporte para una capa de gel de sílice y se someten a difusión con uno o dos eluyentes. Se revelan de 1 a 3 manchas representando los patrones de migración de seis tipos de ácidos micólicos.	-Fácil estandarización  -Requiere mínima infraestructura	-Al tener menor capacidad de discriminación varias especies de crecimiento lento comparten el mismo patrón.
<b>HPLC (Líquida de alta eficiencia)</b>	Los compuestos son transportados a la columna a través de una fase móvil líquida, separando los ácidos grasos. Estos son detectados por un espectrofotómetro UV obteniéndose un cromatograma.	-Mayor potencial diagnóstico  -Mayor sensibilidad	-Posibles variaciones y similitudes entre especies. -Equipo costoso. -Estandarización compleja. -Capacitación necesaria.
<b>GC (Gases)</b>	Detección cualitativa de los metil-ésteres de los ácidos micólicos. Se inyecta la muestra al cromatógrafo, se volatiliza y se separan los compuestos grasos en una columna, obteniendo un cromatograma.	-Es útil para los aislamientos clínicos más frecuentes	-Patrones inespecíficos para MNT de crecimiento rápido. -Estandarización compleja. -Equipo costoso.

Los métodos más empleados actualmente son los moleculares. Los más sensibles son la identificación por sondas de ácidos nucleicos, secuenciación del gen ARNr 16S y el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA) [64, 83, 94] (Tabla 7).

El método disponible seleccionado para identificar la especie de MNT permitirá conocer el agente etiológico de la micobacteriosis, lo cual resulta de gran utilidad pues de ello dependerá la elección del tratamiento farmacológico a seguir. Debido a que las MNT presentan una complejidad estructural natural y variabilidad interespecie, se requiere del diseño de un tratamiento individualizado, totalmente dependiente de la etiología y del historial clínico del paciente [82].

**Tabla 7.** Métodos moleculares para identificar MNT [64, 94].

Método molecular	Fundamento	Ventajas	Desventajas
<b>Sondas de ácidos nucleicos</b>	-AccuProbe system (GenProbe®): Hibridación del RNA micobacteriano con el DNA complementario adherido a la prueba. -INNO-LiPA (Innogenetics®): Se amplifica una región del RNAr 16S-23S y se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos en tiras de nitrocelulosa. -GenoType (Hein®): Amplificación del gen RNAr 23S.	Pruebas rápidas comerciales disponibles. Resultados en horas, dependiendo el kit comercial. Identifica las especies de MNT de mayor importancia clínica.	Son pruebas costosas para implementarse como rutina en un laboratorio. Identifican un número limitado de especies de MNT.
<b>Secuenciación del gen RNAr 16S</b>	El RNAr 16S es codificado por un gen altamente conservado, el DNAr 16S. El RNAr 16S presenta regiones variables (A y B) y específicas (posiciones 130-210 y 430-500) que permiten diferenciar las diferentes especies de MNT.	Permite identificar muchas especies de MNT.	Depende del uso de un secuenciador. Algunas especies diferentes de MNT comparten dos copias del gen o presentan secuencias idénticas.
<b>PCR-restriction enzyme pattern analysis (PRA)</b>	Se amplifica una región de 338pb del gen que codifica para la proteína de choque térmico de 65kDa ( <i>hsp 65</i> ) y el producto se somete a una digestión por enzimas de restricción y al comparar estos fragmentos obtenidos se pueden identificar diversas especies de MNT.	Permite identificar especies, subespecies y variantes de cepas de MNT.	Puede haber discrepancias entre algunas especies al comparar fragmentos.

## 2.2 Tratamiento contra micobacteriosis

La elección de un tratamiento varía en función de la presentación clínica de la enfermedad, la especie de micobacteria responsable y el estado inmunitario del paciente [19]. Existen fármacos llamados antituberculosos de primera y segunda línea, que actúan de manera eficaz para curar la tuberculosis, pero también para

las diferentes variantes de micobacteriosis. Normalmente se utiliza una combinación de cinco o seis fármacos de ambas líneas durante largos períodos de tiempo, resultando un esquema terapéutico bastante complejo, el cual debe ser monitoreado por personal experto. La disponibilidad del tratamiento completo debe ser evaluada por el médico y de acuerdo a la clínica de salud u hospital, antes de su inicio, pues este se llevará a cabo por plazos prolongados y el paciente requerirá evaluación continua para verificar la cura. Si no se toma en cuenta lo anterior, se puede presentar una resistencia adquirida a los fármacos antituberculosos, lo cual dificultará la cura del paciente e irremediablemente sufrirá de serias recaídas [19, 34, 43].

### **2.2.1 Fármacos antituberculosos de primera línea**

La primera línea está integrada por estreptomina, pirazinamida, rifampicina, isoniazida y etambutol (Tabla 8). Son los fármacos de primera opción para tratar la tuberculosis, generalmente administrados en conjunto durante un período de evaluación continua de seis meses. Sin embargo, un tratamiento que incluya solamente fármacos de primera línea, no será efectivo para combatir los diferentes tipos de micobacteriosis. Algo que caracteriza a las MNT y es tema importante de investigación y práctica en el área clínica es su amplia variabilidad de sensibilidad espectral contra diversos agentes antimicrobianos [3, 18, 67]. Se ha demostrado que la administración de ciertos fármacos de primera línea en combinación con otros de segunda línea, son efectivos para combatir enfermedades cuyo agente

etiológico es una MNT (Tabla 9). A este tratamiento se le conoce como primera elección. Además, existe la posibilidad de administrar un tratamiento alternativo, que es aquel que se toma en cuenta cuando el paciente presenta fracaso a un primer tratamiento, recaída, o se ha demostrado que hay resistencia por pruebas de sensibilidad a fármacos [19, 82].

**Tabla 8.** Fármacos antituberculosos de primera línea [19, 65, 90].

Fármaco	Actividad	Mecanismo de acción	Mutantes resistentes (Bases genéticas)	Funciones del gen	Efectos secundarios
<b>Estreptomina</b>	Bactericida extracelular: bacilos metabólicamente activos.	Inhibición de síntesis de proteínas	<i>rpsL</i> (52-59%) <i>rrs</i> (8-21%)	Proteína ribosomal S12 RNA ribosomal 16S	Hipersensibilidad
<b>Isoniazida</b>	Bactericida intra y extracelular: bacilos metabólicamente activos	Inhibición de síntesis de ácidos micólicos	<i>KatG</i> (42-58%) <i>inhA</i> (21-34%) <i>AhpC</i> (10-15%)	Catalasa- peroxidasa Síntesis de ácidos micólicos. Alquil- hidroperóxido- reductasa	Hipersensibilidad Hepatitis Neuritis
<b>Rifampicina</b>	Bactericida todas poblaciones, esterilizante: bacilos activos, latentes y en crecimiento intermitente	Inhibición de la transcripción	<i>rpoB</i> (96-98%)	Subunidad β de la RNA polimerasa	Hepatitis Púrpura Reacción febril
<b>Etambutol</b>	Bacteriostático, extra e intracelular: bacilos metabólicamente activos.	Inhibición síntesis de arabinogalactano y lipoarabinomano (pared celular)	<i>embCAB</i> (47-65%)	Proteínas EmbCAB que participan en la síntesis de arabinogalactano.	Neuritis óptica
<b>Pirazinamida</b>	Bactericida intracelular, bacilos latentes en el interior de los macrófagos	Altera síntesis de ácidos micólicos	<i>pncA</i> (72-97%)	Codifica la enzima pirazinamida, que convierte al fármaco a su forma activa	Hiperuricemia Hepatitis

**Tabla 9.** Tratamiento primario y alternativo contra las principales MNT causantes de micobacteriosis [5,19].

Especie de MNT	Forma clínica	Tratamiento de primera elección	Tratamiento alternativo
<b>Complejo MAC</b>	Diseminada	Claritromicina Azitromicina + rifabutina Rifampicina + etambutol	Quinolonas, clofazimina, amikacina, estreptomina Isoniazida
	Pulmonar	Claritromicina Azitromicina + rifabutina Rifampicina + etambutol	Estreptomina, etionamida, quinolonas, clofazimina, amikacina
<b><i>M. kansasii</i></b>	Pulmonar Diseminada Linfadenitis	Isoniazida + rifabutina Rifampicina + etambutol	Claritromicina, estreptomina, sulfametoxazol
<b><i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i></b>	Infecciones cutáneas Heridas quirúrgicas	Amikacina + cefoxitina	Imipenem, tobramicina
<b><i>M. marinum</i></b>	Infecciones cutáneas	Claritromicina + doxiciclina/aminociclina + trimetoprim sulfametoxazol  Rifampicina + etambutol	

### 2.2.2 Fármacos antituberculosos de segunda línea

Son fármacos utilizados como segunda elección para tratar la tuberculosis; claritromicina, kanamicina, amikacina, capreomicina, cicloserina, quinolonas, clofazimina y rifabutina principalmente (Tabla 10). Se caracterizan por su costo elevado, algunos no están disponibles en centros de salud, generan alta toxicidad y son menos tolerados que los de primera línea [19]. A pesar de ello, su inclusión en el tratamiento contra micobacteriosis resulta muy eficaz y en administración conjunta con fármacos de primera línea mejora la posibilidad de curación definitiva del paciente. Se deben considerar ciertos factores durante el tratamiento, como la disponibilidad de los fármacos, posología, efectos secundarios y el monitoreo constante del paciente por medio de estudios de laboratorio y gabinete.

**Tabla 10.** Fármacos antituberculosos de segunda línea [3, 17, 19].

Grupo	Fármaco	Actividad	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
Aminoglucósidos	<b>Kanamicina</b> <b>Amikacina</b> <b>Capreomicina</b>	Bactericida extracelular	Unión a la subunidad 30S ribosomal alterando la traducción.	Ototoxicidad: mareo, pérdida auditiva, vértigo. Nefrotoxicidad
Macrólidos	<b>Clarithromicina</b> <b>Azitromicina</b> <b>Roxitromicina</b>	Bacteriostática	Unión a la subunidad 50S ribosomal, bloqueando translocación.	Molestias gastrointestinales Hepatitis Ototoxicidad Hipersensibilidad
Oxazolidinonas	<b>Linezolid</b>	Bactericida	Inhibe síntesis de proteínas en fase temprana uniéndose a la subunidad 50S ribosomal.	Trastornos hematológicos: anemia, neutropenia.
Fluoroquinolonas	<b>Ciprofloxacina</b> <b>Ofloxacino</b> <b>Moxifloxacino</b> <b>Levofloxacino</b> <b>Norfloxacino</b> <b>Gatifloxacino</b>	Bactericida	Actúan sobre las topoisomerasas. Inhibiendo la DNA-girasa.	Molestias gastrointestinales Hipersensibilidad Hepatitis SNC: Cefalea, insomnio
Rifamicinas	<b>Rifabutina</b>	Bactericida	Inhibe la síntesis de DNA bacteriano impidiendo la transcripción de la ARN-polimerasa.	Insuficiencia hepática Nefrotoxicidad Hipersensibilidad Anemia hemolítica Coloración naranja de secreciones.
Riminofenazinas	<b>Clofazimina</b>	Bacteriostática	Se intercala uniéndose a la guanina en el DNA modificando molecularmente el crecimiento bacteriano.	Manchas cutáneas Mareo, fatiga. Molestias gastrointestinales Daño hepático
	<b>PAS (ácido paraaminosalicílico)</b>	Bacteriostática	Inhibición de síntesis de folatos.	Molestias gastrointestinales Hepatitis Hipersensibilidad
	<b>Cicloserina</b>	Bacteriostática	Análogo de la D-alanina sintetasa, bloquea la síntesis de pared celular bacteriana.	Neuropatía periférica SNC: Depresión, confusión, psicosis, convulsiones.

Mientras se esté administrando un tratamiento combinado con fármacos de ambas líneas, se sugiere realizar una prueba de sensibilidad, la cual resulta de gran utilidad para corroborar la elección de fármacos, comprobar la eficacia a lo largo del tratamiento y conocer la resistencia adquirida por la cepa a una serie de fármacos de interés clínico (Tabla 11).

**Tabla 11.** Agentes antituberculosos a considerar para pruebas de susceptibilidad en MNT [3].

Especie o grupo de MNT	Fármacos de relevancia clínica comprobada	Fármacos de posible relevancia clínica	Fármacos de poca utilidad en pruebas de susceptibilidad
Complejo MAC	Claritromicina	Amikacina, ciprofloxacino, etambutol, rifabutina, rifampicina, estreptomina,	Isoniazida, pirazinamida
<i>M. kansasii</i>	Rifampicina	Amikacina, ciprofloxacino, claritromicina, etambutol, isoniazida, rifabutina, estreptomina, sulfonamidas.	Pirazinamida
<i>M. marinum</i>	Doxiciclina, etambutol, rifampicina, sulfonamidas	Amikacina, ciprofloxacino, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, rifabutina	Isoniazida, pirazinamida
<b>MNT de crecimiento lento:</b> <i>M. haemophilum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. xenopi</i>	Claritromicina Etambutol Rifampicina	Amikacina, ciprofloxacino, isoniazida, rifabutina, estreptomina.	Pirazinamida
<b>MNT de crecimiento rápido:</b> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. smegmatis</i>	Amikacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, sulfonamidas.	Imipenem, ofloxacino.	Todos los fármacos de primera línea.  Clofazimina



### **2.3 Pruebas de laboratorio para determinar susceptibilidad a fármacos antituberculosos**

Existen dos tipos de pruebas de susceptibilidad disponibles en microbiología clínica: cualitativas y cuantitativas. El fundamento de las cuantitativas es reportar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), que es la concentración mínima requerida para producir la inhibición total del crecimiento bacteriano *in vitro*, que representa generalmente a más del 99% de la población bacteriana. Esta permite designar criterios más específicos como: muy susceptible, moderadamente susceptible, moderadamente resistente y muy resistente. A diferencia de estas pruebas, las cualitativas proponen una interpretación sin reportar valores de MIC, simplemente se reportarán criterios como susceptible y resistente [48].

El objetivo de realizar e interpretar estas pruebas y reportar MICs al médico es informar la concentración determinada del fármaco que se requiere en el sitio de infección. La interpretación de resultados de las pruebas cuantitativas se basa en tres criterios primordiales [48, 87, 98]:

1. Correlación entre la MIC y la concentración alcanzada del fármaco *in vivo*.
2. Correlación entre la MIC del aislado en particular con las MIC encontradas en otras cepas que pertenecen a la misma especie.
3. Experiencia clínica en cuanto al uso de los agentes a considerar.

Para las cepas aisladas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* con sospecha de resistencia a fármacos, existen numerosas recomendaciones, procedimientos y estándares por parte de organismos internacionales como la Organización Mundial

de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), los cuales guían al personal de salud experto sobre cómo identificar casos de drogorresistencia, pruebas de laboratorio a realizar, los fármacos a probar así como el seguimiento clínico y terapéutico del paciente. La información disponible para aplicar estas pruebas a MNT está basada en las recomendaciones para MTB, pero hay algunas modificaciones con respecto a cuándo, cómo y cuáles agentes antimicrobianos deben incluirse y éstas difieren de acuerdo a los grupos o especies de MNT [3, 5].

De acuerdo al NCCLS los resultados deben ser presentados en categorías que clasifiquen a los aislados clínicos basados en correlación a las concentraciones séricas o tisulares alcanzadas por los agentes antimicrobianos [69]. Entonces una cepa será considerada como sensible si la proporción mutante resistente no excede el 1% de la población bacteriana al probar las concentraciones críticas de una serie de agentes antimicrobianos incorporados en diferentes medios de cultivo. Esto equivale *in vivo* a la inhibición bacteriana generada por los niveles de fármaco alcanzados en la sangre y tejidos en su dosis usual. Por el contrario, la cepa se clasificará como resistente si el desarrollo bacteriano excede el 1% ante las concentraciones críticas de los agentes antimicrobianos probados *in vitro* lo cual representa la resistencia bacteriana a la concentración sistémica alcanzada por el fármaco [30].

Para establecer estos criterios, hay disponibles diversos métodos clasificados como convencionales y rápidos. Los convencionales son métodos directos en los

que es necesario el desarrollo colonial para poder visualizar, contabilizar y dar una referencia del número de bacterias que desarrollaron en el medio de cultivo a determinadas concentraciones del fármaco, comparadas con un control libre de fármaco [65].

Los métodos rápidos son cada vez más utilizados debido a que acortan el tiempo de los resultados y se caracterizan por ser determinaciones basadas en la detección de alguna actividad bioquímica o metabólica relacionada con el crecimiento bacteriano. Tal es el caso de BACTEC 460 (Becton & Dickinson), que es un método radiométrico semiautomatizado que utiliza la detección del consumo de ácido palmítico marcado con  $^{14}\text{C}$  [66, 88]. Otro método rápido es el Tubo Indicador de Crecimiento de Micobacterias (MGIT, Becton & Dickinson) que consiste en una serie de tubos con medio enriquecido Middlebrook 7H9 (Becton & Dickinson ®) cuyo fondo contiene un botón de silicón con un compuesto fluorescente que detecta el consumo de oxígeno de las micobacterias, el cual es detectado por una lámpara de luz ultravioleta [97]. El problema con los métodos rápidos disponibles comercialmente es que fueron diseñados para determinar susceptibilidad a fármacos de primera línea y únicamente para aislados del complejo *M. tuberculosis*. No hay disponible un método comercial estandarizado para ser utilizado propiamente con cepas de MNT y que incluya fármacos antituberculosos de ambas líneas.

### 2.3.1 Método de las proporciones de Canetti

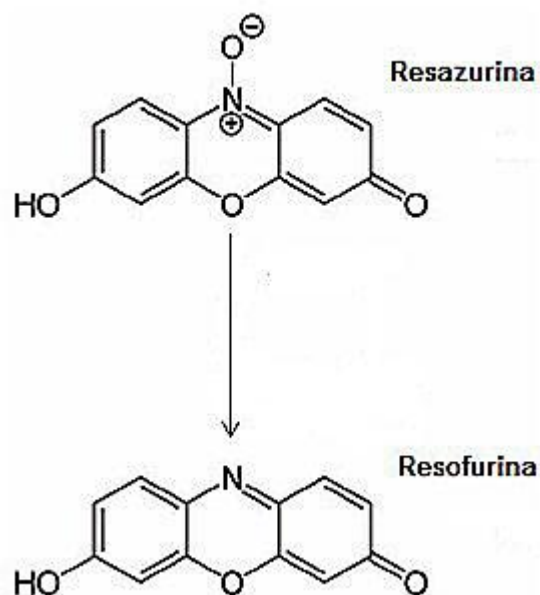
En micobacteriología, el método de las proporciones de Canetti es considerado el estándar de oro por la OMS. Es un método convencional empleado para determinar susceptibilidad a diversos fármacos [20, 21, 48, 49].

Se utiliza medio de Lowenstein-Jensen sin almidón de papa, con los fármacos a probar agregados antes de la coagulación de los lotes y su fundamento es determinar el porcentaje de mutantes resistentes al fármaco antituberculoso a probar, el cual se obtiene al relacionar el número de colonias que crecieron en medio con fármaco con el número que crecieron en el medio libre de fármaco. Si se obtiene un índice mayor a 1% la cepa se considera como resistente al fármaco en cuestión. Existen algunas variantes de este método como la versión del CDC donde además de probar fármacos antituberculosos de primera línea, se incluyen algunos de segunda línea como la kanamicina y la capreomicina. Utiliza placas de agar sólido Middlebrook 7H10 (Becton & Dickinson ®) enriquecido con ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC) que proporciona como ventaja el desarrollo más rápido de las micobacterias que en el Lowenstein-Jensen [48]. Otro método modificado es del *National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine* que utiliza placas de agar sólido Middlebrook 711 (Becton & Dickinson ®) e incluye fármacos de primera y segunda línea con concentraciones superiores a las utilizadas tradicionalmente [48, 49]. El método de las proporciones aporta como ventajas su alta reproducibilidad, su bajo costo, los resultados se correlacionan con las concentraciones críticas reportadas, además de que puede

ser estandarizado para MNT. Sin embargo, es un método tardado para cepas de crecimiento lento, es laborioso y requiere de mucho material.

### 2.3.2 Técnica Alamar Azul (AA)

El Alamar Azul (Invitrogen ®) es un colorante de óxido-reducción, cuyo componente activo es la resazurina, la cual funciona como indicador de crecimiento-viabilidad celular y bajo las condiciones adecuadas de reducción generadas durante la actividad bacteriana, es reducida a resofurina (Figura 9) [45, 92], manifestando un cambio de color azul intenso (no fluorescente) a rosa (fluorescente) que puede ser detectado visualmente, por espectrofotometría y fluorometría [23, 61].



**Figura 9.** Reducción de la resazurina (forma oxidada no fluorescente) a resofurina (fluorescente) por acción del metabolismo bacteriano [92].

La reducción de la resazurina es un método colorimétrico que originalmente fue utilizado en la industria alimentaria para determinar contaminación bacteriana en productos lácteos y cárnicos, también para cuantificar actividad microbiana en sedimentos y en la química clínica para evaluar la calidad del semen [92]. Posteriormente se empleó como indicador de viabilidad en células del sistema inmunológico y se modificó la técnica para determinar susceptibilidad a antifúngicos como fluconazol y anfotericina B en especies patógenas del género *Candida* [72]. En 1995, se realizó el primer ensayo para evaluar drogosensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis* [102] y desde entonces, se han realizado algunas modificaciones; la más útil de ellas fue el diseño de un antibiograma para *M. tuberculosis* adaptando el ensayo en microplacas de 96 pozos para determinar drogosensibilidad en casos de MTB, en el cual pueden probarse diversos fármacos en la misma placa [38, 61] utilizando la forma comercial del colorante (Alamar Blue). Al probar la actividad de una cepa de MNT en presencia de un fármaco, la resistencia a éste se reflejará en el grado de reducción del colorante [38, 102].

El método tiene como ventajas su bajo costo, rapidez, facilidad de interpretación, y permite probar, según las necesidades de la prueba hasta 12 fármacos por placa. Aún no se han reportado ensayos utilizando esta técnica en cepas de micobacterias no tuberculosas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una situación de emergencia con respecto a los casos de micobacteriosis, los cuales se han incrementado en los últimos años debido a enfermedades que comprometen al sistema inmunológico como la epidemia del VIH-SIDA. Frecuentemente se presentan complicaciones en su tratamiento debido a un diagnóstico inicial erróneo, que genera resistencia al tratamiento primario y severas recaídas. Un antibiograma adecuado sirve como guía médica para la selección de antituberculosos de primera y segunda línea, así como para estimar la prevalencia de la resistencia a determinados antibióticos en la población.

En México no hay estudios epidemiológicos suficientes con respecto a infecciones por MNT ni de resistencia a fármacos y al ser un país en vías de desarrollo, en muchas instituciones y centros de salud no se cuenta con los recursos suficientes para poder implementar pruebas de laboratorio comerciales de costos elevados. Tal es el caso del Hospital General de México, incorporado a la Secretaría de Salud, que al ser un centro hospitalario de concentración recibe pacientes de toda la República Mexicana, por lo cual sus servicios son de alta demanda. El Hospital cuenta con su propio laboratorio de micobacterias, en donde se realizan pruebas rutinarias de diagnóstico y drogasensibilidad para tuberculosis, pero no se ha establecido un antibiograma adecuado para los casos de micobacteriosis. Por ello, es necesario considerar la implementación de una técnica que permita determinar eficazmente la susceptibilidad a fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en MNT.

La técnica Alamar Azul ofrece esta ventaja, la tecnología empleada es de bajo costo y sus resultados se obtienen rápidamente en comparación a un método convencional. Por lo tanto, es la opción más adecuada para realizarse como procedimiento de rutina en un laboratorio de micobacterias.



#### 4. OBJETIVOS

**Objetivo general:**

- Estandarizar el microensayo colorimétrico de Alamar Azul para la determinación de sensibilidad a una batería de fármacos potencialmente útiles para el tratamiento clínico de infecciones causadas por MNT.

**Objetivos particulares:**

- Obtener las concentraciones críticas del ensayo al realizar la estandarización del ensayo Alamar Azul paralelamente con el método de las proporciones modificado del *National Jewish Center*.
- Establecer la correlación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) obtenidas en los antibiogramas para los diversos fármacos, con las concentraciones reportadas que se alcanzan a nivel sérico empleadas terapéuticamente.
- Estudiar la variabilidad espectral que se presenta entre cepas de MNT de la misma especie y por grupo, así como determinar los fármacos que poseen mayor actividad contra los principales agentes etiológicos de las micobacteriosis.

- Demostrar la importancia de incluir fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en una misma prueba de susceptibilidad para MNT.
- Evaluar estadísticamente el desempeño de los ensayos de susceptibilidad mediante el análisis de curvas ROC y tablas de contingencia 2x2.
- Iniciar un banco de información que permita enriquecer la epidemiología de las micobacteriosis en México, el cual incluirá una clasificación por el origen y tipo de aislados clínicos, identificación y resistencia a fármacos.

## 5. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### 5.1 Cepas de micobacterias no tuberculosas (MNT)

Se seleccionó un grupo de 30 cepas de MNT (Tabla 12) identificadas previamente por técnicas de biología molecular que corresponden a aislados clínicos del laboratorio de neumología del Hospital General de México (HGM), así como del cepario del laboratorio de Inmunoquímica II de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

**Tabla 12.** Características de las cepas de MNT utilizadas en la estandarización.

No.	Especie	Clasificación de Runyon	Características macroscópicas	Información adicional
C01	<i>M. abscessus</i>	Crecimiento rápido	Colonias pequeñas, blancas, mucoides.	ENCB, IPN.
C02	<i>M. aurum</i>	Escotocromógena	Colonias amarillentas, suaves, escaso desarrollo en LJ.	ENCB, IPN.
C03	<i>M. avium</i>	No cromógena	Colonias pequeñas blancas, suaves.	ENCB, IPN.
C04	<i>M. chelonae</i>	Crecimiento rápido	Colonias grandes, lisas, blancas, mucoides.	ENCB, IPN.
C05	<i>M. duvalii</i>	Crecimiento rápido	Colonias pequeñas, color anaranjado intenso, secas, rugosas.	ENCB, IPN.
C06	<i>M. flavescens</i>	Escotocromógena	Colonias pequeñas, color anaranjado pálido, puntiformes, secas, rugosas.	ENCB, IPN.
C07	<i>M. fortuitum</i>	Crecimiento rápido	Colonias grandes, blancas, planas y rugosas, pleomorfismo en 7H11.	ENCB, IPN.
C08	<i>M. gordonae</i>	Escotocromógena	Colonias anaranjadas, grandes, brillosas y mucoides.	ENCB, IPN.
C09	<i>M. habana</i>	Fotocromógena	Colonias pequeñas, puntiformes, lisas, blancas (sin luz), amarillas (con luz). Pleomorfismo en 7H11.	ENCB, IPN.
C11	<i>M. nonchromogenicum</i>	No cromógena	Colonias blancas, puntiformes, rugosas.	ENCB, IPN.

Tabla 12. Características de las cepas de MNT utilizadas en la estandarización.

No.	Especie	Clasificación de Runyon	Características macroscópicas	Información adicional
C13	<i>M. simiae</i>	Fotocromógena	Colonias pequeñas, lisas, mucoides, blancas (sin luz), amarillentas (con luz). Pleomorfismo en 7H11	ENCB, IPN.
C14	<i>M. smegmatis</i>	Crecimiento rápido	Colonias pequeñas, puntiformes, blancas.	ENCB, IPN.
C15	<i>M. fortuitum</i>	Crecimiento rápido	Colonias grandes, blancas, lisas, mucoides.	ENCB, IPN.
C16	<i>M. fortuitum</i>	Crecimiento rápido	Colonias pequeñas, rugosas, blancas.	ENCB, IPN.
C17	<i>M. chelonae</i>	Crecimiento rápido	Colonias grandes, blancas, lisas, mucoides.	ENCB, IPN.
C18	<i>M. abscessus</i>	Crecimiento rápido	Colonias pequeñas, rugosas, blancas.	ENCB, IPN.
C19	<i>M. abscessus</i>	Crecimiento rápido	Colonias pequeñas, blancas, rugosas.	ENCB, IPN.
C20	<i>M. fortuitum</i>	Crecimiento rápido	Colonias grandes, blancas, lisas, mucoides.	ENCB, IPN.
C28	<i>M. simiae</i>	Fotocromógena	Colonias pequeñas, lisas, blancas (sin luz), anaranjado tenue (con luz). Pleomorfismo en 7H11.	HGM, lavado bronquial.
C29	<i>M. simiae</i>	Fotocromógena	Colonias pequeñas, lisas, rugosas, blancas (sin luz), amarillas (con luz). Pleomorfismo en 7H11.	HGM, lavado bronquial.
C31	<i>M. gordonae</i>	Escotocromógena	Colonias grandes, mucoides, anaranjado tenue.	HGM, biopsia ganglionar.
C32	<i>M. intracellulare</i>	No cromógena	Colonias pequeñas, amarillentas, lisas, mucoides.	HGM, pulmonar.
C33	<i>M. intracellulare</i>	No cromógena	Colonias pequeñas, amarillentas, rugosas.	HGM, lavado bronquial.
C35	<i>M. gordonae</i>	Escotocromógena	Colonias grandes, mucoides, color amarillo intenso.	HGM, orina.

La pureza de las cepas se verificó con la tinción de Ziehl-Neelsen y las resiembras necesarias se realizaron en medio Middlebrook 7H9, enriquecido con OADC (Becton & Dickinson) al 10%. Si alguna cepa resultaba contaminada, se utilizaba el método de Petroff [9] para descontaminarla. Las resiembras viables se mantuvieron en incubación a 37°C por un máximo de 30 días.

## 5.2 Preparación de soluciones *Stock* de fármacos antituberculosos

Se utilizaron fármacos antituberculosos de primera línea: estreptomicina (S), isoniazida (H), rifampicina (R), etambutol (E) y de segunda línea: claritromicina (CLA), amikacina (AK), kanamicina (KN), rifabutina (RIB), ofloxacino (OFL), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) y moxifloxacino (MOX). Se trabajó con sales puras de todos los fármacos (Sigma-Aldrich, Abbott & Abbott ®) exceptuando MOX, para el cual se empleó Avelox I.V. en frasco (Bayer ®).

Para el método de proporciones y Alamar Azul, se prepararon soluciones *Stock* de cada fármaco a una concentración de 1 mg/mL, considerando los datos de marbete del fabricante. En el caso de S, H, E, OFL, CIP, LEV, AK y KN, fueron disueltos en agua estéril (PiSA ®); R y RIB se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), CLA se disolvió en metanol-PBS 1:5 y MOX se diluyó con agua estéril (PiSA ®) de acuerdo a la información de marbete del fabricante. Todas las soluciones ya disueltas se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0.22 µm (Millipore ®), se dividieron en alícuotas de 80, 400 y 800 µL y se almacenaron en congelación a -70°C. Una vez descongelada y utilizada, la solución *Stock* fue eliminada.

## 5.3 Método modificado de las proporciones de Canetti

Se utilizó el método de las proporciones modificado del *National Jewish Center*, el cual permitió cuantificar, por desarrollo colonial, el número de mutantes resistentes que presentó cada cepa con respecto a los agentes antimicrobianos probados [49].

### 5.3.1 Preparación del medio de cultivo

- Medio Middlebrook 7H10 (Becton & Dickinson ®) sin fármaco (controles de crecimiento): se pesó, hidrató y esterilizó la cantidad necesaria para preparar 60 placas de 3 divisiones (Technicare ®) adicionando OADC (Becton & Dickinson ®) al 10% antes de la solidificación del medio (50°C aprox.).
- Medio Middlebrook 7H10 (Becton & Dickinson ®) con fármaco: se prepararon placas de 3 divisiones, siguiendo el mismo procedimiento para los controles de crecimiento, agregando, antes de solidificarse, la dilución de los fármacos necesaria de cada solución *Stock* para obtener 3 concentraciones diferentes [40] (Tabla 13). Éstas fueron dos veces mayores que las utilizadas en el método para *M. tuberculosis*, debido a que las MNT tienen mayor amplitud espectral ante los fármacos utilizados.

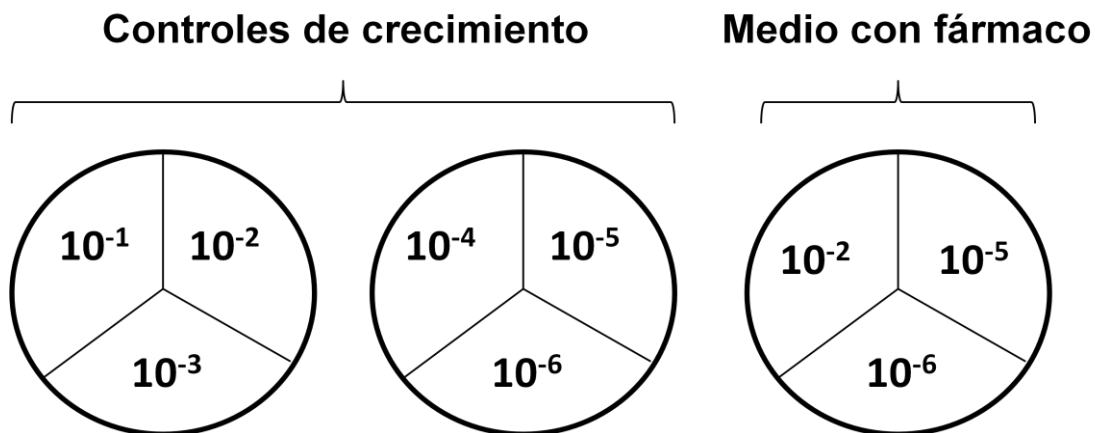
Los lotes de placas con Middlebrook 7H10 fueron preparados con anterioridad y se mantuvieron en refrigeración y protegidos de la luz hasta su uso en un período máximo de 15 días.

**Tabla 13.** Concentraciones de fármacos empleadas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el método de las proporciones modificado para MNT.

Placa	S	H	R	E	CLA	KN	AK	OFL	CIP	MOX	LEV	RIB
1	16	4	4	32	64	40	32	8	8	8	8	4
2	4	1	1	8	16	10	8	2	2	2	2	1
3	1	0.5	0.5	2	4	2.5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

### 5.3.2 Preparación del inóculo y cuenta de placas

Cada cepa se agitó con vórtex durante 90 segundos y de cada una se realizó una suspensión en Middlebrook 7H9 ajustada al tubo 1 de la escala McFarland ( $3 \times 10^6$  bacterias/mL). Partiendo de la suspensión, se realizaron 6 diluciones decimales seriadas en medio Middlebrook 7H9, de tal modo que se tuvieran diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Para los controles, se inocularon 100  $\mu$ L de cada dilución y para los medios con fármaco se inocularon 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  (Figura 10), esperando contar entre 50 y 100 colonias en alguna de ellas. Las placas se incubaron a 37°C, protegidas de la luz y almacenadas en bolsas de plástico. El tiempo de lectura se realizó en períodos de 3 días, hasta un tiempo máximo de 21 días. La cuenta de colonias en los controles y en las placas con fármaco se multiplicó por la dilución utilizada para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Se calculó el porcentaje de mutantes de la población total y aquellas que resultaron mayores a 1% fueron clasificadas como resistentes a ese fármaco [20, 21].



**Figura 10.** Esquema de placas que indican la distribución de las diluciones utilizadas para los inóculos de cada ensayo.

#### 5.4 Microensayos colorimétricos por la técnica Alamar Azul

La técnica está basada en la reducción del colorante Alamar Azul por las micobacterias metabólicamente activas en presencia de determinados agentes antimicrobianos, por lo cual hay un cambio de azul intenso a rosado, implicando la resistencia bacteriana ante el fármaco en cuestión [38, 62]. Bajo este fundamento se adaptó un microensayo en placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar®) incluyendo 4 fármacos antituberculosos de primera línea: S, H, R, E y 8 de segunda línea: CLA, KN, AK, OFL, CIP, MOX, LEV, RIB (Figura 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua	Agua
B	S 16	H 2	R 4	E 64	CLA 64	KN 40	AK 32	CIP 16	MOX 16	LEV 16	OFL 16	RIB 4
C	8	1	2	32	32	20	16	8	8	8	8	2
D	4	0.5	1	16	16	10	8	4	4	4	4	1
E	2	0.25	0.5	8	8	5	4	2	2	2	2	0.5
F	1	0.125	0.25	4	4	2.5	2	1	1	1	1	0.25
G	0.5	0.0625	0.125	2	2	1.25	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.125
H	C	C	C	1:10	1:10	1:10	1:100	1:100	1:100	M	M	M

**Figura 11.** Diseño de placa de Alamar Azul de 96 pozos, antibiograma para MNT. Fila A=pozos con agua. Filas B-G= diluciones seriadas 1:2 de fármacos por columna, partiendo de las concentraciones superiores ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en fila B. Fila H=Controles de crecimiento (por triplicado) de cepa "C", controles de dilución al 10% "1:10", y al 1% "1:100" [61], control de medio "M".



### 5.4.1 Dilución de fármacos

En tubos estériles de 1500  $\mu\text{L}$  se realizaron diluciones de cada fármaco a probar. Las diluciones se efectuaron a partir de las soluciones *Stock* de 1 mg/mL previamente preparadas, para tener 4 veces (4X) la concentración máxima a probar en el microensayo (Tabla 14). Una vez preparadas las 12 soluciones 4X, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de cada una a los pozos de la fila B, de acuerdo al esquema de placa de la figura 11. Por cada 1000  $\mu\text{L}$  de solución 4X se realizaron 9 ensayos por corrida.

**Tabla 14.** Cantidades necesarias para preparar 1000  $\mu\text{L}$  de solución 4X.

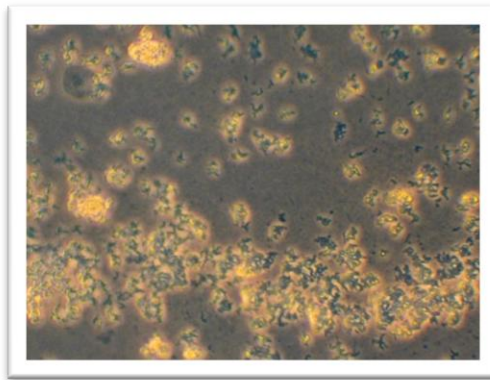
Fármaco	Medio 7H9 + OADC + Tween 80 ( $\mu\text{L}$ )	Stock 1mg/mL ( $\mu\text{L}$ )	Concentración máxima [ $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ] en el ensayo Fila B
S	936	64	16
H	992	8	2
R	984	16	4
E	744	256	64
CLA	744	256	64
KN	840	160	40
AK	872	128	32
OFL	936	64	16
CIP	936	64	16
MOX	936	64	16
LEV	936	64	16
RIB	984	16	4

### 5.4.2 Preparación de la microplaca

- Agua: Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de agua estéril a todos los pozos de la fila A.
- Medio: A cada pozo de las filas B, C, D, E, F, G y H, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC al 10% y Tween 80.

- **Fármacos:** Después de agregar el medio, se añadieron los 100  $\mu$ L de la dilución 4X de cada fármaco en los pozos correspondientes de la fila B, habiendo 200  $\mu$ L de contenido en esta fila. Con la micropipeta multicanal (Finnpipette ®) se realizaron diluciones seriadas 1:2 agitando cuidadosamente el contenido de los pozos 10 veces, tomando 100  $\mu$ L iniciales de la fila B hasta terminar la última dilución seriada de la fila G. Se descartaron los 100  $\mu$ L sobrantes de esta fila [61].
- **Cepa diluida:** Partiendo de la resiembra de la cepa original en Middlebrook 7H9 enriquecida con OADC, se preparó una suspensión bacteriana ajustada al tubo 1 del nefelómetro de McFarland (Suspensión 1). De ésta, se realizó una dilución 1:20 en medio 7H9 enriquecido (Suspensión 2). Todos los pozos de las filas B a la G se inocularon con 100  $\mu$ L de la suspensión 2, obteniendo un volumen total de 200  $\mu$ L en los pozos.
- **Control de la cepa:** Se agregaron 100  $\mu$ L de la suspensión 2 en los pozos marcados con la letra “C” según la figura 10 (pozos H1, H2 y H3).
- **Controles de dilución de cepa:** Los pozos marcados como “1:10” (H4, H5 y H6) fueron inoculados con 100  $\mu$ L de una dilución 1:10 preparada a partir de la suspensión 2 en medio Middlebrook 7H9 enriquecido. Los pozos marcados como “1:100” [61] (H7, H8 y H9) fueron inoculados con 100  $\mu$ L de una dilución 1:100 preparada a partir de la suspensión 2 en medio Middlebrook 7H9 enriquecido.
- **Control de medio:** Se agregaron 100  $\mu$ L de medio Middlebrook 7H9 enriquecido a los pozos marcados como “M” (H10, H11 y H12).

Las placas inoculadas se cubrieron con bolsas de plástico individuales y se incubaron a 37°C, protegidas de la luz solar, con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente, se observaron las placas en el microscopio invertido, en especial los pozos marcados como controles de cepa "C". Si estos presentaron desarrollo abundante (Figura 12) se procedió al revelado de las placas, de lo contrario se continuaron incubando hasta obtener el desarrollo necesario para el revelado. El ensayo se repetía si la placa no contaba con el desarrollo requerido en un máximo de 5 días.



**Figura 12.** Desarrollo abundante en pozo "C", la placa está lista para revelarse.

#### **5.4.3 Revelado de placa e interpretación**

La última etapa consistió en agregar 32 µL de solución reveladora a todos los pozos de la fila B a la H. Esta solución es una mezcla de resazurina (Sigma ®) 0.014% y Tween 80 (JT. Baker ®) al 20%, en proporción de 20 µL y 12 µL por pozo, respectivamente [40]. Las placas se cubrieron con bolsas de plástico individuales, se reincubaron a 37°C durante 24 horas manteniéndose protegidas de la luz solar.

Antes de interpretar se evaluó visualmente el resultado de los controles (fila H). Los pozos de control de cepa “C” cambiaron de color azul intenso a rosado, mientras que los pozos de control de dilución de cepa “1:10” y “1:100” presentaron un revelado parcial cuya coloración oscila del violeta al magenta y los pozos de control de medio “M” se mantuvieron con la tonalidad azul intensa de la resazurina, indicando la esterilidad del medio de cultivo utilizado. Para validar la prueba se debieron haber mostrado los cambios de color mencionados, obteniendo una gama de color que va del rosado al azul intenso (Figura 13).



**Figura 13.** Validación de los controles en el microensayo de Alamar Azul (Fila H). En los pozos “C” se observa la reducción total del colorante cuya coloración es rosada. Los pozos “1:10” y “1:100” presentan reducción parcial al observarse tonalidades que varían del color lila al violeta. Los pozos “M” se observan en color azul intenso, la forma oxidada del colorante; esto implica la esterilidad adecuada del medio de cultivo empleado en las placas.

La interpretación de los resultados se realizó visualmente, tomando en cuenta los cambios de color ocurridos en cada columna correspondiente a su respectivo fármaco. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se reportó como el valor de la concentración mínima en cada columna donde no se presentara un cambio de color de la solución de revelado, de esta manera se definieron los puntos de corte de cada fármaco para las placas. Si toda la columna presentó la reducción del colorante (color rosado), entonces la cepa es resistente a todas las concentraciones del agente antituberculoso incluidas en el microensayo.

## 5.5 Análisis estadístico

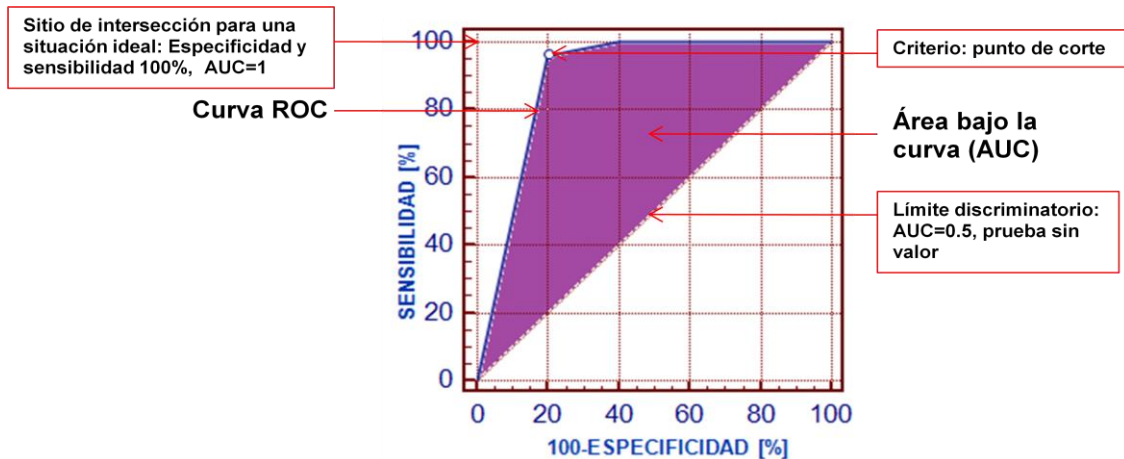
Se evaluaron parámetros como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos, eficiencia, prevalencia y concordancia con los métodos estándar [2]. El análisis estadístico utilizado para la correlación de las pruebas de susceptibilidad a fármacos en el método de la proporciones con el de Alamar Azul fueron obtenidos por tablas de contingencia de 2x2 y también se determinaron las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) y los gráficos de dispersión de valores con el software MedCalc (versión 11.3.0.0, Bélgica).

### 5.5.1 Curvas ROC

La curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) es una herramienta útil para la evaluación de la capacidad diagnóstica de una prueba cuantitativa para todos los posibles puntos de corte. Se determinó con la representación gráfica de cada uno de los valores de especificidad y sensibilidad obtenidos en la prueba [65]. La sensibilidad se representó en el eje de las ordenadas y la especificidad (100-especificidad) en el eje de las abscisas (Figura 14).

La forma en que se evaluaron las curvas es por medio de la capacidad de discriminación, que consiste en calcular el área del polígono que queda bajo la curva ROC, sirviendo como índice de comparación entre las pruebas diagnósticas; cuanto mayor fue el área bajo la curva, mejor fue la capacidad diagnóstica [68]. La situación ideal para una prueba quedaría representada gráficamente por dos líneas cuya intersección estaría localizada en el extremo superior izquierdo del

cuadrado, lo cual representa una sensibilidad y especificidad del 100%, mientras que una prueba no discriminadora correspondería a la línea roja diagonal de la figura 14. Un área con valor de 1 representaría una prueba perfecta y un área de 0.5 sería una prueba sin valor [61, 65].



**Figura 14.** Análisis e interpretación de una curva ROC (MedCalc v. 11.3.0.0). Gráfica y leyendas modificadas por Luis Narvárez Díaz.

### 5.5.2 Tablas de contingencia 2x2

Es un análisis que permitió establecer la validez de la prueba diagnóstica, determinando la sensibilidad, especificidad, valores predictivos, eficiencia, prevalencia y concordancia del método. Los resultados obtenidos de la prueba se clasificaron en 4 grupos según la tabla 2x2 (Tabla 15), donde se pareó el resultado de la prueba diagnóstica (en filas) con el resultado de la prueba de referencia o estándar de oro (en columnas). El resultado de la prueba pudo ser correcto (verdaderos resistentes y verdaderos sensibles) o incorrecto (falsos resistentes y falsos sensibles) [74].

**Tabla 15.** Tabla 2x2 que muestra la relación entre el resultado de sensibilidad y resistencia de una prueba diagnóstica enfrentada al resultado de la prueba de referencia [74].

RESULTADO DE LA PRUEBA	ESTANDAR DE ORO		
	Resistente	Sensible	Total
Resistente	a (verdaderos resistentes)	b (falsos resistentes)	a + b
Sensible	c (falsos sensibles)	d (verdaderos sensibles)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d = n

La validez se obtuvo al calcular los valores de sensibilidad y especificidad. La **sensibilidad** es la probabilidad de que la MNT realmente sea resistente al fármaco en prueba, mientras que la **especificidad** es la probabilidad de que se identifique correctamente a las cepas sensibles al fármaco.

$$\text{Sensibilidad [\%]} = \frac{\text{Verdaderos resistentes}}{\text{Total de casos}} \times 100 = \frac{a}{a+b} \times 100$$

$$\text{Especificidad [\%]} = \frac{\text{Verdaderos sensibles}}{\text{Total de casos}} \times 100 = \frac{d}{b+d} \times 100$$

La tabla de contingencia 2x2 también resultó útil para determinar los valores predictivos y la eficiencia de una prueba diagnóstica, los cuales brindaron información previa acerca del diagnóstico verdadero.

Un **valor predictivo positivo (VPP)** es la probabilidad de que la MNT realmente sea resistente al fármaco cuando el análisis resulte resistente y el **valor predictivo negativo (VPN)** es la probabilidad de que la MNT no sea resistente, es decir, que sea sensible al fármaco cuando el análisis resulte sensible [74,75].

$$\text{VPP [\%]} = \frac{\text{Verdaderos resistentes}}{\text{Verdaderos resistentes} + \text{falsos resistentes}} \times 100 = \frac{a}{a+b} \times 100$$

$$\text{VPN [\%]} = \frac{\text{Verdaderos sensibles}}{\text{Verdaderos sensibles} + \text{falsos sensibles}} \times 100 = \frac{d}{d+c} \times 100$$

La **eficiencia** es la probabilidad de que la prueba diagnóstica acierte en sus conclusiones; es el porcentaje de cepas de MNT clasificadas correctamente [31].

$$\text{Eficiencia [\%]} = \frac{\text{Verdaderos resistentes} + \text{verdaderos sensibles}}{\text{Total de pruebas resistentes y sensibles}} \times 100 = \frac{a+d}{n} \times 100$$

Dentro de la epidemiología, la **prevalencia** es un dato estadístico primordial, el cual permite identificar la relación de enfermos con el número total de casos [37]. Para la prueba diagnóstica en cuestión, este dato representó el índice de cepas resistentes de MNT a un fármaco con respecto a la totalidad de cepas incluidas en el estudio, reportado en porcentaje.

$$\text{Prevalencia [\%]} = \frac{\text{Verdaderos resistentes} + \text{falsos sensibles}}{\text{Total de pruebas resistentes y sensibles}} \times 100 = \frac{a+c}{n} \times 100$$

Otro dato estadístico de utilidad fue la concordancia entre dos pruebas diagnósticas, el cual ayudó a determinar hasta qué punto las pruebas coinciden en su resultado. La **concordancia** se interpretó por medio del índice **kappa (κ)** que



va del 0 al 1 (tabla 16), siendo 1 el valor de máxima concordancia posible y 0 es el valor de concordancia esperado por azar [59, 66].

$$\text{Índice } \kappa = \frac{\text{Concordancia observada (\%)} - \text{Concordancia esperada por casualidad}}{100\% - \text{Concordancia esperada por casualidad}}$$

**Tabla 16.** Interpretación del índice kappa [66].

Valor de kappa	Concordancia
0.00	Por casualidad
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Método de las proporciones

Para cada fármaco se calculó la proporción porcentual de mutantes de la población total y aquellas que resultaron mayores a 1% fueron consideradas como resistentes. Al incluir 3 concentraciones diferentes por cada fármaco en los ensayos, se seleccionó la **concentración crítica** (Tabla 17), la cual es la concentración del fármaco que inhibe a una cepa de MNT, pero que no suprime el crecimiento de una cepa resistente en forma evidente [101].

**Tabla 17.** Selección de concentraciones críticas para los fármacos utilizados por el método de las proporciones.

Fármaco	Concentración Crítica ( $\mu\text{g/mL}$ )
S	16
H	2
R	2
E	32
CLA	4
KN	40
AK	32
CIP	2
MOX	0.5
LEV	8
OFL	8
RIB	1

Todas las concentraciones críticas obtenidas se encuentran incluidas en algún punto del esquema de placa establecido para la técnica de Alamar Azul y se utilizaron para hacer el estudio comparativo estadístico con los microensayos de AA.

### 6.2 Microensayos de Alamar Azul

Se realizaron un total de 30 microensayos de Alamar Azul, con un tiempo máximo de incubación de 3 días. Después de 24 horas y tras aplicar la solución de revelado, se interpretaron visualmente los ensayos (Figura 15), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) para cada cepa, de los fármacos incluidos en la prueba (Tabla 18). Las fotografías correspondientes a los microensayos de Alamar Azul realizados para todas las cepas se encuentran en el apéndice 1 (págs. 84-88).

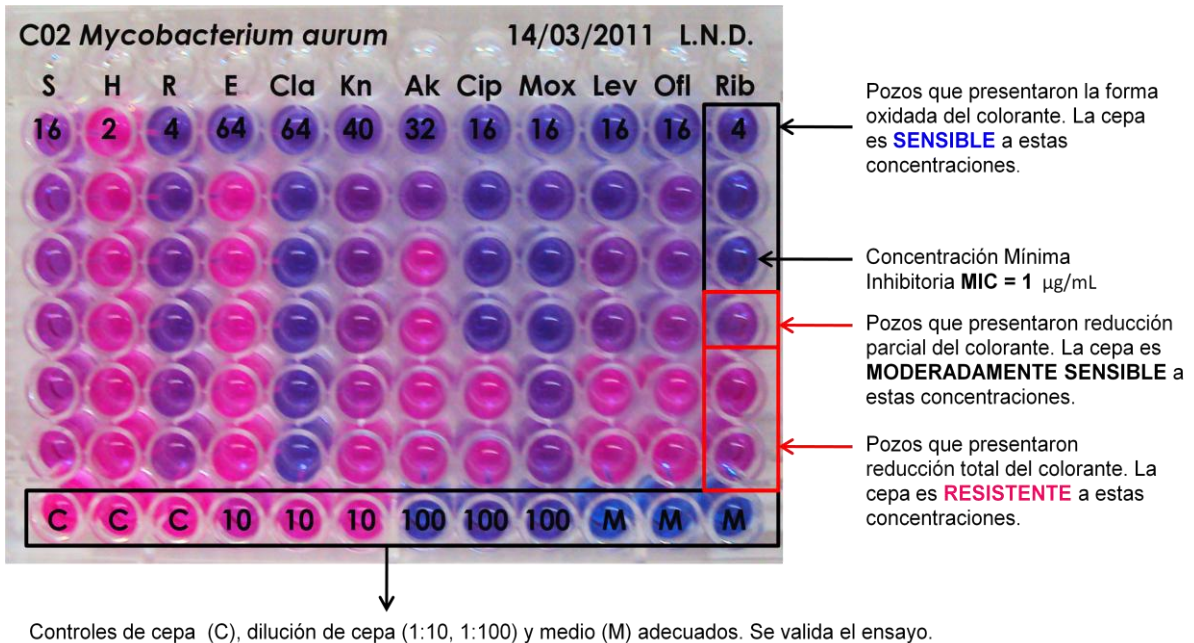


Figura 15. Interpretación de resultados de un microensayo Alamar Azul.

Tabla 18. Interpretación de MICs (µg/mL) para MNT por el método Alamar Azul.

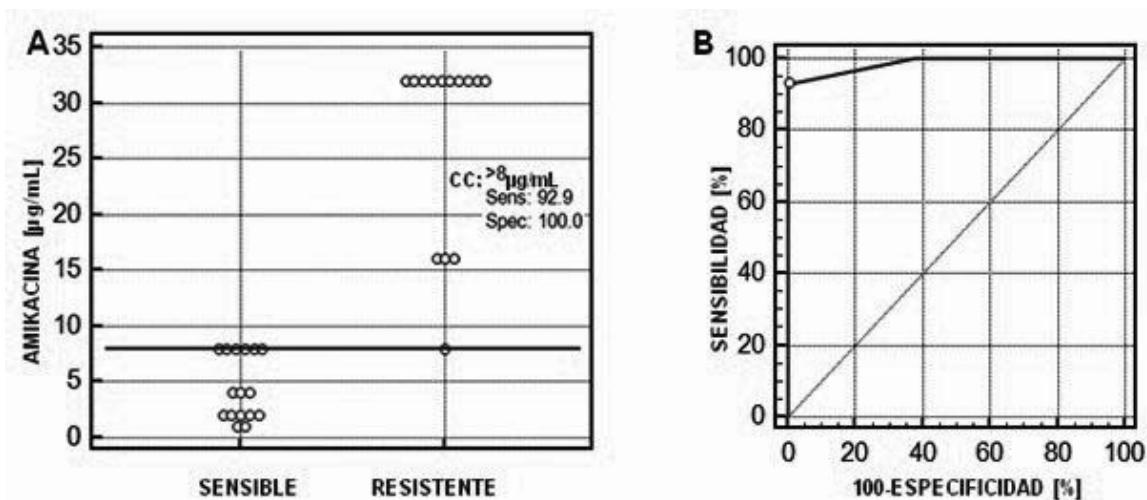
CEPA	S	H	R	E	CLA	KN	AK	CIP	MOX	LEV	OFL	RIB
C01	4	>2	0.5	64	16	10	8	2	1	4	16	0.5
C02	16	>2	0.5	64	2	40	32	2	2	8	16	1
C03	16	>2	4	64	2	20	16	2	1	16	16	4
C04	16	>2	4	64	2	5	2	1	2	8	16	0.25
C05	16	>2	4	32	16	40	4	1	1	1	16	2
C06	16	>2	2	32	2	5	8	1	1	4	4	2
C07	16	>2	4	16	4	10	2	0.5	0.5	0.5	0.5	1
C08	16	>2	4	64	8	10	2	0.5	0.5	1	4	0.5
C09	16	>2	2	32	4	40	32	0.5	1	16	16	1
C11	8	>2	0.5	4	2	10	1	0.5	0.5	4	4	0.5
C13	16	>2	4	32	64	10	2	0.5	0.5	1	2	4
C14	16	>2	2	64	2	40	32	1	1	16	8	2
C15	8	>2	4	64	32	10	2	0.5	0.5	0.5	0.5	4
C16	16	>2	4	32	16	40	16	2	0.5	1	4	4
C17	16	>2	4	32	2	2.5	4	2	2	4	8	4
C18	16	>2	4	64	16	5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	4
C19	16	>2	4	32	8	40	32	2	0.5	4	8	0.5
C20	16	>2	4	16	4	5	4	4	2	4	8	2
C21	16	>2	4	16	8	20	8	1	1	4	8	1
C22	2	>2	0.25	16	2	10	16	8	2	8	16	0.125
C23	16	>2	4	64	4	10	8	4	1	16	16	2
C25	16	2	4	64	4	20	8	16	1	8	16	2
C26	16	>2	4	64	4	5	8	4	1	8	16	4
C27	4	>2	0.25	64	2	5	8	16	2	4	16	0.25
C28	16	>2	4	64	4	40	32	2	1	8	16	4
C29	16	>2	4	64	8	20	32	16	0.5	8	16	4
C31	16	>2	4	64	2	20	32	16	8	16	16	1
C32	16	>2	0.5	64	2	10	32	16	4	16	16	0.125
C33	16	>2	0.5	64	4	20	32	4	1	16	8	0.5
C35	16	>2	4	64	32	40	32	16	8	16	16	2

### 6.3 Análisis estadístico

#### 6.3.1 Curvas ROC y diagrama de distribución de puntos

Para establecer la utilidad del microensayo Alamar Azul, se realizó una comparación estadística con el estándar de oro (método de las proporciones). Para ello, se utilizó el Software MedCalc versión 11.3 y se realizaron las curvas ROC (Figura 15), que representan la especificidad y especificidad conjunta cuya intersección representa el punto de corte ideal para el fármaco que se está probando. También se obtuvieron los diagramas de distribución de puntos, donde se representó la población total de MNT en los ensayos, clasificada por criterio de resistencia y sensibilidad ante los fármacos (Figura 16).

El software determinó parámetros estadísticos como sensibilidad, especificidad, área bajo la curva, valor de p y el intervalo de confianza al 95%, así como los valores de punto de corte para 11 fármacos (Tabla 19). No se incluyó la isoniazida (H) en el tratamiento estadístico, debido a que todas las cepas resultaron resistentes a todas las concentraciones planteadas, por ambos métodos. Las tablas de distribución comparativa de ambos métodos, los gráficos de distribución de puntos, las curvas ROC y los parámetros estadísticos establecidos para todos los ensayos se encuentran agrupados por fármaco en el apéndice 2 (págs. 89-99).



**Figura 16. (A)** Diagrama de distribución de puntos del método Alamar Azul para amikacina; la línea horizontal representa el punto de corte del fármaco (CC>8 µg/mL); los puntos ubicados en el gráfico representan las 30 cepas probadas para cada fármaco y su criterio establecido como sensible o resistente ante el punto de corte. Sens.=Sensibilidad del método. Spec.=Especificidad del método. **(B)** Curva ROC para la determinación de amikacina cuya intersección representa la concentración crítica del fármaco (8 µg/mL).

**Tabla 19.** Parámetros estadísticos y puntos de corte establecidos por curvas ROC para los fármacos probados.

Fármaco	Sensibilidad	Especificidad	Área bajo la curva (AUC)	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	Valor de p	CC (µg/mL)
S	96	80	0.8920	0.1030	0.724 a 0.975	<0.0001	8
R	90.91	100	0.9940	0.0069	0.874 a 1.0	<0.0001	2
E	93.33	73	0.8200	0.0738	0.637 a 0.935	<0.0001	32
CLA	100	100	1.00	0.0000	0.884 a 1.0	0.0000	2
KN	100	100	1.00	0.0000	0.884 a 1.0	<0.0001	20
AK	92.86	100	0.9870	0.0141	0.860 a 1.0	<0.0001	8
CIP	100	100	1.00	0.0000	0.884 a 1.0	0.0000	2
MOX	100	90.91	0.9760	0.0245	0.843 a 1.0	<0.0001	0.5
LEV	88.24	100	0.9730	0.0204	0.838 a 1.0	<0.0001	4
OFL	100	87.50	0.9370	0.0427	0.785 a 0.993	<0.0001	8
RIB	95.24	88.89	0.9740	0.0221	0.839 a 1.0	<0.0001	0.5

CC=Concentración crítica. Valor de p=significancia.

### 6.3.2 Tablas de contingencia

Para su elaboración se clasificaron los resultados del método de las proporciones modificado, estableciendo un valor de “0” a todas las cepas sensibles y “1” a las resistentes, con respecto a las concentraciones críticas obtenidas de cada fármaco. Los puntos de corte que se obtuvieron con las curvas ROC se utilizaron para clasificar los resultados de los microensayos de Alamar Azul, asignando la letra “S” a todas las cepas con MIC menor al punto de corte y “R” a aquellas que resultaron con MIC igual o mayor a esta valor. De este modo se cuenta con tablas de distribución de resultados por criterio para cada fármaco (Apéndice 2, tablas 22- 32, págs. 89-99).

La finalidad de las tablas de contingencia 2x2 fue evaluar estadísticamente el desempeño de las determinaciones, enfrentando el microensayo de Alamar Azul con el estándar de oro como referencia, obteniendo valores predictivos, eficiencia, prevalencia e índice de concordancia del método (Tabla 20).

### 6.3.3 Evaluación general de la actividad de los fármacos

En base a las concentraciones críticas obtenidas por el análisis estadístico de las curvas ROC (Tabla 19) se evaluó la actividad de los fármacos contra el grupo de cepas. De tal modo que los valores superiores o iguales a las concentraciones críticas implicaron la resistencia de la cepa y los menores resultaron susceptibles al fármaco (Tabla 21). El gráfico muestra la relación porcentual de sensibles y resistentes obtenidas para cada fármaco (Figura 17).

**Tabla 20.** Tablas de contingencia 2x2 para la evaluación del método de Alamar Azul (AA) comparado contra el método de las proporciones (MP).

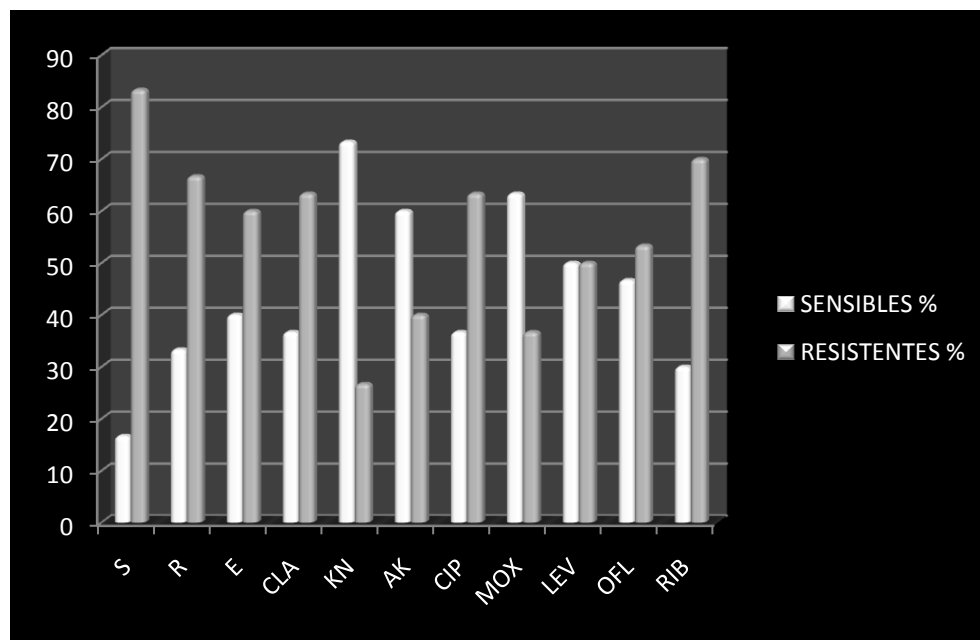
AA	MP			VPP (%)	VPN (%)	EFI (%)	PREV (%)	K	Fuerza de Concordancia
<b>Ofloxacino</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	87.5	100	93.33	46.67	0.77	Buena
R	14	2	16						
S	0	14	14						
Total	14	16	30						
<b>Moxifloxacino</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	95	100	96.67	63.33	0.87	Muy buena
R	19	1	20						
S	0	10	10						
Total	19	11	30						
<b>Ciprofloxacino</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	100	100	100	36.67	1	Muy buena
R	11	0	11						
S	0	19	19						
Total	11	19	30						
<b>Levofloxacino</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	100	86.67	93.33	56.67	1	Muy buena
R	15	0	15						
S	2	13	15						
Total	17	13	30						
<b>Clarithromicina</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	100	100	100	63.33	1	Muy buena
R	19	0	19						
S	0	11	11						
Total	19	11	30						
<b>Kanamicina</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	100	100	100	26.67	1	Muy buena
R	8	0	8						
S	0	22	22						
Total	8	22	30						
<b>Amikacina</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	100	94.12	96.67	46.67	1	Muy buena
R	13	0	13						
S	1	16	17						
Total	14	16	30						
<b>Rifabutina</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	95.24	88.89	93.33	70	0.84	Muy buena
R	20	1	21						
S	1	8	9						
Total	21	9	30						
<b>Estreptomicina</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	95.83	83.33	93.33	80	0.79	Buena
R	23	1	24						
S	1	5	6						
Total	24	6	30						
<b>Etambutol</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	77.78	91.67	83.33	50	0.56	Moderada
R	14	4	18						
S	1	11	12						
Total	15	15	30						
<b>Rifampicina</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>	100	80	93.33	73.33	1	Muy buena
R	20	0	20						
S	2	8	10						
Total	22	8	30						

R= Resistente. S= Sensible. VPP= Valor predictivo positivo. VPN= Valor Predictivo Negativo. EFI= Eficacia. PREV= Prevalencia.  $\kappa$ = índice de concordancia. Fuerza de concordancia: de acuerdo con el índice  $\kappa$  (Tabla 16).



**Tabla 21.** Relación porcentual de sensibilidad y resistencia del grupo estudiado de MNT.

Fármaco	Sensibles %	Resistentes %
S	16.67	83.33
R	33.33	66.67
E	40	60
CLA	36.67	63.33
KN	73.33	26.67
AK	60	40
CIP	36.67	63.33
MOX	63.33	36.67
LEV	50	50
OFL	46.67	53.33
RIB	30	70



**Figura 17.** Gráfica que muestra la actividad de los fármacos antituberculosos estandarizados, en base a porcentajes de resistencia y sensibilidad de las cepas estudiadas de MNT.

## **7. DISCUSIÓN**

El incremento de casos clínicos de micobacteriosis es un reto actual en la rama de la Infectología; ha presentado complicaciones tales como diagnóstico inicial erróneo, frecuentes recaídas y dificultades en el tratamiento; por ello se ha impulsado el desarrollo de nuevas metodologías para el diagnóstico y mejora del esquema terapéutico del paciente [19]. Junto con la identificación clínica de infecciones por MNT, las pruebas de susceptibilidad a fármacos han tenido una mayor demanda en los servicios de salud. Tan sólo en el Laboratorio de neumología del Hospital General de México, las solicitudes autorizadas para pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos se han incrementado un 150% del 2009 a la fecha. Los métodos convencionales disponibles no satisfacen las necesidades de la demanda actual. El método de las proporciones de Canetti que se realizó en este trabajo, a pesar de su alta confiabilidad al ser un método estandarizado y recomendado por diversas instituciones y organismos de salud internacionales [48, 69], fue laborioso al requerir la preparación de mucho material y medio de cultivo, tardado y poco práctico. Por estas circunstancias se debe aprovechar la variedad de métodos alternativos disponibles para determinar susceptibilidad a fármacos; algunas técnicas denominadas “novedosas” o “rápidas” como el ensayo de Alamar Azul, ofrecen como mayor ventaja el menor tiempo para la obtención de resultados. Al aplicar este método, el tiempo máximo de incubación que se necesitó fue de 4 días. La interpretación visual de las pruebas resultó muy sencilla; se adaptaron tres controles de crecimiento, un control “C” que tiene la misma cantidad de cepa diluida que los pozos de prueba,

controles de dilución de cepa “1:10” y “1:100” [61]. Al revelarse las placas, dichos controles permiten observar los gradientes de reducción del colorante, que van de un color rosado (muy resistente) al violeta (moderadamente resistente), lo cual permite establecer sin complicación el límite de resistencia y sensibilidad, al localizar la MIC en el pozo de menor concentración de fármaco donde se observe el colorante en su estado oxidado (azul).

Para establecer la utilidad y el desempeño del microensayo AA se realizó el análisis de curvas ROC y tablas de contingencia 2x2 comparando este método con el estándar de oro (MP), obteniéndose diversos parámetros estadísticos resumidos en las tablas 19 y 20. Los parámetros de las curvas ROC, fueron clasificados como valores excelentes (0.91-1.00), buenos (0.81-0.90), regulares (0.71-0.80), pobres (0.61-0.70) y deficientes (0.51-0.60). El área bajo la curva (AUC) representó el funcionamiento global de la prueba para cada fármaco en relación con su sensibilidad y especificidad [78], cuyo valor máximo fue de 1.0 para claritromicina, kanamicina y ciprofloxacino, y el menor correspondió al etambutol con 0.82. Se obtuvo un valor de  $p < 0.0001$  en todos los ensayos, por lo tanto no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Con la sensibilidad y especificidad porcentual del método se logró confirmar la veracidad de las cepas sensibles a los fármacos: el valor excelente de detección (100%) fue para claritromicina y ciprofloxacino en ambas determinaciones. El valor menor de sensibilidad fue para levofloxacino con 88.24% lo cual implica que un 11.76% de los resultados que implican sensibilidad no correspondan a una cepas

verdaderamente sensibles. El valor más bajo de especificidad fue el del etambutol, que contó con un 73% de detección correcta de aislados sensibles.

En general, los valores estadísticos más bajos correspondieron al etambutol, debido a la gran diferencia que se obtuvo de las MICs para las 30 cepas (desde 4 µg/mL a >64 µg/mL) por el método de prueba y el estándar de oro. La concentración crítica del **etambutol** en este estudio fue de 32 µg/mL, muy alta en comparación a los valores séricos reportados de hasta 11.94 µg/mL [103]. Se han reportado valores del fármaco en sitios de inflamación pulmonares que van de 3 a 10 veces más que los séricos, lo cual puede dar un indicio de su efectividad [32]. En varios estudios farmacocinéticos se han obtenido valores séricos menores a los esperados por la dosis diaria recomendada [76, 77, 103] y no se ha logrado atribuir a una razón en específico. Sin embargo, la efectividad del etambutol no se limita a este parámetro. Se ha demostrado que es un fármaco sinergista excelente en administración conjunta con macrólidos y rifamicinas [28, 53]. También confiere un efecto protector para evitar la resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea por lo cual es administrado en dosis más altas si hay una resistencia a isoniazida y/o rifampicina [6, 103]. En la figura 17 se demuestra que el etambutol fue el fármaco de primera línea más efectivo contra las MNT estudiadas. Las MNT que poseen resistencia natural al etambutol son las del complejo MAC [85], lo cual se comprobó con las cepas de MAC que se trabajaron en este protocolo. A pesar de esta resistencia, un tratamiento combinado de etambutol con claritromicina y rifabutina resulta muy eficaz contra aislados de MAC y algunas MNT de

crecimiento lento [85, 103] por lo que el etambutol no debe ser descartado de las pruebas de susceptibilidad.

La rifampicina y la estreptomina también son antituberculosos de primera línea efectivos contra micobacteriosis. La **rifampicina** fue la más efectiva de la batería de primera línea después del etambutol. Su concentración crítica obtenida en el ensayo fue de 2 µg/mL; se correlaciona adecuadamente con los valores de MICs reportados para MNT de crecimiento lento (0.12-16.0 µg/mL) y es menor que los valores máximos séricos alcanzados (4-32 µg/mL) según la dosis recomendada [49, 52, 55]. La rifampicina se utiliza en combinación con fármacos de primera línea (S, H y E) más segunda línea (rifabutina, claritromicina, macrólidos) para tratar infecciones por MNT de crecimiento lento, como la linfadenitis ocasionada por MAC o *M. scrofulaceum* [19]. Hubo cepas de crecimiento lento sensibles a rifampicina en este ensayo: *M. scrofulaceum*, *M. flavescens*, *M. aurum*, *M. nonchromogenicum* y todas las *M. intracellulare*. También resultaron sensibles algunas MNT de crecimiento rápido como *M. smegmatis* y algunas cepas de *M. abscessus*.

Por otra parte, la **estreptomina** resultó con una concentración crítica de 8 µg/mL, que cae dentro del rango máximo alcanzado en suero (35-45 µg/mL) [104] y se correlaciona también con las MICs reportadas que van de 1-8 µg/mL [49]. Este fue el fármaco con menor cantidad de cepas sensibles como se observa en la figura 17. Usualmente se emplea junto con el resto de la primera línea para tratar infecciones con MNT de crecimiento lento. Para micobacteriosis causadas por

MNT de crecimiento rápido se prefiere utilizar otros aminoglucósidos como la amikacina, capreomicina y kanamicina [3, 18].

Precisamente el fármaco que resultó con mejor actividad en general para las cepas incluidas en este trabajo fue la **kanamicina**. También se obtuvieron excelentes parámetros estadísticos en su estandarización (Apéndice 2 pág. 94). Es un aminoglucósido cuya concentración máxima alcanzada en suero es de 35-45 µg/mL [58, 84] la cual está correlacionada con la concentración crítica de 20 µg/mL obtenida en el ensayo así como con las MICs reportadas que alcanzan un máximo de 40 µg/mL [47]. Debido a su alta toxicidad, en ocasiones no puede ser administrada a los pacientes en estado de salud muy deteriorado por lo que se puede optar por la **amikacina** para el tratamiento. La AK comparte varias similitudes con la kanamicina; es ligeramente menos tóxica, tiene una actividad similar, también es eficaz contra MNT de crecimiento rápido como *M. chelonae*, *M. abscessus*, y *M. fortuitum* [19, 44], lo cual se comprobó en este trabajo al ser uno de los fármacos con mayor actividad en general y al inhibir MNT de crecimiento rápido. Su concentración alcanzada en suero llega a 34 µg/mL [52, 81], que correlaciona con la concentración crítica de 8 µg/mL obtenida en este ensayo y MICs de hasta 32 µg/mL [50].

La mejor alternativa de tratamiento para diversos tipos de micobacteriosis, incluyendo los casos complicados, es el uso de la **claritromicina** en el esquema de tratamiento. Es un macrólido que se incluyó en la estandarización, del cual se obtuvieron excelentes parámetros con las curvas ROC y tablas de contingencia (Apéndice 2 pág. 93). La concentración crítica fue de 2 µg/mL, correlacionada con

la concentración máxima alcanzada en suero que es de 2-7 µg/mL [63, 58] y MICs reportadas de hasta 4 µg/mL para MNT de crecimiento lento y es el fármaco recomendado como primera opción para infecciones por MAC [70]. Se observaron cepas de MNT de crecimiento lento sensibles a CLA, como *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. flavescens*, *M. nonchromogenicum*, *M. avium* así como MNT sensibles de crecimiento rápido, lo que demostró el amplio espectro que posee este fármaco. No se recomienda evaluar a la CLA en una prueba de drogasensibilidad inicial, sino hasta que se sospeche de resistencia, si hubo un tratamiento de 6 meses y la infección prevalece, o bien, cuando ya hubo un fracaso al tratamiento inicial y también cuando el paciente no puede tolerar los fármacos de primera línea. No obstante, se presentó un caso en el Hospital General, de un paciente VIH positivo con tuberculosis y micobacteriosis, al cual se le administró el esquema de primera línea por un año y claritromicina por seis meses. Al realizar la prueba de susceptibilidad por AA transcurrido este tiempo, el resultado indicó resistencia a claritromicina, por lo cual se modificó el tratamiento, incluyendo quinolonas y un régimen aumentado de etambutol para su mejoría.

Otros macrólidos que se pudieran emplear alternativamente a la claritromicina son la azitromicina y la roxitromicina; resultan una buena opción por ser bien tolerados; no requieren de ajustar dosis que difiera de aquella establecida para el tratamiento contra tuberculosis, por lo que la concentración sérica no excede los límites de seguridad. Además son de mayor eficacia que otros fármacos de segunda línea y presentan interacciones muy limitadas con otros fármacos [56, 70]. CLA, en administración conjunta con rifabutina, ha aportado excelentes resultados para

tratar micobacteriosis ocasionadas por MAC y también es efectiva como profilaxis [11]. La **rifabutina** es una rifamicina cuyo valor máximo alcanzado en suero es de 0.3-0.9 µg/mL [58, 70] y sus MICs están correlacionadas con la concentración crítica de 0.5 µg/mL que resultó en la estandarización del ensayo.

Uno de los propósitos del trabajo fue analizar la actividad de las fluoroquinolonas de uso terapéutico más frecuente para infecciones por MNT. Se obtuvieron resultados muy interesantes, pues ninguna coincidió en su concentración crítica al ser estandarizadas. La de mejor actividad contra MNT fue el **moxifloxacino**, su concentración crítica fue de 0.5 µg/mL, perfectamente correlacionada con las MICs de 0.5 µg/mL [36, 86] y se ubica dentro del rango terapéutico, ya que la concentración máxima alcanzada es de 4.3 µg/mL [60, 70]. Al ser una quinolona de cuarta generación, posee un amplio espectro contra diversas bacterias y, en este caso, resultó ser muy efectiva contra las MNT de crecimiento rápido, en especial para todas las cepas de *M. fortuitum* incluidas en este estudio. El **ciprofloxacino** también resultó una quinolona de muy buena actividad y con una excelente correlación entre los dos métodos (Apéndice 2, pág. 91). El punto de corte obtenido fue 2 µg/mL, está correlacionado con la concentración máxima alcanzada de 2.4 µg/mL [60, 70] y MICs que oscilan entre 0.5 y 2 µg/mL [50, 70, 86]. Al igual que MOX, CIP también demostró su amplio espectro al poseer actividad en contra de MNT de crecimiento rápido y lento. **Levofloxacino** fue la quinolona que obtuvo valores menores de correlación en la comparación estadística de los métodos (Apéndice 2, pág. 92) y su punto de corte fue de 4 µg/mL; hay correlación con el valor máximo alcanzado en suero que es de 6.2



$\mu\text{g/mL}$  [60, 70] y con MICs que tienen un rango de 1-4  $\mu\text{g/mL}$  [58]. Su actividad fue menor que MOX y CIP, pero resultó eficaz contra todas las cepas de *M. fortuitum* y *M. duvalii* incluidas en la estandarización del método. El **ofloxacino** tuvo similar actividad a LEV y su concentración crítica fue de 8  $\mu\text{g/mL}$ , la cual supera al valor de concentración máxima en suero (3  $\mu\text{g/mL}$ ) [60, 70] y a los valores reportados de MICs que van de 0.5 a 3  $\mu\text{g/mL}$  [60], sin embargo, hubo cepas en el ensayo que tuvieron valores similares de MIC, como *M. habana*, *M. nonchromogenicum* y varias cepas de *M. fortuitum*. Las quinolonas resultaron ser la mejor alternativa para tratar micobacterias de crecimiento rápido como *M. fortuitum* y también tienen su uso terapéutico contra infecciones pulmonares por MAC y *M. kansasii* [3, 19].

El único fármaco al que la mayoría de las cepas estudiadas resultaron resistentes fue la **isoniazida**. Por su uso profiláctico y como opción terapéutica de primera línea, se considera el fármaco antituberculoso que genera rápidamente mayor resistencia adquirida en cepas de MNT como *M. kansasii*, *M. malmoense* y MAC; por ello las determinaciones de sus MICs en ensayos de sensibilidad son fluctuantes [3, 19] y varían desde 0.6 a  $>12 \mu\text{g/mL}$  [49, 50], el cual es un rango muy amplio y complicó su estandarización por AA. La isoniazida es utilizada en tratamientos contra MNT de crecimiento lento como MAC, con resultados favorables [18] y normalmente no es considerada una buena opción para incluirse en pruebas de drogasensibilidad para MNT [3], pero debe ser incluida para casos nuevos de micobacteriosis (sin tratamiento antituberculoso previo). Es por ello que el uso de las pruebas de susceptibilidad es controversial; las MICs y algunos valores referentes son de rango muy amplio, lo que complica la estandarización de

una técnica que incluya todos los fármacos a sus diferentes concentraciones. Las pruebas comerciales disponibles son para primera línea y no están estandarizadas adecuadamente para todos los fármacos de segunda línea. El AA resulta una buena alternativa; se pudieron ajustar los valores de casi todos los fármacos de interés para MNT, se obtuvieron puntos de corte racionales y correlacionados con valores farmacocinéticos alcanzados en suero, es una técnica económica, requiere de poco material y es de fácil interpretación. El resultado de las pruebas de sensibilidad representa una herramienta que orienta al médico para establecer un tratamiento individualizado que considere a la etiología y evolución clínica del paciente. Aún se debate sobre la utilidad de una prueba de susceptibilidad ante un nuevo caso, o solamente para casos complicados y recaídas; esto depende del historial clínico y los signos evolutivos de la enfermedad. En el laboratorio de neumología del Hospital General se realizó una prueba de susceptibilidad por AA a un aislado clínico de médula ósea identificado como *M. avium*, el cual resultó resistente al esquema inicial de tratamiento pero sensible a todos los fármacos de segunda línea. También se identificaron dos pacientes con *M. simiae* (figura 42, C28 y figura 43, C29), con cultivos positivos repetidos y antecedentes de tuberculosis pulmonar. El esquema de segunda línea se determinó por AA, pero para C29 no se llevó a cabo la corrección terapéutica, porque cedieron los síntomas de la enfermedad.

La implementación de los microensayos de AA como prueba de rutina, se ha llevado a cabo gradualmente, obteniendo resultados muy favorables.

## 8. CONCLUSIONES

- La técnica Alamar Azul se estandarizó para 11 fármacos antituberculosos de primera y segunda línea, estableciendo los puntos de corte con el análisis estadístico de las curvas ROC.
- Los puntos de corte obtenidos correlacionan con los valores séricos máximos alcanzados clínicamente, incluso en valores menores, lo que demuestra la utilidad del microensayo AA como orientativo para el tratamiento de micobacteriosis.
- Los fármacos de primera línea: rifampicina, estreptomycin y etambutol no deben ser descartados de la prueba de susceptibilidad. El último presentó mayor actividad. Todas las MNT estudiadas resultaron resistentes a isoniazida. Los fármacos de segunda línea con mayor actividad contra MNT fueron kanamicina y moxifloxacino.
- Los aislados clínicos de *Mycobacterium fortuitum* fueron sensibles a todas las quinolonas, mientras que los del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) fueron resistentes a este grupo de fármacos. Todos los aislados de la especie *Mycobacterium abscessus* resultaron sensibles a rifampicina pero mostraron una variabilidad en su susceptibilidad a las quinolonas, los aminoglucósidos y la claritromicina.
- Con un total de 30 cepas se logró iniciar un banco de información de MNT que incluye su patrón de sensibilidad a los fármacos antituberculosos utilizados en este trabajo.

- La técnica AA estandarizada para determinar patrones de sensibilidad en MNT resulta una alternativa confiable con valores elevados de sensibilidad y especificidad. El tiempo en que proporciona resultados no es mayor a 4 días, lo que lo hace un microensayo rápido, económico y de metodología sencilla, que puede ser implementado en instituciones de salud y en laboratorios de diagnóstico de infecciones causadas por micobacterias.

## 9. PERSPECTIVAS

- Se propone ampliar la batería de fármacos incluyendo amoxicilina / ácido clavulínico, linezolid, capreomicina, azitromicina, roxitromicina, cicloserina, clofazimina, doxiciclina e imipenem.
- Sería importante estandarizar y desarrollar ensayos de sinergismo probando los fármacos de mayor actividad contra MNT, según los resultados obtenidos (etambutol, kanamicina, moxifloxacino, claritromicina).
- Se recomienda ampliar el banco de información epidemiológica sobre las micobacteriosis en México, realizando pruebas de susceptibilidad a todas las cepas de MNT aisladas clínicamente, mediante la técnica de AA estandarizada en este trabajo.

---

**10. REFERENCIAS**

1. Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., vanHelden, P.D., Warren, R.M., Grey-vanPittius, N.C., (2010). *Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi*. *Emerg. Infect. Dis.* 16(8): 1296-1299.
2. Altamirano, M., Cano, V., García, R. (1999). *Epidemiología Clínica. México: Interamericana*. McGraw-Hill, tercera ed., pp. 143-168.
3. American Thoracic Society (1997). *Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: S1-S25.
4. American Thoracic Society (1990). *Diagnostic standards and classification of tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:725-735.
5. American Thoracic Society (1990). *Diagnosis and treatment of disease caused by non tuberculous mycobacteria*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:940-953.
6. American Thoracic Society / Centers for Disease Control and Prevention / Infectious Diseases Society of America, (2003). *Treatment of tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167: 603–662.
7. Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov: a*

- taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (3): 1263-73.
8. Balandrano, S., Anzaldo, G. (2003). *Manual de Técnicas de Laboratorio para el examen baciloscópico*. México: Secretaría de Salud, InDRE. Pp. 13-28.
  9. Balandrano, S., Anzaldo, G., Peña, G., Betancourt, X. (1996). *Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR. Tuberculosis* .México: Secretaría de Salud. Pp. 42-48.
  10. Belisle, J.T., Brennan, P.J. (2000). *Encyclopedia of microbiology: Mycobacteria*. San Diego, Estados Unidos: Academic Press, vol 3.
  11. Benson, C.A., Williams, P.L., Cohn, D.L., Becker, S., Hojczyk, P., Nevin, T., Korvick, J.A., Heifets, L., Child, C.C., Lederman, M.M., Reichman, R.C., Powderly, W.G., Notario, G.F., Wynn, B.A., Hafner, R. (2000). *Clarithromycin or rifabutin alone or in combination for primary prophylaxis of Mycobacterium avium complex disease in patients with AIDS: a randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. J. Infect. Dis.* 181:1289–1297.
  12. Blancarte, L.M, Campos, B., Serna, S. (1982). *Micobacterias atípicas en la República Mexicana*. Salud Pública de México. Vol. 24, 329-340.
  13. Bolan, G., Reingold, A.L., Carson, L.A, Silcox, V.A., Woodley, C.L, Hayes, P.S., Hightower, A.W., McFarland, L., Brown, J.W., Peterson, N.J., Favero, M.S., Good, R.C., Broome, C.V. (1985). *Infections with Mycobacterium chelonae in patients receiving dialysis and using processed hemodialyzers. J. Infect. Dis.* 152:1013–1019.

14. Brennan, P.J. (2003). *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 83: 91-97.
15. Brown-Elliott, B.A., Griffith, D.E., Wallace, R.J. (2002). *Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria*. Infect. Dis. Clin. America 16:187-220.
16. Butler, W.R., Guthertz, L.S. (2001). *Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of Mycobacterium Species*. Clin. Microbiol. Rev. 14: 704 - 726.
17. Calderón-Jaimes, E. (2011). *Manual de Antibióticos 2011*. Revista Médico Moderno. México: Grupo Percano de Editoras Asociadas, año 48, no.5.
18. Caminero, J.A., Medina, M.V., Rodríguez, F., Cabrera, P. (1998). *Tuberculosis y otras micobacteriosis. Manual de Neumología y Cirugía Torácica*. Madrid, España: Editores Médicos SA, capítulo 83: 1389-1419.
19. Caminero, J.A. (2003). *Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas*. París, Francia: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICter).
20. Canetti, G., Froman, S., Grosset, J., Hauduroy, P., Langerova, M., Mahler, H.T., Meissner, G., Mitchison, D.A., Sula, L. (1963). *Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance*. Boletín OMS, 29, 565.
21. Canetti, G., Fox, W., Khomenko, A., Mahler, H.T., Menon, N.K., Mitchison, D.A., Rist, N., Smelev, N.A. (1969). *Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis programmes*. Boletín OMS, 41, 21.

22. Chun-Ta, H., Yi-Hu, T., Yung-Chao, L., Jann-Yuan, W., Chong-Jen, Y., Li-Na, L., Pan-Chyr, Y. (2010). *Clinical significance of isolation of nontuberculous mycobacteria in pulmonary tuberculosis patients*. *Resp. Med.* 103: 1484-1491.
23. Collins, L., Franzblau, S.G. (1997). *Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(5): 1004-1009.
24. Cooksey, R.C., de Waard, J.H., Yakrus, M.A., Rivera, I., Chopite, M., Toney, S.R., Morlock, G. P., Butler, W.R. (2004). *Mycobacterium cosmeticum sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2385-2391.
25. Cooksey, R.C., deWaard, J.H., Yarkus, M.A., Toney, S.R., DaMata, O., Nowicki, S., Sohner, K., Koch, E., Petti, C.A., Morey, R.E., Srinivasan, A. (2007). *Mycobacterium cosmeticum, Ohio and Venezuela*. *Emerg. Infect. Dis.* 13(8): 1267-1269.
26. Correa, N.E., Cataño, J.C., Mejía, G.I., Realpe, T., Orozco, B., Estrada, S., Vélez, A., Vélez, L., Barón, P., Guzmán, A., Robledo, J. (2010). *Outbreak of mesotherapy-associated cutaneous infections caused by Mycobacterium chelonae in Colombia*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63(2): 143-145.
27. Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Diignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumárraga, M., Bernardelli, A. (2003). *Tuberculosis in seals caused by a novel member*



- of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(5): 1305-1314.
28. Cynamon, M.H., Klemens, S.P. (1992). *Activity of azithromycin against Mycobacterium avium infection in beige mice.* Antimicrob. Agents Chemother. 36:1611–1613
29. Daley, C., Griffith, D. (2010). *Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections.* Int. J. Tuberc. Lung Dis. 14(6): 665-671, 2010.
30. David, H.L. (1977). *Fundamentals of drug susceptibility testing in tuberculosis.* Atlanta, Estados Unidos: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, CDC. Publicación No. 77-8230-115.
31. Díaz-Martín, A.G., Ferrán-Clúa, J. (2003). *Parámetros de Valoración de las pruebas diagnósticas. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos.* Laboratorio de Diagnóstico Clínico. Madrid, España: segundo curso.
32. Djurovic, V., de-Croix, G., Daumet, P. (1973). *L'ethambutol chez l'homme. Etude comparative des taux serique erythrocytaires et pulmonaires.* Nouv. Press Med. 2:2815.
33. Dostal S., Richter E., Harmsen, D. (2003). *Concise guide to Mycobacteria and their molecular differentiation.* Würzburg, Alemania: Ridom Press.
34. Esteban, J., Fernández, R., Soriano, F. (2000). *Micobacterias de crecimiento rápido en patología humana.* Enferm Infecc Microbiol Clin; 18: 279-286.
35. Falkinham, J. O. (1996). *Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria.* Clin. Microbiol. Rev. 9:177–215.

- 
36. Fenlon, C.H., Cynamon, M.H. (1986). *Comparative In Vitro Activities of Ciprofloxacin and Other 4 Quinolones against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium intracellulare*. Antimicrob. Agents Chemother. 29 (3): 386-388.
37. Fescina, R., Simini, F., Belitzky, R. (1985). *Difusión: Evaluación de los Procedimientos Diagnósticos y aspectos metodológicos*. Salud Perinatal, 2:39-44.
38. Franzblau, S.G., Witzig, R.S., McLaughlin, J.C., Torres, P., Madico, G., Hernández, A., Degnan, M.T., Cook, M.B., Quenzer, V.K., Ferguson, R.M., Gilman, R.H. (1998). *Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate alamar blue assay*. J. Clin. Microbiol. 36:362-366.
39. Galmés-Truyols, A., Giménez-Durán, J., Bosch-Isabel, C., Nicolau-Riutort, A., Vanrell-Berga, J., Portell-Arbona, M., Seguí-Prat, B., Gumá-Torá, M., Martí-Alomar, I., Rojo-Arias, M.A., Ruiz-Veramendi, M. (2011). *An outbreak of cutaneous infection due to Mycobacterium abscessus associated to mesotherapy*. Enferm. Infect. Microbiol. Clin. Junio 16.
40. González-González, H. (2007). *Diagnóstico rápido de tuberculosis*. Tesis de maestría: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
41. Gorocica, P., Jiménez, M.C., Garfias, Y., Sada, I., Lascurain, R. (2005). *Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis*. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. vol.18, n.2:142-153.
-

- 
42. Griffith, D.E., Girard, W.M., Wallace, R.J.Jr. (1993). *Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients.* Am. Rev. Respir. Dis; 147: 1271-1278.
43. Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von Reyn, C. F., Wallace, R. J. Jr., Winthrop, K. (2007). *An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 175: 367-416
44. Gwan-Han, S., Bo-Da, W., Shiau-Ting, H., Chen-Fu, L., Kun-Ming, W., Jiann-Hwa, C. (2010). *High efficacy of clofazimine and its synergistic effect with amikacin against rapidly growing mycobacteria.* Int. J. Antimicrob. Agents. 35: 400-404.
45. Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). *Comparison of Alamar Blue and MTT assays for high through-put screening.* Toxicol. In Vitro 18:703-10.
46. Hee-Jung, J., Kyeongman, J., Sang-Won, U., Jung-Kwon, O., Nam-Yong, L., Won-Jung, K. (2009). *Nontuberculous mycobacteria isolated during the treatment of pulmonary tuberculosis.* Resp. Med. 103: 1936-1940.
47. Heifets, L, Lindholm-Levy, P. (1989). *Comparison of Bactericidal Activities of Streptomycin, Amikacin, Kanamycin, and Capreomycin against Mycobacterium avium and M. tuberculosis.* Antimicrob. Agents Chemother.33(8):1298-1301

- 
48. Heifets, L. (1991). *Drug Susceptibility in the Chemotherapy of mycobacterial infections*. Estados Unidos: CRC Press.
49. Heifets, L. (2000). *Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. En: Bastian, I., Portaels, F., ed., *Multidrug-resistant tuberculosis*. Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publications; 90-99.
50. Heifets, L. (1988). *MIC as a quantitative measurement of susceptibility of M. avium to seven antituberculosis drugs*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(8):1131-1136.
51. Hoffman, P.C., Fraser, D.W., Robicsek, F., O'Bar, P.R., Mauney, C.U. (1981). *Two outbreaks of sternal wound infections due to organisms of the Mycobacterium fortuitum complex*. *J. Infect. Dis.* 143:533–542.
52. Holdiness, M.R. (1984). *Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs*. *Clin. Pharmacokin.* 9: 108.
53. Ji, B., Lounis, N., Truffot-Pernot, C., Grosset, J. (1994). *Effectiveness of various antimicrobial agents against Mycobacterium avium complex in the beige mouse model*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2521–2529.
54. Katoch V.M. (2004). *Review article infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM)*. *Indian. J. Med. Res.*, 120: 290-304.
55. Kenny, M.T., Strates, B. (1981). *Metabolism and pharmacokinetics of the antibiotic rifampin*. *Drug Metab. Rev.* 12(1):159-218.
56. Kirst, H.A., Sides, G.D. (1989). *New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(9):1419-1422.

- 
57. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (1997). *Mycobacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia, Estados Unidos: Lippincott-Raven Publishers, quinta edición.
58. Lado-Lado, F.R., García-Ramos, R., Pérez-delMolino, M.L., Ferreiro-Regueiro, M.J., Maceda-Villariño, S., Túnñez-Bastida, V. (2004). *Tuberculosis resistente a fármacos*. An. Med. Interna 21(4):190-196
59. López-deUlibarria, G.I., Pita-Fernández, S. (1999). *Medidas de concordancia: el índice Kappa*. Cad. Aten. Primaria, 6: 169-171.
60. Lubasch, A., Keller, I., Borner, K., Koeppe, P., Lode, H. (2000). *Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:2600–2603
61. Luna-Herrera, J., Martínez-Cabrera, G., Parra-Maldonado, R., Enciso-Moreno, J.A., Torres-López, J., Quesada-Pascual, F., Delgadillo-Polanco, R., Franzblau, S.G. (2003). *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. Infect. Dis. 22:21-27.
62. Luna-Herrera, J. (2007). *Manual de Técnicas de Nuevos Agentes Antituberculosos: Método de alamar azul en microplaca*. México: CYTED.
63. MacFaddin, J.F. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, tercera ed.

- 
64. Martínez-Caballero, C.S. (2007). *Identificación de Micobacterias No Tuberculosas basado en el polimorfismo del gen hsp65 por PRC-RFLP*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
65. Martínez-Cabrera, G. (2009). *Desarrollo de métodos novedosos para la determinación de drogasusceptibilidad de micobacterias*. Tesis de maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
66. Martínez-Guarneros, J.A. (2005). *Estudio in vitro de la sobrevivencia intracelular de aislados clínicos farmacorresistentes de Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
67. Medina, M.V., Sauret, J., Caminero, J.A. (1999). *Enfermedades producidas por micobacterias ambientales*. Med. Clin. Barc.; 113: 621-630.
68. Molinero, L.M. (2002) [electrónico]. *Valoración de pruebas diagnósticas; Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión*. Recuperado el 22 de mayo del 2011 de URL:<http://www.seh-lelha.org/pdiagnos.htm>
69. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1985). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard*. Publicación de NCCLS M7-A, Villanova.
70. Nuermberger, E., Grosset, J. (2004). *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Mycobacterial Infections*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23: 243–255.
71. Patz, E.F., Swenson, S.J., Erasmus, J. (1995). *Pulmonary manifestation of nontuberculous mycobacteria*. Radiol. Clin. North Am. 33:719-729.

- 
72. Pfaller, M.A., Vu, Q., Lancaster, M., Espinel-Ingroff, A., Fothergill, V.L., Grant, C., McGinnis, M.R., Pasarell, L., Rinaldi, M.G., Steele-Moore, L. (1994). *Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates*. J. Clin. Microbiol. 32:1625-1628.
73. Pfyffer, G.E., Brown-Elliott, B.A., Wallace, R.J. (2003). *Mycobacterium: General characteristics, isolation, and staining procedures*. En: Murray P.R., editor. *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, DC: 532-559.
74. Pita-Fernández, S., Pértigas-Díaz, S. (2003). *Pruebas Diagnósticas*. Cad. Aten. Primaria, 10:120-124.
75. Pita-Fernández, S. (2008) [electrónico]. *Cuantificación de la incertidumbre y del riesgo*. Guías Clínicas. Vol 8, supl. 1:1. Recuperado el 29 de mayo del 2011 de URL:<http://www.fisterra.com/guias2/fmc/incertidumbre.asp>
76. Peloquin, C.A. (1991). *Antituberculosis drugs: pharmacokinetics*. En: Heifets, L., ed. *Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press, pp 59–88.
77. Peloquin, C.A. (2002). *Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis*. Drugs 62: 2169–2183.
78. Pontino, M.V., di-Giulio, B., Fernández, C., Imperiale, B., Bodon, A., Morcillo, N. (2006). *Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a Mycobacterium tuberculosis*. Rev. Argentina Microbiol. 38:145-151.

- 
79. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (1999). *Microbiología*. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana, cuarta edición.
80. Reddy, A.K, Garg, P., Babu, K.H., Gopinathan, U., Sharma, S. (2010). *In vitro antibiotic susceptibility of rapidly growing nontuberculous mycobacteria isolated from patients with microbial keratitis*. Curr. Eye Res. 35(3): 225-229.
81. Sarubbi, F.A., Hull, J.H. (1988). *Amikacin serum concentrations: prediction of levels and dosage guidelines*. Ann. Intern. Med. 89(5 Pt 1):612-618.
82. Sauret, J., Hernández, S., Castro, E., Hernández, L., Ausina, V., Coll, P. (1995). *Treatment of pulmonary disease caused by Mycobacterium kansasii: results of 18 vs. 12 months' chemotherapy*. Tubercle Lung Dis 76: 104-108.
83. Sechi, L.A., Dupre, I., Sanguinetti, M., Fadda, G., Zanetti, S. (1999). *Simple and rapid identification of different species of mycobacteria by PCR*. Molecular and Cellular Probes. 13: 141-146.
84. Schlossberg, D. (1999). *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections*. Philadelphia, Estados Unidos: Mc. Graw-Hill, quinta edición.
85. Shafran, S.D., Talbot, J.A., Chomyc, S., Davison, E., Singer, J., Phillips, P., Salit, I., Walmsley, S.L., Fong, I.W., Gill, M.J., Rachlis, A.R., Lalonde, R.G. (1998). *Does in vitro susceptibility to rifabutin and ethambutol predict the response to treatment of Mycobacterium avium complex bacteremia with rifabutin, ethambutol, and clarithromycin?* Clin. Infect. Dis. 27(6):1401–1405.
86. Shandil, R.K., Jayaram, R., Kaur, P., Gaonkar, S., Suresh, B.L., Mahesh, B.N., Jayashree, R., Nandi, V., Bharath, S., Balasubramanian, V. (2007). *Moxifloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, and Ciprofloxacin against*



- Mycobacterium tuberculosis: Evaluation of In Vitro and Pharmacodynamic Indices That Best Predict In Vivo Efficacy.* Antimicrob. Agents Chemoter. 51(2):576-82.
87. Sherris, J.C., Washington, J.A. (1980). *Laboratory tests in chemotherapy: general considerations.* En: *Manual of Clinical Microbiology*, tercera ed., Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J.Jr., Truant, J.P. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 446.
88. Siddiqi, S.H. (1995). *BACTEC TB product and procedure manual.* Becton-Dickinson Diagnostic Instrument System, Sparks, M.D., 1-23.
89. Stokes, R., Norris-Jones, R., Brooks, D., Beveridge, T., Doxsee, D., Thorson, L. (2004). *The Glycan-rich outer layer of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages.* Infect. Immun. 72(10): 5676–5686.
90. Talenti, A., Persing, D.H. (1996). *Novel strategies for the detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis.* 13<sup>vo</sup> foro de Microbiología, 73-79.
91. Tortoli, E. (2006). *The new mycobacteria: an update.* FEMS Immunol. Med. Microbiol., 48:159-178.
92. Tratnyek, P.G., Reikoff, T.E., Lemon, A.W., Scherer, M.M., Balko, B.A., Feik, L.M., Henegar, B.D. (2001). *Visualizing Redox Chemistry: Probing Environmental Oxidation-Reduction Reactions with Indicator Dyes.* The Chemical Educator. 6 (3).

- 
93. Vargas, R., Vázquez, R. (1997). *Epidemiología de las micobacteriosis atípicas y su importancia en la salud animal y humana*. UNAM. Cienc. Vet., 4: 289-310.
94. Vincent, V., Brown-Elliott, B.A., Jost, K.C., Wallace, R.J. (2003). *Mycobacterium: Phenotypic and Genotypic Identification*. En: Murray, P.R., editor. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 560-583.
95. Wagner, D., Young, L.S. (2004). *Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review*. *Infection*, 32:257-270.
96. Wallace, R.J.Jr. (2004). *Infections due to nontuberculous mycobacteria*. En: Scheld, W.M., Whitley, R.J., Marra, C.M., ed. *Infections of the Central Nervous System*, 26:461-478.
97. Walters, S.B., Hanna, B.A. (1996). *Testing of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin by Mycobacterium Growth Indicator Tube*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1565-1567.
98. Washington, J.A., Suter, V.L. (1980). *Dilution susceptibility tests: agar and macro-broth dilution procedures*. En: *Manual of Clinical Microbiology*, tercera ed., Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J.Jr., Truant, J.P. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 453.
99. Wolinsky, E. (1979). *State of the Art: Nontuberculous mycobacteria and associated diseases*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119:107-159.
100. Wolinsky, E. (1995). *Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up*. *Clin. Infect. Dis.* 20:954-963.

101. Woods, G.I., Warren, N.G., Inderlied, C.B. (2007). *Antibacterial Agents and Susceptibility Test Methods: Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, Nocardia and other Actinomycetes*. En: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J., Tenover, M.C., Tenover, M.C., Tenover, M.C., Landry, M.L. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
102. Yajko, D.M., Madej, J.J., Lancaste, M.V., Sanders, C.A., Cawthon, V.L., Gee, B., Babst, A., Hadley, W.K. (1995). *Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 33:2324-2327.
103. Zhu, M., Burman, W.J., Starke, J.R., Stambaugh, J.J., Steiner, P., Bulpitt, A.E., Ashkin, D., Auclair, B., Berning, S.E., Jelliffe, R.W., Jaresko, G.S., Peloquin, C.A. (2004). *Pharmacokinetics of ethambutol in children and adults with tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 8(11):1360-1367.
104. Zhu, M., Burman, W.J., Jaresko, G.S., Berning, S.E., Jelliffe, R.W., Peloquin, C.A. (2001). *Population Pharmacokinetics of Intravenous and Intramuscular Streptomycin in Patients with Tuberculosis*. Pharmacotherapy. 21(9): 1037-1045.

**Figuras 2-8, 12, 13, 15, 18-47:** Fotografías por Luis Narváez Díaz.

**Figuras 10, 11:** Esquemas diseñados por Luis Narváez Díaz.

APÉNDICE 1. Fotografías de los microensayos Alamar Azul en MNT.

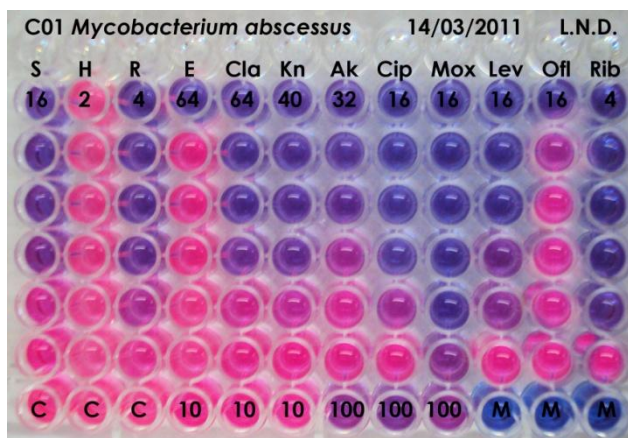


Figura 18. Revelado de placa para C01- *M. abscessus*.

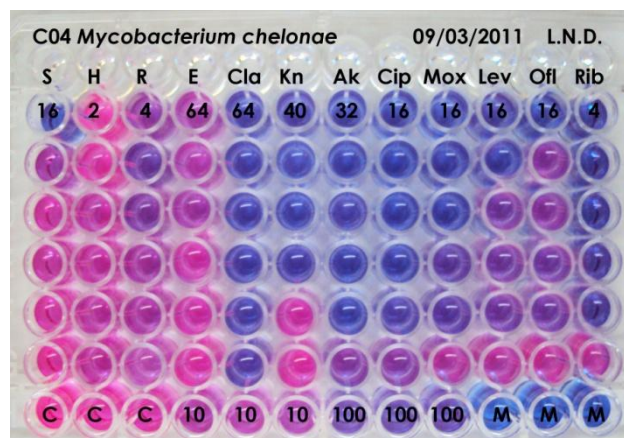


Figura 21. Revelado de placa para C04- *M. chelonae*.

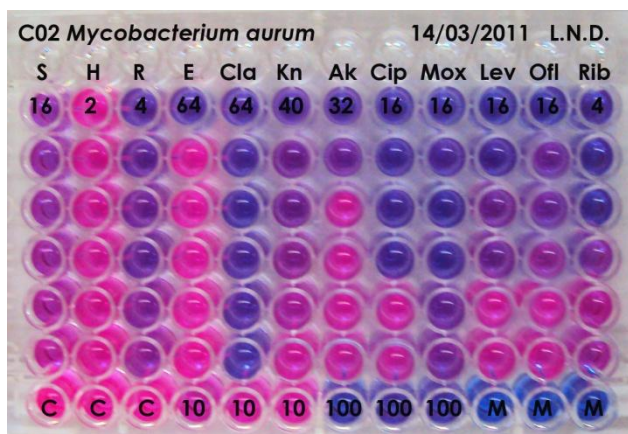


Figura 19. Revelado de placa para C02- *M. aurum*.

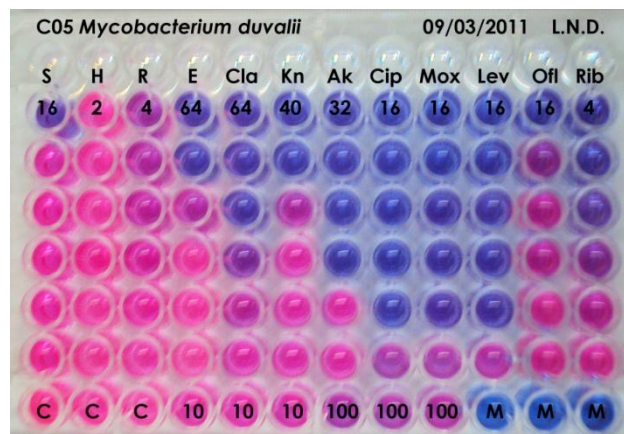


Figura 22. Revelado de placa para C05- *M. duvalii*.

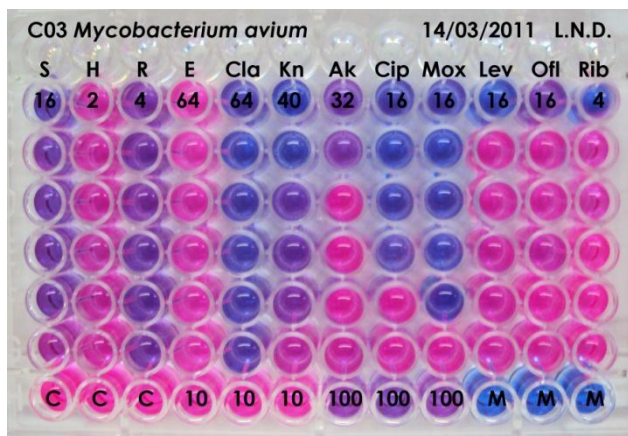


Figura 20. Revelado de placa para C03- *M. avium*.

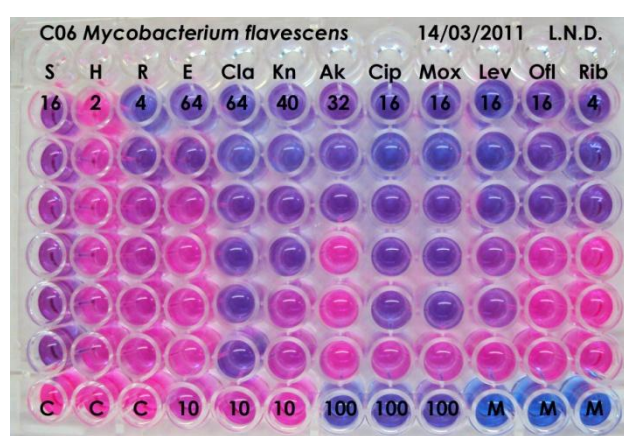


Figura 23. Revelado de placa para C06- *M. flavescens*.

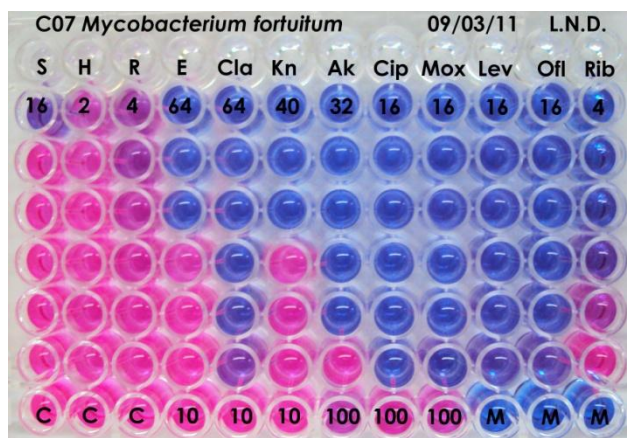


Figura 24. Revelado de placa para C07- *M. fortuitum*.

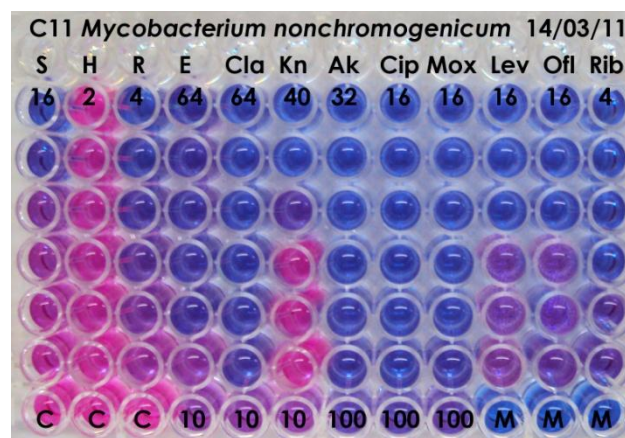


Figura 27. Revelado de placa para C11- *M. nonchromogenicum*.

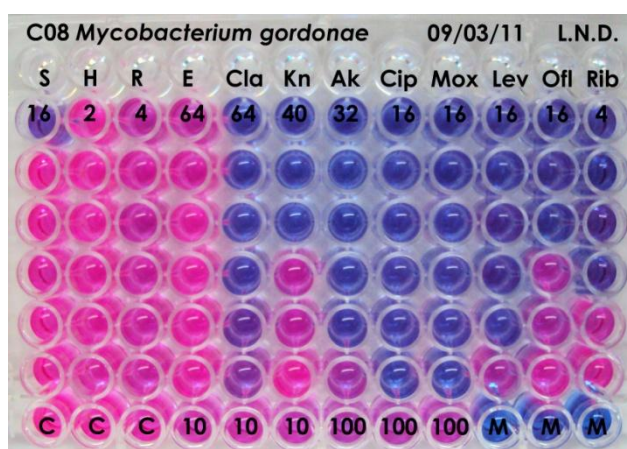


Figura 25. Revelado de placa para C08- *M. gordonae*

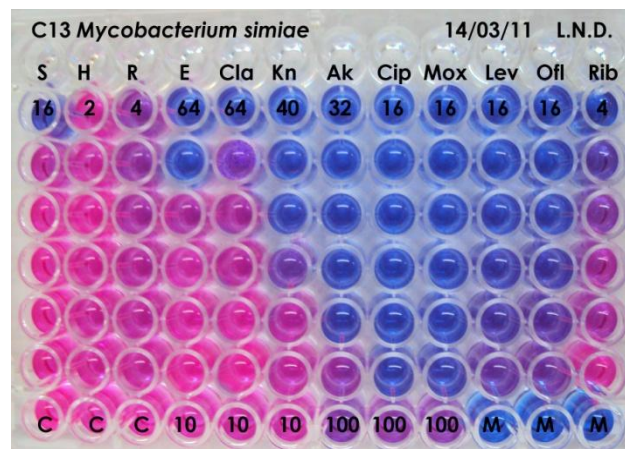


Figura 28. Revelado de placa para C13- *M. simiae*.

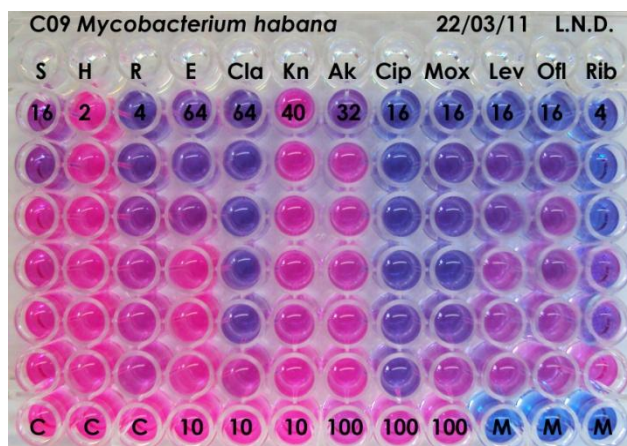


Figura 26. Revelado de placa para C09- *M. habana*.

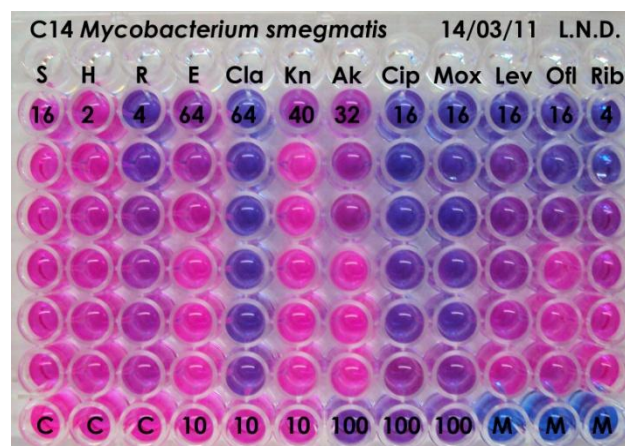


Figura 29. Revelado de placa para C14- *M. smegmatis*.

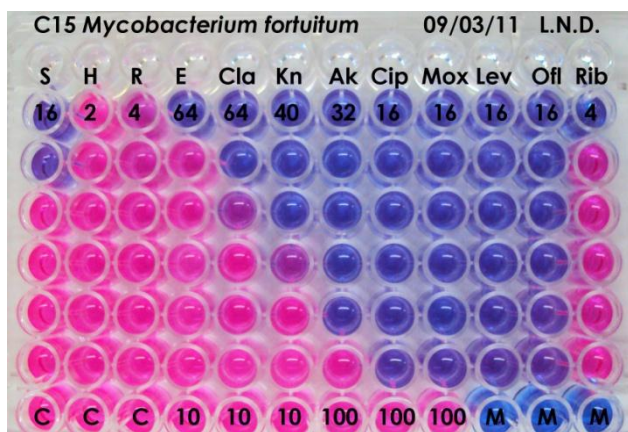


Figura 30. Revelado de placa para C15- *M. fortuitum*.

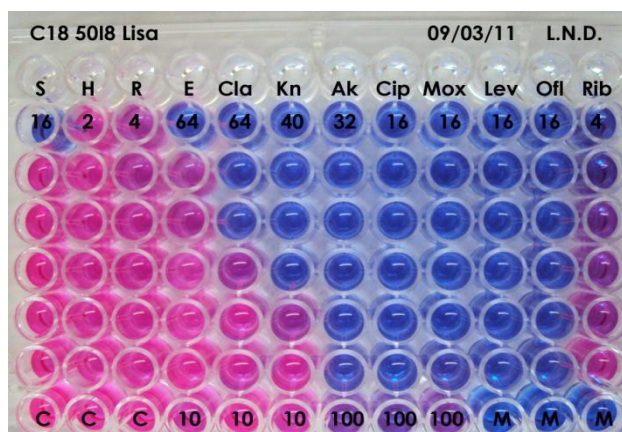


Figura 33. Revelado de placa para C18- *M. abscessus*.

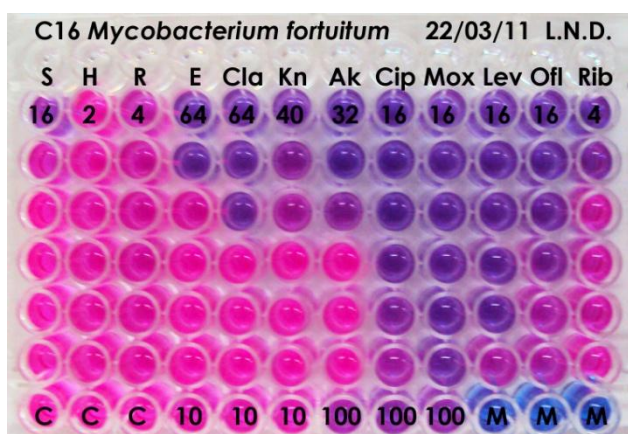


Figura 31. Revelado de placa para C16- *M. fortuitum*.

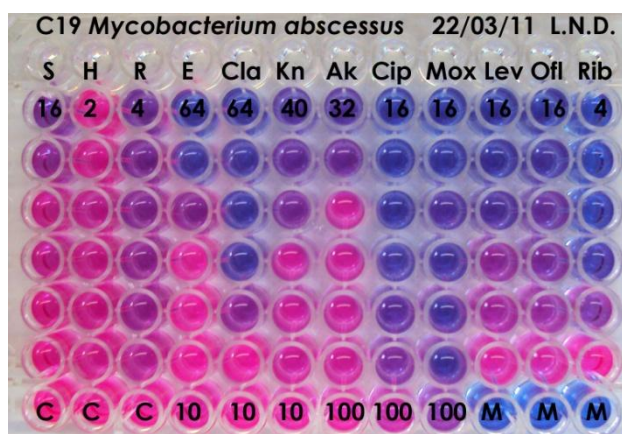


Figura 34. Revelado de placa para C19- *M. abscessus*.

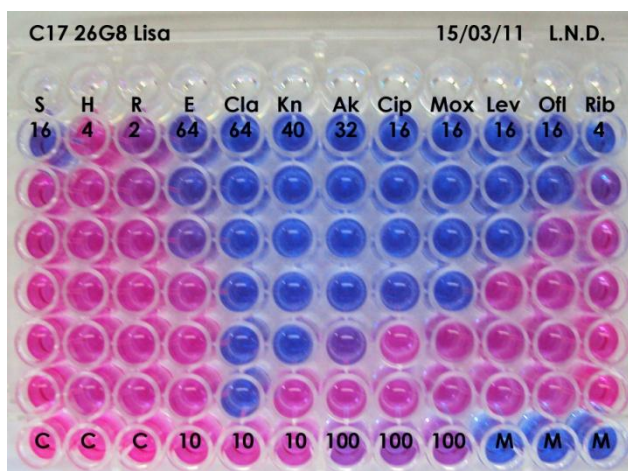


Figura 32. Revelado de placa para C17- *M. fortuitum*.

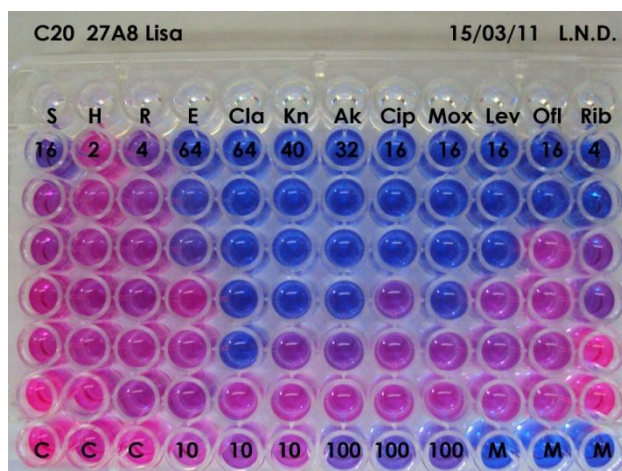


Figura 35. Revelado de placa para C20- *M. chelonae*.

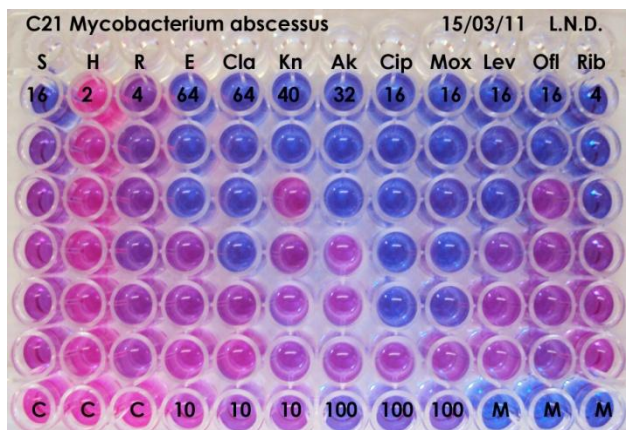


Figura 36. Revelado de placa para C21- *M. abscessus*.

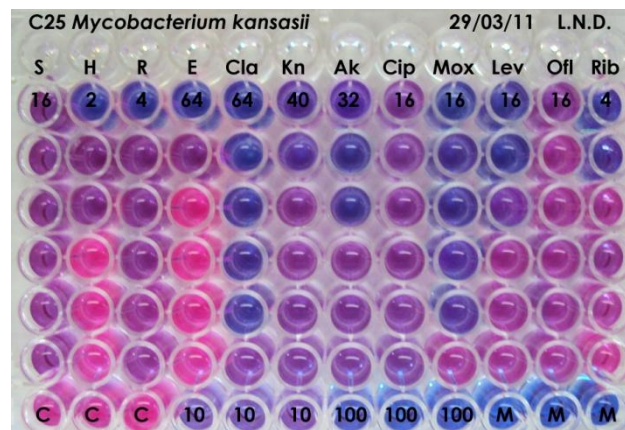


Figura 39. Revelado de placa para C25- *M. kansasii*.

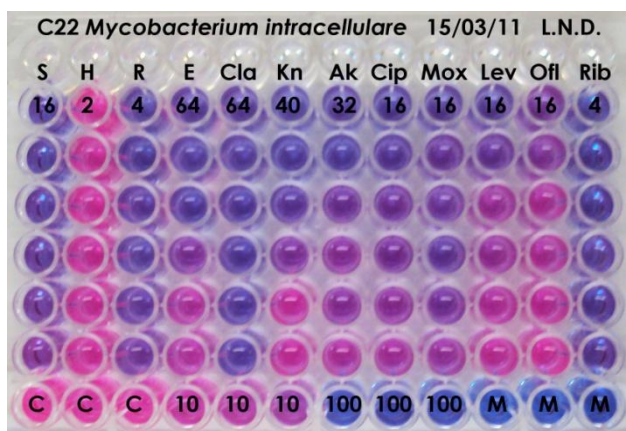


Figura 37. Revelado de placa para C22- *M. intracellulare*.

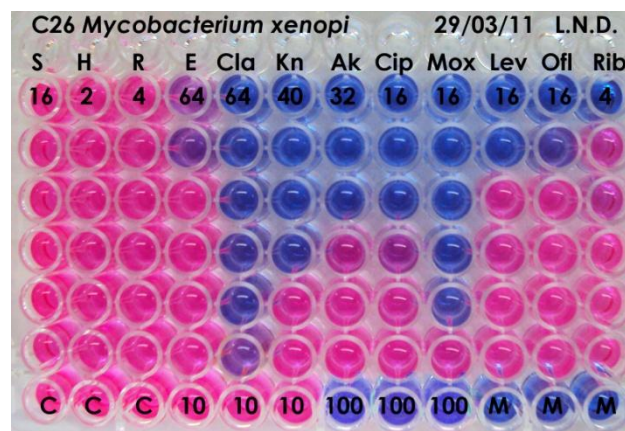


Figura 40. Revelado de placa para C26- *M. xenopi*.

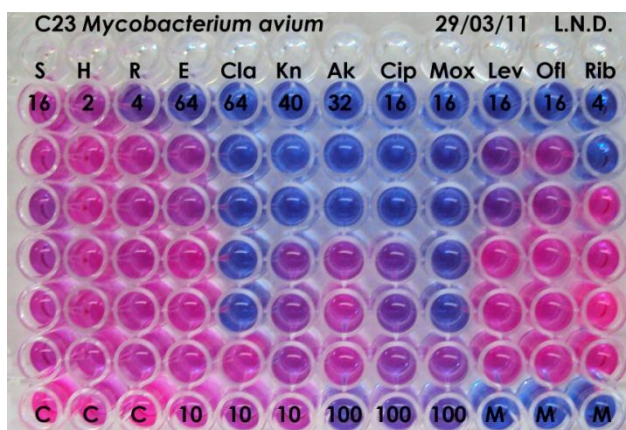


Figura 38. Revelado de placa para C23- *M. avium*.

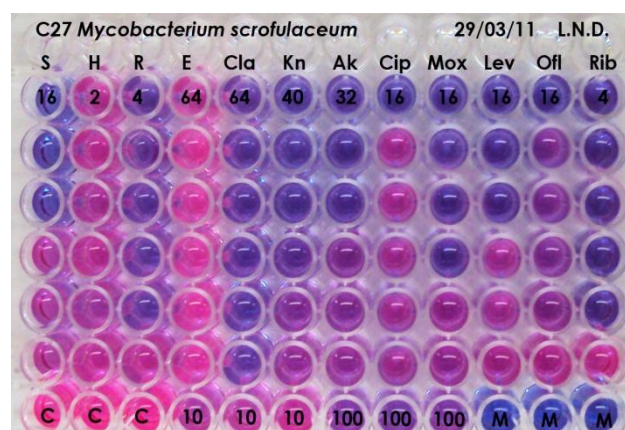


Figura 41. Revelado de placa para C27- *M. scrofulaceum*.

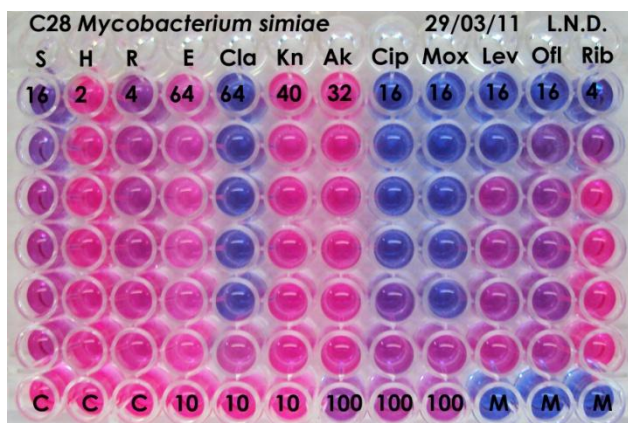


Figura 42. Revelado de placa para C28- *M. simiae*.

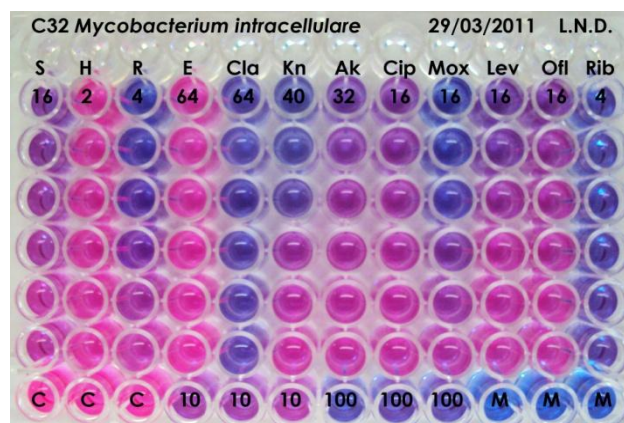


Figura 45. Revelado de placa para C32- *M. intracellulare*.

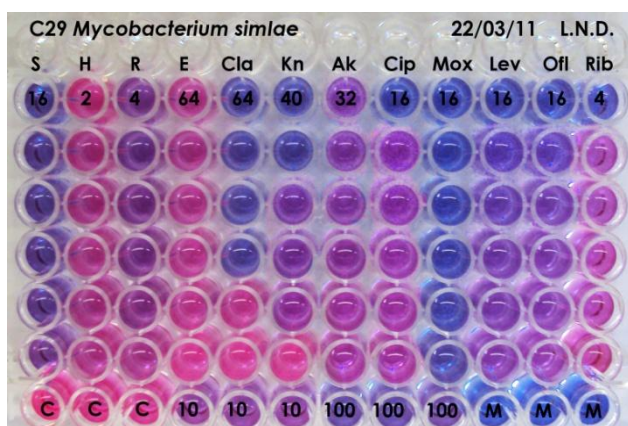


Figura 43. Revelado de placa para C29- *M. simiae*.

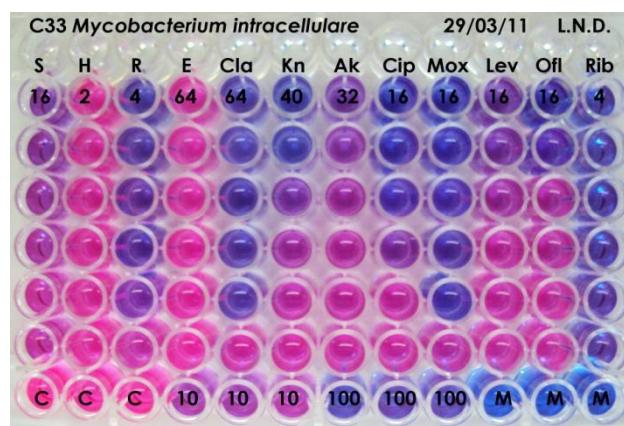


Figura 46. Revelado de placa para C33- *M. intracellulare*.

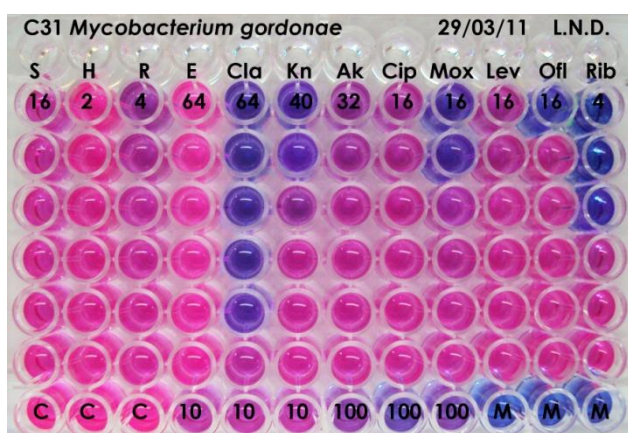


Figura 44. Revelado de placa para C31- *M. gordonae*.

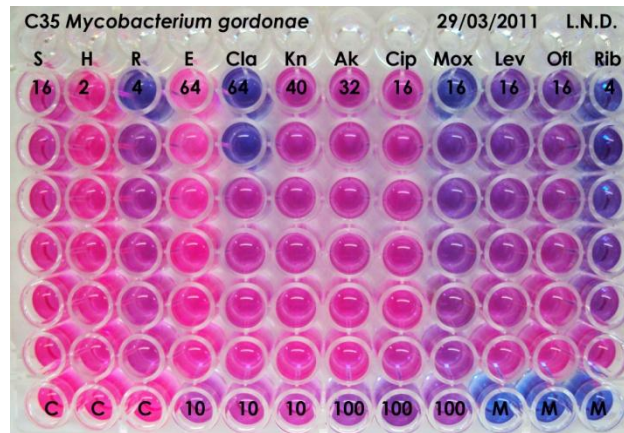


Figura 47. Revelado de placa para C35- *M. gordonae*.

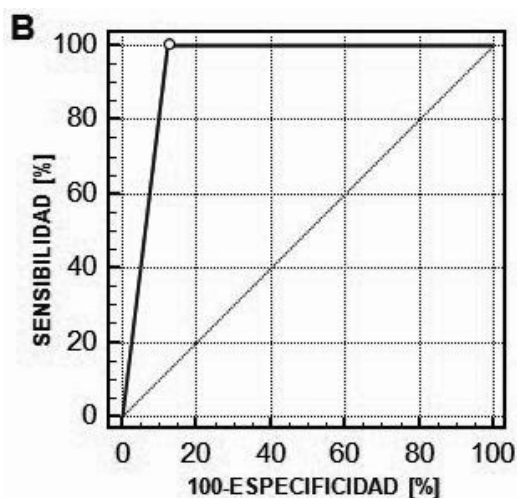
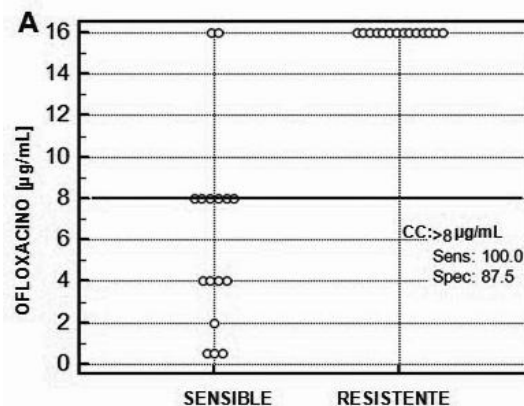


**APÉNDICE 2: Distribución de resultados, diagrama de distribución de puntos, curvas ROC y parámetros estadísticos comparativos.**

**OFLOXACINO**

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C07	0	0.5	S
C15	0	0.5	S
C18	0	0.5	S
C13	0	2	S
C06	0	4	S
C08	0	4	S
C11	0	4	S
C16	0	4	S
C14	0	8	S
C17	0	8	S
C19	0	8	S
C20	0	8	S
C21	0	8	S
C33	0	8	S
C25	0	16	R
C27	0	16	R
C01	1	16	R
C02	1	16	R
C03	1	16	R
C04	1	16	R
C05	1	16	R
C09	1	16	R
C22	1	16	R
C23	1	16	R
C26	1	16	R
C28	1	16	R
C29	1	16	R
C31	1	16	R
C32	1	16	R
C35	1	16	R

**Tabla 22.** Distribución de resultados para la estandarización del ofloxacino por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



**C**

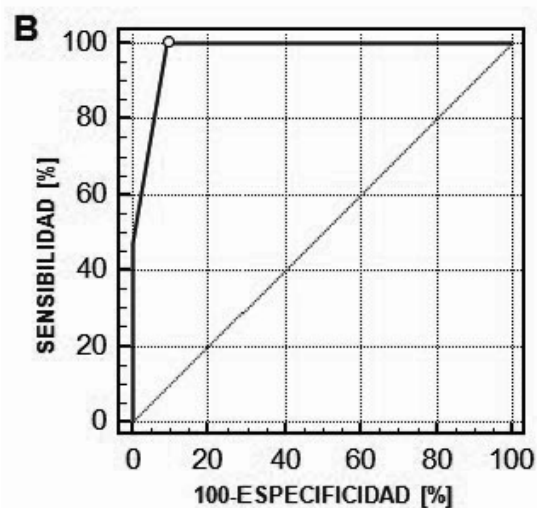
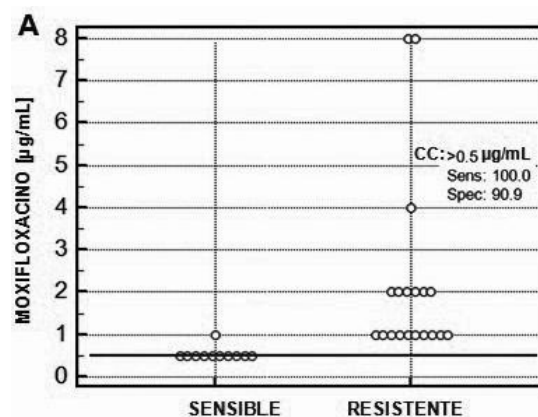
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	0.9370
Error estándar	0.0427
Intervalo de confianza al 95%	0.785 a 0.993
Valor de p	<0.0001
Sensibilidad	100
Especificidad	87.50
Punto de corte [µg/mL]	8

**Figura 48.** Correlación del método de las proporciones y alamar azul para ofloxacino. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

**MOXIFLOXACINO**

CEPA	MÉTODO		
	MPA Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C06	0	0.5	S
C07	0	0.5	S
C08	0	0.5	S
C11	0	0.5	S
C13	0	0.5	S
C15	0	0.5	S
C16	0	0.5	S
C18	0	0.5	S
C19	0	0.5	S
C29	0	0.5	S
C25	0	1	R
C01	1	1	R
C03	1	1	R
C05	1	1	R
C09	1	1	R
C14	1	1	R
C21	1	1	R
C23	1	1	R
C26	1	1	R
C28	1	1	R
C33	1	1	R
C02	1	2	R
C04	1	2	R
C17	1	2	R
C20	1	2	R
C22	1	2	R
C27	1	2	R
C32	1	4	R
C31	1	8	R
C35	1	8	R

**Tabla 23.** Distribución de resultados para la estandarización del moxifloxacino por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



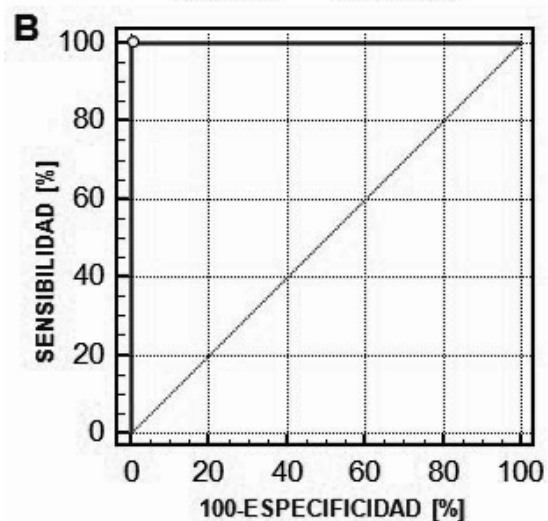
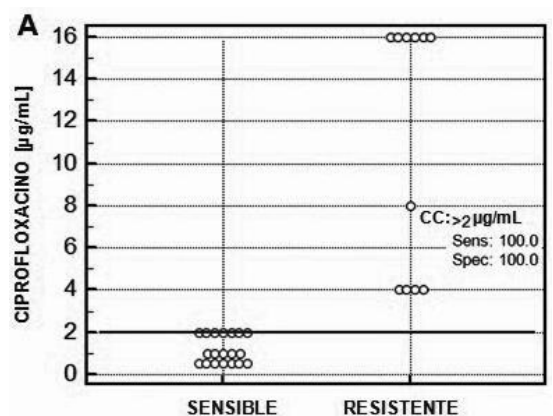
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	0.9760
Error estándar	0.0245
Intervalo de confianza al 95%	0.843 a 1.0
Valor de p	<0.0001
Sensibilidad	100
Especificidad	90.91
Punto de corte [µg/mL]	0.5

**Figura 49.** Correlación del método de las proporciones y alamar azul para moxifloxacino. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

**CIPROFLOXACINO**

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C07	0	0.5	S
C08	0	0.5	S
C09	0	0.5	S
C11	0	0.5	S
C13	0	0.5	S
C15	0	0.5	S
C18	0	0.5	S
C04	0	1	S
C05	0	1	S
C06	0	1	S
C14	0	1	S
C21	0	1	S
C01	0	2	S
C02	0	2	S
C03	0	2	S
C16	0	2	S
C17	0	2	S
C19	0	2	S
C28	0	2	S
C20	1	4	R
C23	1	4	R
C26	1	4	R
C33	1	4	R
C22	1	8	R
C25	1	16	R
C27	1	16	R
C29	1	16	R
C31	1	16	R
C32	1	16	R
C35	1	16	R

**Tabla 24.** Distribución de resultados para la estandarización del ciprofloxacino por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



**C**

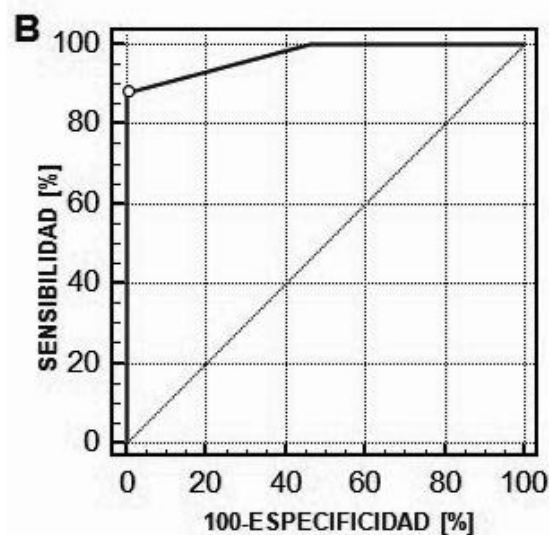
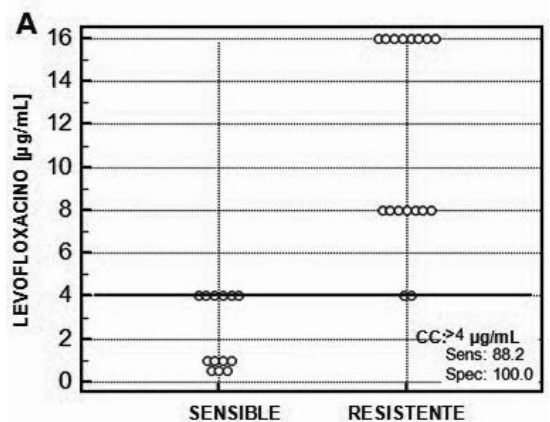
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	1.0000
Error estándar	0.0000
Intervalo de confianza al 95%	0.884 a 1.0
Valor de p	0.0000
Sensibilidad	100
Especificidad	100
Punto de corte [µg/mL]	2

**Figura 50.** Correlación del método de las proporciones y alamar azul para ciprofloxacino. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

LEVOFLOXACINO

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C07	0	0.5	S
C15	0	0.5	S
C18	0	0.5	S
C05	0	1	S
C08	0	1	S
C13	0	1	S
C16	0	1	S
C01	0	4	S
C06	0	4	S
C11	0	4	S
C19	0	4	S
C20	0	4	S
C27	0	4	S
C17	1	4	S
C21	1	4	S
C02	1	8	R
C04	1	8	R
C22	1	8	R
C25	1	8	R
C26	1	8	R
C28	1	8	R
C29	1	8	R
C03	1	16	R
C09	1	16	R
C14	1	16	R
C23	1	16	R
C31	1	16	R
C32	1	16	R
C33	1	16	R
C35	1	16	R

**Tabla 25.** Distribución de resultados para la estandarización del levofloxacin por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



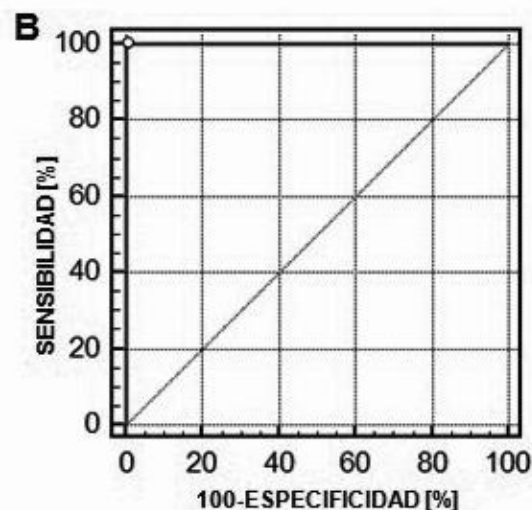
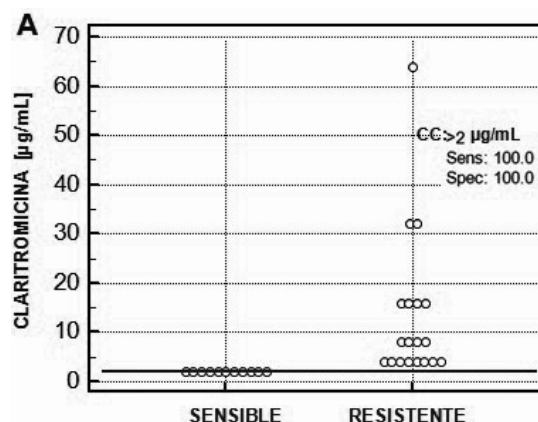
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	0.9730
Error estándar	0.0204
Intervalo de confianza al 95%	0.838 a 1.0
Valor de p	<0.0001
Sensibilidad	88.24
Especificidad	100
Punto de corte [µg/mL]	4

**Figura 51.** Correlación del método de las proporciones y alamar azul para levofloxacin. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

CLARITROMICINA

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C02	0	2	S
C03	0	2	S
C04	0	2	S
C06	0	2	S
C11	0	2	S
C14	0	2	S
C17	0	2	S
C22	0	2	S
C27	0	2	S
C31	0	2	S
C32	0	2	S
C07	1	4	R
C09	1	4	R
C20	1	4	R
C23	1	4	R
C25	1	4	R
C26	1	4	R
C28	1	4	R
C33	1	4	R
C08	1	8	R
C19	1	8	R
C21	1	8	R
C29	1	8	R
C01	1	16	R
C05	1	16	R
C16	1	16	R
C18	1	16	R
C15	1	32	R
C35	1	32	R
C13	1	64	R

Tabla 26. Distribución de resultados para la estandarización de claritromicina por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



C

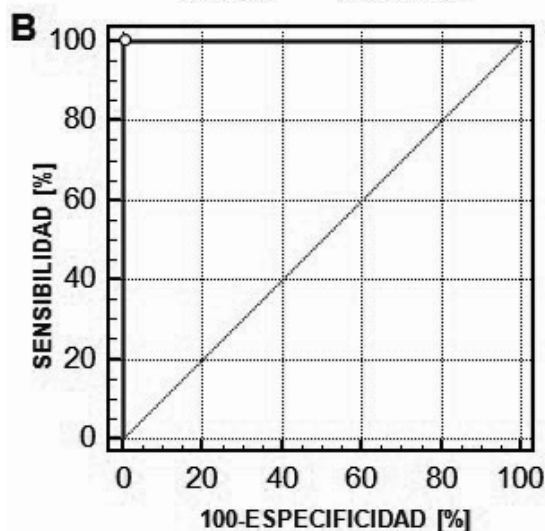
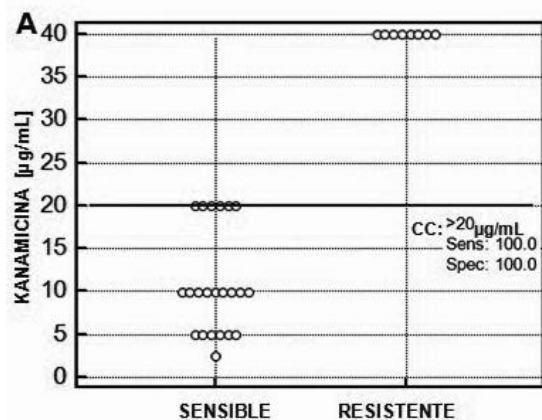
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	1.0000
Error estándar	0.0000
Intervalo de confianza al 95%	0.884 a 1.0
Valor de p	0.0000
Sensibilidad	100
Especificidad	100
Punto de corte [µg/mL]	2

Figura 52. Correlación del método de las proporciones y alamar azul para claritromicina. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

**KANAMICINA**

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C17	0	2.5	S
C04	0	5	S
C06	0	5	S
C18	0	5	S
C20	0	5	S
C26	0	5	S
C27	0	5	S
C01	0	10	S
C07	0	10	S
C08	0	10	S
C11	0	10	S
C13	0	10	S
C15	0	10	S
C22	0	10	S
C23	0	10	S
C32	0	10	S
C03	0	20	S
C21	0	20	S
C25	0	20	S
C29	0	20	S
C31	0	20	S
C33	0	20	S
C02	1	40	R
C05	1	40	R
C09	1	40	R
C14	1	40	R
C16	1	40	R
C19	1	40	R
C28	1	40	R
C35	1	40	R

**Tabla 27.** Distribución de resultados para la estandarización de kanamicina por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



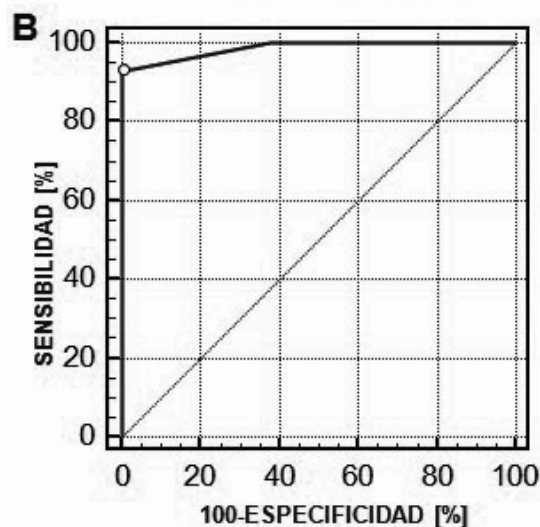
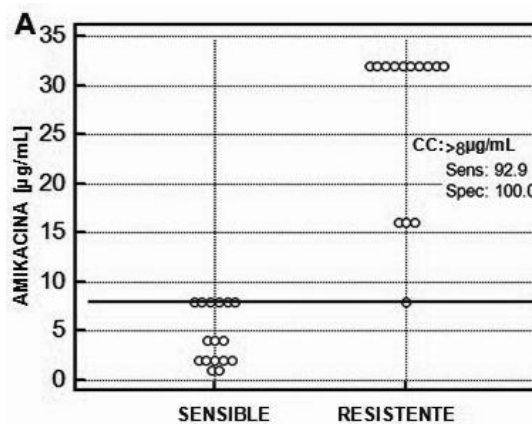
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	1.0000
Error estándar	0.0000
Intervalo de confianza al 95%	0.884 a 1.0
Valor de p	0.0000
Sensibilidad	100
Especificidad	100
Punto de corte [µg/mL]	20

**Figura 53.** Correlación del método de las proporciones y alamar azul para kanamicina. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

AMIKACINA

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C11	0	1	S
C18	0	1	S
C04	0	2	S
C07	0	2	S
C08	0	2	S
C13	0	2	S
C15	0	2	S
C05	0	4	S
C17	0	4	S
C20	0	4	S
C01	0	8	S
C06	0	8	S
C23	0	8	S
C25	0	8	S
C26	0	8	S
C27	0	8	S
C21	1	8	S
C03	1	16	R
C16	1	16	R
C22	1	16	R
C02	1	32	R
C09	1	32	R
C14	1	32	R
C19	1	32	R
C28	1	32	R
C29	1	32	R
C31	1	32	R
C32	1	32	R
C33	1	32	R
C35	1	32	R

**Tabla 28.** Distribución de resultados para la estandarización de amikacina por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



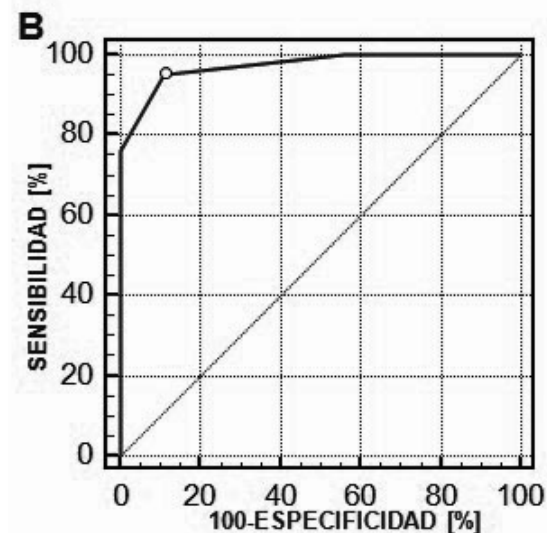
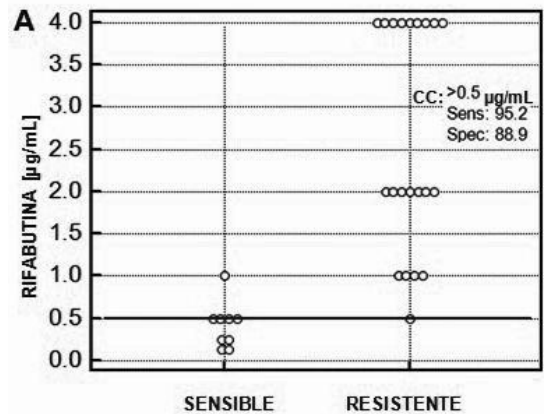
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	0.9870
Error estándar	0.0141
Intervalo de confianza al 95%	0.860 a 1.0
Valor de p	<0.0001
Sensibilidad	92.86
Especificidad	100
Punto de corte [µg/mL]	8

**Figura 54.** Correlación del método de las proporciones y alamar azul para amikacina. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

RIFABUTINA

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C22	0	0.125	S
C32	0	0.125	S
C04	0	0.25	S
C27	0	0.25	S
C08	0	0.5	S
C11	0	0.5	S
C19	0	0.5	S
C33	0	0.5	S
C01	1	0.5	S
C31	0	1	R
C02	1	1	R
C07	1	1	R
C09	1	1	R
C21	1	1	R
C05	1	2	R
C06	1	2	R
C14	1	2	R
C20	1	2	R
C23	1	2	R
C25	1	2	R
C35	1	2	R
C03	1	4	R
C13	1	4	R
C15	1	4	R
C16	1	4	R
C17	1	4	R
C18	1	4	R
C26	1	4	R
C28	1	4	R
C29	1	4	R

Tabla 29. Distribución de resultados para la estandarización de rifabutina por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



C

PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	0.9740
Error estándar	0.0221
Intervalo de confianza al 95%	0.839 a 1.0
Valor de p	<0.0001
Sensibilidad	95.24
Especificidad	88.89
Punto de corte [µg/mL]	0.5

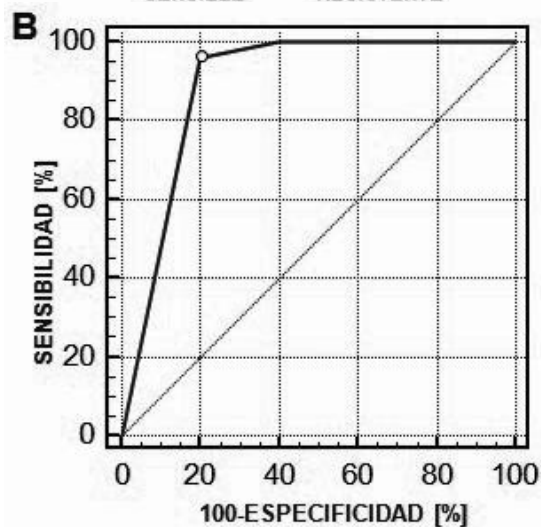
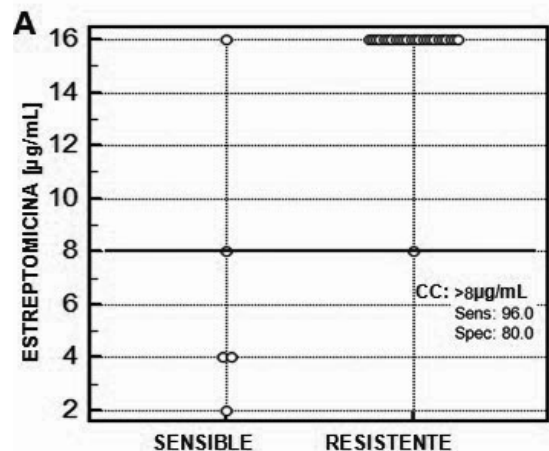
Figura 55. Correlación del método de las proporciones y alamar azul para rifabutina. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.



ESTREPTOMICINA

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C22	0	2	S
C01	0	4	S
C27	0	4	S
C15	0	8	S
C11	1	8	S
C18	0	16	R
C02	1	16	R
C03	1	16	R
C04	1	16	R
C05	1	16	R
C06	1	16	R
C07	1	16	R
C08	1	16	R
C09	1	16	R
C13	1	16	R
C14	1	16	R
C16	1	16	R
C17	1	16	R
C19	1	16	R
C20	1	16	R
C21	1	16	R
C23	1	16	R
C25	1	16	R
C26	1	16	R
C28	1	16	R
C29	1	16	R
C31	1	16	R
C32	1	16	R
C33	1	16	R
C35	1	16	R

Tabla 30. Distribución de resultados para la estandarización de estreptomicina por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



C

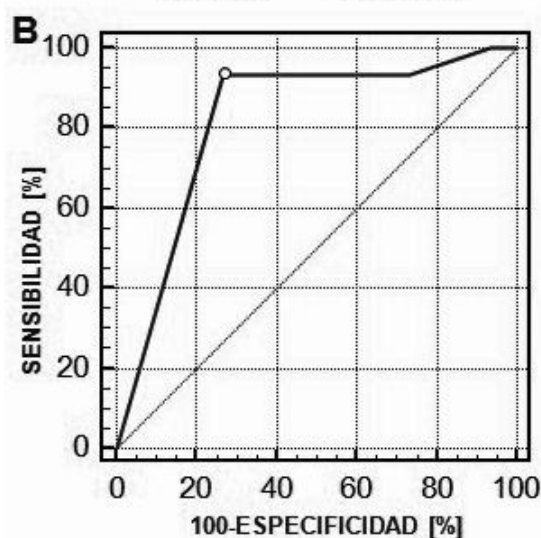
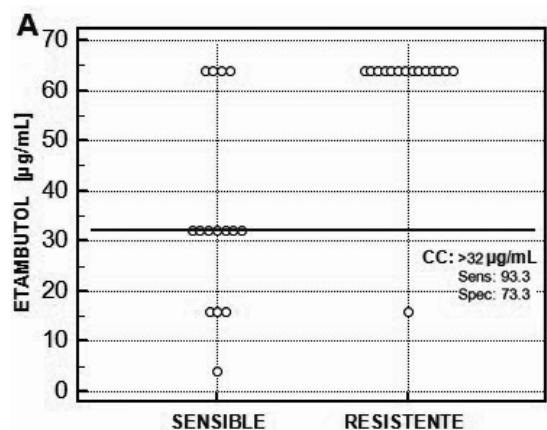
PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	0.8920
Error estándar	0.1030
Intervalo de confianza al 95%	0.724 a 0.975
Valor de p	<0.0001
Sensibilidad	96
Especificidad	80
Punto de corte [µg/mL]	8

Figura 56. Correlación del método de las proporciones y alamar azul para estreptomicina. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

ETAMBUTOL

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C11	0	4	S
C07	0	16	S
C20	0	16	S
C22	0	16	S
C21	1	16	S
C05	0	32	S
C06	0	32	S
C09	0	32	S
C13	0	32	S
C16	0	32	S
C17	0	32	S
C19	0	32	S
C14	0	64	R
C15	0	64	R
C18	0	64	R
C25	0	64	R
C01	1	64	R
C02	1	64	R
C03	1	64	R
C04	1	64	R
C08	1	64	R
C23	1	64	R
C26	1	64	R
C27	1	64	R
C28	1	64	R
C29	1	64	R
C31	1	64	R
C32	1	64	R
C33	1	64	R
C35	1	64	R

**Tabla 31.** Distribución de resultados para la estandarización de etambutol por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.



C

PARÁMETRO	VALOR
Área bajo la curva (AUC)	0.8200
Error estándar	0.0738
Intervalo de confianza al 95%	0.637 a 0.935
Valor de p	<0.0001
Sensibilidad	93.33
Especificidad	73
Punto de corte [µg/mL]	32

**Figura 59.** Correlación del método de las proporciones y alamar azul para etambutol. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

RIFAMPICINA

CEPA	MÉTODO		
	MP Sensibilidad	AA CMI (µg/mL)	AA Criterio
C22	0	0.25	S
C27	0	0.25	S
C01	0	0.5	S
C02	0	0.5	S
C11	0	0.5	S
C32	0	0.5	S
C33	0	0.5	S
C06	0	2	S
C14	1	2	S
C09	1	2	S
C03	1	4	R
C04	1	4	R
C05	1	4	R
C07	1	4	R
C08	1	4	R
C13	1	4	R
C15	1	4	R
C16	1	4	R
C17	1	4	R
C18	1	4	R
C19	1	4	R
C20	1	4	R
C21	1	4	R
C23	1	4	R
C25	1	4	R
C26	1	4	R
C28	1	4	R
C29	1	4	R
C31	1	4	R
C35	1	4	R

Tabla 32. Distribución de resultados para la estandarización de rifampicina por el método de las proporciones MP y alamar azul AA en MNT.

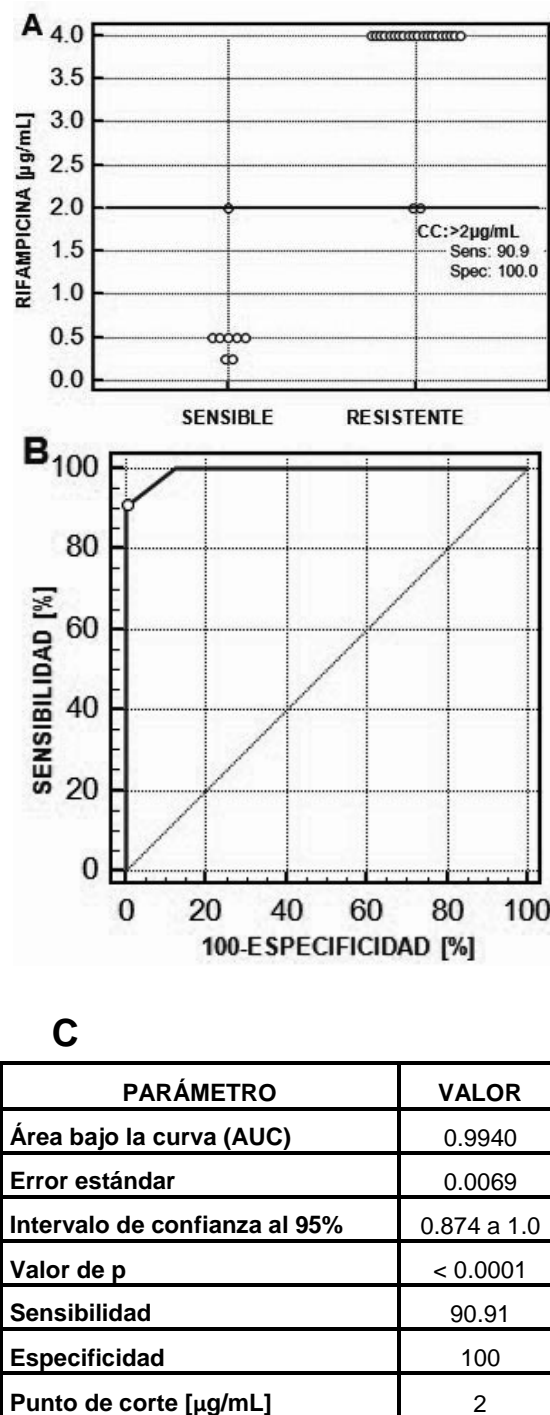


Figura 60. Correlación del método de las proporciones y alamar azul para rifampicina. A= Diagrama de distribución de puntos. B= Curva ROC para la determinación de concentración crítica. C= Parámetros estadísticos del análisis de curvas ROC.

