



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DETERMINACIÓN DE LA
SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis A
RIFAMPICINA E ISONIACIDA
MEDIANTE LA PRUEBA RÁPIDA DE
SUSCEPTIBILIDAD DEL
MICOBACTERIÓFAGO D29

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

JOSÉ ANTONIO CHAUCA CARHUAJULCA

LIMA - PERÚ

2005

ASESOR:

Dr. Humberto Guerra Allison

JURADO DE TESIS

DR. DAVID MOORE

PRESIDENTE

DRA. PATRICIA HERRERA VELIT

VOCAL

DR. JOSE ESPINOZA BABILON

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mi Madre por todo el amor y apoyo para darme la fortaleza para concluir mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Humberto Guerra Allison por su apoyo en mi desarrollo profesional y su labor como asesor de tesis permitiéndome ser parte del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”.

Al Dr. Juan Carlos Palomino por la confianza, consejos y paciencia para orientarme en el desarrollo de mi trabajo de tesis durante mi estancia en Bélgica.

A la Professor Françoise Portaels y a todos los miembros del *Mycobacterial Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp 2000, Belgium* por todas las facilidades brindadas para poder desarrollar con éxito mi trabajo de tesis en Bélgica.

A la Dra. Ruth McNerney del *London School of Hygiene and Tropical Medicine* por facilitarme el material biológico y la metodología para desarrollar el trabajo con el bacteriófago D29.

A los Dres. Eduardo Gotuzzo y Jorge Arevalo por permitirme ser parte del grupo de profesionales que recibió a través del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” el financiamiento y apoyo logístico para poder desarrollar mi tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el *Directorate General for Development Cooperation of the Belgian Government* (DGDC); project 95501.

TABLA DE CONTENIDOS

	Paginas
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	22
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSIÓN	30
7. CONCLUSIONES	38
8. RECOMENDACIONES	39
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
10. ANEXOS	47

RESUMEN

La terapia con antibióticos ofrece un alto grado de curación a los pacientes con tuberculosis (TB), pero las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes plantean una amenaza al control de esta enfermedad. Los métodos estándar para determinar la susceptibilidad antibiótica de *M. tuberculosis* requieren muchos días para obtener un resultado limitando su utilidad; aunque métodos automatizados y aquellos basados en la biología molecular han logrado reducir el tiempo requerido su alto costo y equipamiento sofisticado limitan su uso en países en vías de desarrollo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la exactitud diagnóstica de una prueba rápida (3 - 4 días) y de bajo costo basada en el uso del Micobacteriófago D29 para la determinación de la susceptibilidad de cepas de *M. tuberculosis* a Rifampicina e Isoniacida. Los resultados obtenidos muestran que la prueba de susceptibilidad a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 por su alta exactitud diagnóstica frente al método estándar de las proporciones en medio Löwenstein Jensen (sensibilidad 100 % y especificidad 98%) y su concordancia con otras pruebas rápidas de mayor costo ($\kappa = 0.966$ con MGIT y MABA) podría ser de utilidad en el manejo terapéutico de pacientes con TB. Dada la asociación entre la resistencia a Rifampicina y la resistencia a Isoniacida, que definen la Múltiple Drogo Resistencia (MDR) esta prueba parece ser adecuada para detectar rápidamente la presencia de TB-MDR ($\kappa = 0.978$). La prueba de susceptibilidad a Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 no posee una adecuada exactitud diagnóstica frente al método estándar (sensibilidad 80.4 y especificidad 80.8) ni concordancia con otras pruebas rápidas seleccionadas ($\kappa = 0.600$ con MGIT y MABA) limitando su utilidad en el manejo terapéutico de pacientes con

tuberculosis. Nuevos estudios podrán evaluar la exactitud diagnóstica de las pruebas basadas en el Micobacteriófago D29 para antibióticos individuales.

Palabras claves: Tuberculosis, Micobacteriófago, MDR, Rifampicina, Curva ROC.

ABSTRACT

Antibiotic therapy offers a high probability of cure to patients with tuberculosis (TB), but resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* constitute a threat to the control of this illness. The standard methods to determine the drug susceptibility of *M. tuberculosis* require many days to obtain results, limiting their usefulness; automated methods and those based on the molecular biology have been able to reduce the requisite time, but their high cost and need for sophisticated equipment restrict their use in developing countries. The objective of the present effort has been to evaluate the diagnostic accuracy of a rapid (3 to 4 days) low-cost test based on the use of the Mycobacteriophage D29 to determine the susceptibility of strains of *M. tuberculosis* to Rifampicin and Isoniazid. The results obtained show that the susceptibility test for Rifampicin using Mycobacteriophage D29 has a high diagnostic accuracy as compared to the standard indirect proportions method on Löwenstein Jensen medium (sensitivity 100% and specificity 98%) and high agreement with other more expensive rapid tests ($k = 0.966$ with MGIT and MABA); this test could be useful in the therapeutic management of TB patients. Given the association between the resistance to Rifampicin and Isoniazid, which define Multiple Drug Resistance (MDR), this test seems to be suitable for the rapid detection of probable TB-MDR strains ($k = 0.978$). The susceptibility test for Isoniazid using Mycobacteriophage D29 doesn't have a similarly high diagnostic accuracy compared to the standard method (sensitivity 80.4 and specificity 80.8) and shows low agreement with the other rapid tests chosen ($k = 0.600$ with MGIT and MABA); this test would be of limited usefulness in the

management of TB patients. Further studies to determine the usefulness of Mycobacteriophage D29 tests for specific antituberculosis drugs are warranted.

Key words: Tuberculosis, Mycobacteriophage, MDR, Rifampicin, ROC Curve.

1. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria ácido-alcohol resistente, aeróbica, no móvil y de lento crecimiento (aproximadamente un día por división celular) (14). Desde el punto de vista taxonómico esta bacteria pertenece a la clase Actinomicetos, orden Actinomicetales y familia Mycobacterioaceae. *M. tuberculosis* tiene una distribución cosmopolita y se estima que un tercio de la población mundial está infectada con ella. Dado que *M. tuberculosis* es el agente etiológico mas frecuente de la enfermedad infecciosa conocida como tuberculosis (TB), una parte importante de la población mundial está en riesgo (bajo determinadas circunstancias) de una reactivación de la infección con el consiguiente desarrollo de la forma clínica de la enfermedad (1, 14, 40).

Desde el punto de vista epidemiológico en el ámbito mundial la TB es un importante problema de salud pública, tal como lo reflejan los indicadores de morbilidad y mortalidad de los últimos años. En 1997 esta enfermedad fue la primera causa infecciosa de mortalidad con un estimado de tres millones de muertes; en 1998 pasó al segundo lugar con 2.8 millones de defunciones y en 1999 la cifra fue similar a la registrada en 1997. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los últimos quince años, el número de casos se ha incrementado en aproximadamente 20 %, pasando de casi tres millones de casos registrados en el periodo 1984 – 1986 a poco mas de tres millones seiscientos mil casos en 1998. Dados los problemas de sub-registro en muchas partes del mundo es probable que la cifra sea mucho mayor (1, 31, 40).

En América Latina, el comportamiento de la TB ha seguido el patrón de incremento registrado a nivel mundial, teniendo a Perú y Bolivia como los países con la mayor incidencia (31, 40). En el Perú según los datos del Ministerio de Salud en el periodo 1987 – 2000 la tasa de incidencia de TB en todas sus formas tuvo una media de 179.6 x 100000 hab. (desviación estándar 33.9) mientras la TB pulmonar frotis positivo alcanzó una media de 120.4 x 100000 hab. (desviación estándar 21.4) (1, 31).

Ante esta alarmante situación mundial, en el año 1993 la OMS ha declarado a la TB como una “emergencia sanitaria mundial”, colocando a esta enfermedad al mismo nivel de prioridad de la malaria y la infección por HIV (31, 46).

Para poder contrarrestar el avance de la TB la OMS ha planteado en los últimos años el desarrollo de una serie de estrategias. Uno de los logros mas importantes ha sido la implementación en muchas partes del mundo de la estrategia del Tratamiento Acortado Directamente Observado (DOTS, por sus siglas en inglés). El DOTS tiene como fin asegurar el cumplimiento del tratamiento basado en una terapia cuádruple con los antibióticos Rifampicina, Isoniacida, Pirazinamida y Etambutol. Esta terapia ha sido diseñada para lograr la rápida curación de los pacientes con TB y evitar la aparición de cepas resistentes a estos antibióticos (1, 31, 46). Sin embargo, debido al incumplimiento de los pacientes para tomar las dosis de tratamiento requeridas o la aplicación de terapias incorrectas (por la poca eficacia y eficiencia de los Programas de Control de la TB antes de la implementación del DOTS) la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los antibióticos usados en los modernos esquemas de tratamiento ha sido inevitable. Dentro de los diferentes patrones de resistencia las llamadas cepas multidrogorresistentes de *M. tuberculosis* (cepas MDR) o resistentes

simultáneamente a Isoniacida y Rifampicina (con resistencia a otras drogas o sin ella) constituyen un importante problema de salud pública para el control de la TB (27, 32). Los pacientes con TB infectados con cepas MDR tratados con los antibióticos usados en la estrategia DOTS tienen una tasa de curación con un rango de 5 a 60 % (1, 31, 32, 35). *M. tuberculosis*, al igual que otros agentes, se dispersa a través del aire en partículas (llamadas “núcleos de gotas”) que se producen cuando una persona con TB pulmonar o laríngea tose, estornuda o habla (14). El objetivo principal del diagnóstico y tratamiento de los pacientes con TB es curar rápidamente interrumpiendo la cadena de transmisión de *M. tuberculosis* hacia personas sanas (1, 31, 32). Por lo tanto una rápida determinación del perfil de susceptibilidad antibiótica en aislamientos de *M. tuberculosis* ofrecerá al médico la información sobre el mas adecuado tratamiento individual de los pacientes y para establecer estrategias aplicables en el control de la tuberculosis a nivel poblacional (1, 31, 32).

Las técnicas tradicionales para evaluar la susceptibilidad a drogas antituberculosis se basan en la inoculación y subsecuente desarrollo de colonias de *M. tuberculosis* en medios de cultivo a base de huevo o agar en presencia de una droga; actualmente dentro de esta categoría son aceptadas como pruebas estándar: el Método de la Concentración Absoluta, el Método de la Razón de Resistencia y el Método de las Proporciones (23). Sin embargo, un rasgo común de estas pruebas es la necesidad de largos periodos de incubación para obtener un desarrollo bacteriano adecuado. Así por ejemplo el Método de las Proporciones en el medio Löwenstein-Jensen (la prueba estándar usada en el Perú por el Instituto Nacional de Salud) requiere de 28 – 40 días para obtener un resultado (17, 24). El largo tiempo requerido de estas pruebas limita

en gran medida su utilidad para asignar los mas efectivos tratamientos y evitar la diseminación de la TB - MDR (18). Frente a este problema, el desarrollo de un equipo radiométrico automatizado llamado BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Sparks, Md.) ha permitido reducir el tiempo requerido (4 – 12 días) para determinar la susceptibilidad antibiótica de cepas de *M. tuberculosis* a drogas de primera línea para el tratamiento de TB (18, 23, 42). Dada la alta concordancia entre este método y el Método de las Proporciones, el BACTEC 460 TB es actualmente usado como el método estándar para determinar la susceptibilidad antibiótica de cepas de *M. tuberculosis* en países desarrollados (42). Este método se basa en la comparación del crecimiento micobacteriano en un medio de cultivo líquido sin droga conteniendo [$^{14}\text{CO}_2$] ácido palmítico como fuente de carbono frente al mismo medio de cultivo con una concentración crítica de antibiótico. Periódicamente usando BACTEC 460 TB se cuantifica la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ producido por oxidación del [$^{14}\text{CO}_2$] ácido palmítico, lo que refleja la actividad micobacteriana y por lo tanto la viabilidad de la bacteria. Este instrumento convierte la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ en valores GI (índice de crecimiento) con un rango de 0 a 999; usando estos valores se puede determinar el patrón de susceptibilidad de una cepa de *M. tuberculosis* al antibiótico evaluado (42). Los avances en el campo de la biología molecular también han promovido el desarrollo de nuevos métodos para la detección de cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Entre las técnicas mas populares tenemos: Secuenciamiento automatizado de ADN, PCR SSCP, PCR HDF, LIPA (ensayo de hibridación en fase sólida), las

cuales pueden detectar resistencia a Rifampicina, Isoniacida, Estreptomycin y Ciprofloxacina (25, 26, 45).

Aunque el sistema radiométrico automatizado BACTEC 460 y los métodos moleculares han logrado acortar el tiempo necesario para determinar el patrón de susceptibilidad antibiótica de cepas de *M. tuberculosis*, su alto costo y requerimiento de equipos sofisticados hacen su uso rutinario muy difícil en países en vías de desarrollo, donde se encuentra la mayor cantidad de pacientes con tuberculosis (28).

La búsqueda de nuevos métodos tanto rápidos como de bajo costo para la evaluación de la susceptibilidad de cepas de *M. tuberculosis* ha impulsado el desarrollo de técnicas que usan marcadores de viabilidad en lugar de depender de un incremento de la biomasa bacteriana (44). Una estrategia ha sido el uso de indicadores colorimétricos de óxido - reducción, tal como el compuesto comercial AlamarBlue™ (9, 26, 34, 49). Otra estrategia está basada en el sistema comercial BBL™ MGIT™ (Mycobacteria Growth Indicator Tube) el cual usando un indicador fluorescente puede mostrar si una cepa es resistente o sensible a los antibióticos antituberculosis de primera línea (7, 8, 19, 37, 43). Otras técnicas en actual investigación están basadas en el uso de Micobacteriófagos (26, 36). Los Micobacteriófagos son ADN virus que infectan micobacterias (15, 16, 18, 22). Estos virus son extremadamente prevalentes en la naturaleza con mas de 250 tipos aislados en su mayoría de muestras de suelo (2, 22). Uno de los Micobacteriófagos mas estudiados es el D29. Este Micobacteriófago fue aislado del suelo por Froman y col. en 1954 e infecta a un amplio rango de micobacterias que incluyen a *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* (22,

29). David y col. (1980) mostraron el efecto supresor de las drogas antituberculosis y antilepra sobre el ciclo de replicación de Micobacteriófagos en micobacterias de crecimiento lento y rápido (11, 12). Posteriormente Wilson y col. evaluaron el potencial del Micobacteriófago D29 como herramienta en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a drogas antituberculosis (48). Eltringhan y col. y McNerney y col. han corroborado el potencial del Micobacteriófago D29 en las pruebas de susceptibilidad para ciertas drogas antituberculosis de primera y segunda líneas (15, 16, 28, 30).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la **exactitud discriminatoria** de la prueba rápida de susceptibilidad del Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de cepas de *M. tuberculosis* a Rifampicina e Isoniacida. La exactitud discriminatoria de la prueba evaluada fue definida como la capacidad para identificar correctamente a n_1 sujetos conocidos de estar infectados con una cepa de *M. tuberculosis* resistente y a n_0 sujetos conocidos de estar infectados con una cepa de *M. tuberculosis* sensible (13).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida de susceptibilidad del Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina e Isoniacida usando como prueba estándar el Método de las Proporciones.

-Determinar el valor predictivo positivo y negativo de la prueba rápida de susceptibilidad del Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina e Isoniacida.

-Determinar la concordancia de los resultados de la prueba rápida de susceptibilidad del Micobacteriófago D29 frente a las pruebas rápidas del Tubo Indicador del Crecimiento de Micobacterias Growth (MGIT) y MABA (Microtiter Alamar Blue Assay).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue llevado a cabo de octubre 2001 a marzo 2003 en los laboratorios del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica y del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de Lima, Perú. El estudio fue de observación, transversal, prospectivo y comparativo.

3.1 Muestra de estudio

Se emplearon 93 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes de diferentes servicios de salud del Perú. Esta muestra constituye el total de cepas disponibles de la colección de los institutos anteriormente mencionados en el periodo de estudio. Las cepas fueron identificadas mediante métodos bioquímicos convencionales los cuales han incluido acumulación de niacina, nitrato reductasa y catalasa (24). Las cepas fueron subcultivadas a partir de tubos stock en el medio Löwenstein-Jensen e incubadas durante 3 semanas a 37 °C antes de ser evaluadas.

3.2 Cepas estándar

1. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (proporcionado por el Instituto Nacional de Salud, Lima – Perú)
2. *Mycobacterium smegmatis* mc²155 (proporcionado por la Dra. Ruth McNerney, London School of Hygiene and Tropical Medicine, LSHTM).
3. Micobacteriófago D29 (proporcionado por la Dra. Ruth McNerney, LSHTM).

3.3 Medios y reactivos

1. Caldo Luria (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany).
2. Agar Luria (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany).
3. Agar (Becton-Dickinson, Sparks, USA).

4. Medio Löwenstein-Jensen (Remel, Lenexa, KS).
5. Caldo Middlebrook 7H9 (Remel, Lenexa, KS).
6. Cloruro de Calcio (EM Science, Darmstadt, Germany).
7. Glicerol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany).
8. Suplemento Ácido oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa (OADC, Becton-Dickinson)
9. Indicador de óxido reducción AlamarBlue™ (BioSource Europe, S.A).
10. Antibióticos: Rifampicin e Isoniacida (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany).
11. Metanol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany).
12. Mycobacteria Growth Indicator Tube (BBL™ MGIT™ AST SIRE System, Becton Dickinson).
13. Sulfato ferroso amoniaco (FAS) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany).
14. Tween 80 (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany).
15. Solución salina 0.85 %.

3.4 Material de vidrio

1. Perlas de vidrio (3 mm de diámetro).
2. Pipetas Pasteur.

3.5 Material de plástico

1. Placa de microtitulación de 96-pozos (Becton-Dickinson, Sparks, USA).
2. Placas Petri de poliestireno -100 por 15 mm (Becton-Dickinson, Sparks, USA).
3. Puntas con filtro para pipetas automáticas de 10, 100, 1000 µL.
4. Puntas sin filtro para pipetas automáticas de 10, 100, 1000 µL.

5. Filtros para jeringa, poro de 0.22 μm (Fisher Scientific, Ireland).
6. Jeringas descartables de 5 mL (Chun Woo Medical, Korea).
7. Asas bacteriológicas descartables.

3.6 Instrumentos y equipos

1. Pipetas automáticas de 10, 200 y 1000 μL (Gilson, Villiers, France).
2. Pipeta multicanal automática, 50 – 200 μL .
3. Incubadora a 37 °C (rango de variación $\pm 1^\circ\text{C}$).
4. Baño María (Precision Scientific Group, Chicago, USA).
5. Mezclador o agitador de Vortex.
6. Transiluminador UV (365 nm).
7. Balanza analítica.
8. Espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb).

3.7 Métodos

3.7.1 Prueba estándar: Método de las Proporciones en el Medio Löwenstein - Jensen

3.7.1.1 Principio de la prueba

Este método convencional desarrollado por Canetti, Rist y Grosset emplea una concentración crítica de antibiótico para determinar la proporción de mutantes resistentes a dicho antibiótico en la población bacteriana de *M. tuberculosis* (23, 24). Un aislamiento de *M. tuberculosis* debe ser considerado resistente a Rifampicina si 1 % o más de la población bacteriana crece en presencia de 40 μg / mL de este

antibiótico. Para Isoniacida la concentración usada es 0.2 μg / mL bajo el mismo criterio usado para Rifampicina (24) .

3.7.1.2 Procedimiento

La susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida fue evaluada usando las 93 cepas de *M. tuberculosis* disponibles de acuerdo a los siguientes pasos:

3.7.1.3 Preparación del Inóculo:

- a) De 3 a 5 colonias del crecimiento de *M. tuberculosis* en el medio Löwenstein-Jensen fueron colectadas con un asa bacteriológica y colocadas en un tubo conteniendo 3 mL de medio Middlebrook 7H9 y 8 - 10 perlas de vidrio.
- b) La suspensión fue homogenizada en un agitador de vórtex durante 2 minutos.
- c) Los tubos fueron mantenidos en reposo durante 20 minutos.
- d) El sobrenadante homogéneo fue transferido a un tubo 13 por 100 mm y la turbidez fue ajustada a la escala de McFarland 0.5 (aproximadamente 1.5×10^8 bacterias /mL) el cual corresponde a 0.1 de densidad óptica a 625 nm (6).
- e) La suspensión ajustada fue diluida a 10^{-2} y 10^{-4} con agua destilada estéril.

3.7.1.4 Inoculación e Incubación

- a) Cada cepa fue ensayada usando 2 series de tubos con medio de cultivo Löwenstein-Jensen (uno para cada dilución del inóculo) conteniendo Rifampicina 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Isoniacida 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sin antibiótico (control); el total fue de 6 tubos por cepa.
- b) Cada tubo fue inoculado con 100 μL de cada dilución.

c) Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente en posición horizontal durante 24 horas y luego a 37 °C en posición vertical hasta concluir la prueba.

d) Después de 28 días de incubación, el número de colonias en el tubo con antibiótico fue comparado con el tubo control sin antibiótico para calcular la proporción de clones resistentes. Las cepas cuyo resultado indicaba susceptibilidad a los antibióticos evaluados fueron incubadas por un periodo adicional de 20 días.

e) Para ambos antibióticos, si la proporción de clones resistentes fue mayor o igual al 1 % la cepa fue considerada resistente, y sensible en el caso contrario.

3.7.2 Prueba Rápida de Susceptibilidad del Micobacteriófago D29.

3.7.2.1. Principio de la prueba

Esta prueba se basa en la interacción Micobacteriófago - hospedero la cual se inicia con una unión altamente específica entre las fibras de la cola del Micobacteriófago y receptores específicos en la pared celular de la micobacteria. Luego de la adsorción, se produce la penetración del ADN viral a través de la pared celular bacteriana iniciándose una re - programación de la actividad celular para sintetizar eficientemente las proteínas codificadas por ADN viral. El proceso continuará con la formación de nuevos virus en el interior de la bacteria, los que con la consiguiente lisis bacteriana serán liberados al medio para volver a iniciar el proceso (11, 48).

El ciclo anteriormente descrito sólo será posible si la célula hospedera es viable, por lo tanto, si se expone un cultivo de *M. tuberculosis* a una infección por el Micobacteriófago D29 la eficiente replicación del virus indicaría indirectamente la viabilidad de la micobacteria (16, 48).

Aplicando estos conceptos al exponer una cepa de *M. tuberculosis* sensible a Rifampicina a una concentración crítica de Rifampicina este antibiótico que inhibe a la enzima ARN polimerasa se dañará letalmente a la bacteria al interferir con el mecanismo de replicación de la bacteria. Si después de ello se expone esta cepa de *M. tuberculosis* a una infección con el Micobacteriófago D29 la replicación del virus no procederá; si una cepa *M. tuberculosis* resistente a Rifampicina es expuesta a las mismas condiciones, el antibiótico no interferirá con su mecanismo de replicación y por lo tanto el Micobacteriófago D29 infectará estas bacterias y el proceso continuará hasta la lisis bacteriana (16). Otras drogas como la Isoniacida no interfieren directamente con la replicación del Micobacteriófago D29, pero su efecto deletéreo sobre las bacterias sensibles a ellas las hace no viables y por lo tanto el Micobacteriófago D29 no puede replicarse en ellas (15, 16, 30).

3.7.2.2 Procedimiento

La susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida fue evaluada usando las 93 cepas de *M. tuberculosis* disponibles de acuerdo a los siguientes pasos:

3.7.2.3 Preparación de soluciones de Rifampicina e Isoniacida

- a) Se preparó una solución madre de Rifampicina pesando 10 mg del antibiótico en una balanza analítica y diluyéndolos en 1 mL de metanol. La solución fue esterilizada mediante filtración (filtro de 0.22 μm). Se distribuyó alícuantas de 10 μL en tubos de microcentrífuga y se les mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.
- b) La solución madre de Isoniacida fue preparada de la misma manera, excepto que se usó agua destilada en lugar de metanol.

c) Las soluciones de trabajo fueron preparadas usando caldo Luria con 1mM CaCl₂ (LB-S).

3.7.2.3 Preparación de la muestra

a) Se colocó 3 mL de caldo LB-S en un tubo con 8 - 10 perlas de vidrio (3 mm de diámetro). Se colocaron en el mismo tubo varias colonias de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* a investigar, con un asa bacteriológica.

b) A fin de obtener una suspensión homogénea, la muestra fue sometida a agitación en un mezclador de vórtex durante 2 minutos. Luego el tubo fue mantenido en reposo durante 20 minutos. El sobrenadante fue retirado y colocado en otro tubo usando una pipeta Pasteur. De la misma manera fue procesada la cepa control *M. tuberculosis* H37Rv.

3.7.2.4 Procesamiento de la muestra

El procesamiento de la muestra fue llevado a cabo siguiendo una modificación de los procedimientos descritos por McNerney (30), e indicados en la Figura 1.

3.7.2.5 Preparación e inoculación de las placas indicadoras

a) Para determinar el nivel de infección Micobacteriófago - bacterias en los tubos con antibiótico y sin él se preparó placas indicadoras colocando 20 mL de agar Luria suplementado con CaCl₂ (1.5% agar) en placas Petri. Las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta solidificar y luego almacenadas a 4 °C hasta su posterior uso, dentro de los 30 días.

b) Sobre la superficie de las placas de agar Luria fue vertido 4 mL de agar – agar 0.9 % licuado (mantenido a 50 °C en un baño maría) conteniendo 400 µL de un cultivo

en fase estacionaria de la cepa de *M. smegmatis* mc²155 y 100 µL de la suspensión de *M. tuberculosis* procesada, diluida 1:4. Se dejó solidificar a temperatura ambiente, y luego las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

c) Después del periodo de incubación, se contó y registró el número de unidades formadoras de placas (UFP) tanto en las placas tratadas con antibiótico (T) como en las control sin antibiótico (C).

d) Con los datos de c) se calcularon los porcentajes de reducción de la infección de *M. tuberculosis* por el Micobacteriófago D29 causadas por el antibiótico de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% R = \left[1 - \frac{\# \text{UFP}_T}{\# \text{UFP}_C} \right] \cdot 100$$

donde % R es el porcentaje de reducción, # UFP_T es el número de unidades formadoras de placas en la muestra expuesta al antibiótico y # UFP_C es el número de unidades formadoras de placas en la misma muestra no expuesta al antibiótico.

e) Las cepas de *M. tuberculosis* con porcentajes de reducción mayores del 90% fueron consideradas sensibles y aquellas con un porcentaje menor, resistentes (15, 16). Placas Petri mostrando el típico patrón de susceptibilidad en cepas sensibles y resistentes a los antibióticos evaluados son mostradas en la Figura 2.

3.7.3 Concordancia entre la Prueba del Micobacteriófago D29 y otras pruebas rápidas

Se determinó la concordancia entre los resultados de la prueba de susceptibilidad para drogas Antibacterianas del Micobacteriófago D29 y otras pruebas rápidas, usando una muestra aleatoria correspondiente al 65 % (60 / 93) de las cepas de *M. tuberculosis* disponibles. Las pruebas rápidas seleccionadas fueron: Método Colorimétrico MABA (Microtiter Alamar Blue Assay) y Prueba de susceptibilidad usando el Sistema del Tubo Indicador del Crecimiento de Micobacterias Growth (MGIT). Los detalles de las pruebas rápidas son indicados a continuación.

3.7.3.1 Prueba de Susceptibilidad usando el Método Colorimétrico MABA (Microtiter Alamar Blue Assay)

3.7.3.1.1 Principio de la prueba

El ambiente intracelular de las bacterias patógenas en activa replicación es mas reductor en comparación con el ambiente interno de las células que no se replican. Específicamente, las razones NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN, y NADH/NAD, se incrementan durante la replicación celular. Compuestos como AlamarBlue™, pueden ser reducidos por estos intermediarios metabólicos, la reducción del AlamarBlue™ es acompañado por un visible cambio de color. Este indicador de oxido - reducción cambia de azul a rosado cuando se reduce ofreciendo una medición simple (visual) de la viabilidad de un microorganismo (9, 34).

3.7.3.1.2 Procedimiento

La susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida fue evaluada usando 60 cepas de *M. tuberculosis* de las 93 disponibles (65 %) de acuerdo a los siguiendo paso:

3.7.3.1.3 Preparación de antibióticos

Los antibióticos fueron preparados siguiendo los mismos procedimientos indicados en la sección anterior excepto que las soluciones de trabajo fueron preparadas usando Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y 0.5 % glicerol (7H9-P).

3.7.3.1.4 Preparación del inóculo.

- a) El inóculo fue preparado tomando con un asa bacteriológica el crecimiento de un cultivo fresco (2 a 5 semanas) de *M. tuberculosis* en el medio Löwenstein-Jensen y luego fue colocado en un tubo de vidrio con perlas de vidrio conteniendo 3 mL de caldo 7H9-P.
- b) La muestra fue homogenizada en un agitador de vórtex durante 1 minuto y luego fue mantenida en reposo durante 15 minutos.
- c) El sobrenadante homogéneo fue colocado en un nuevo tubo y su turbidez fue ajustada a la correspondiente al tubo N° 1 de McFarland usando un espectrofotómetro (0.2 de densidad óptica a 620 nm).
- d) La suspensión ajustada fue diluida 1:20 en 7H9-P. Esta dilución fue el inóculo de trabajo.

3.7.3.1.5 Inoculación e Incubación

- a) Se colocó 200 µL de agua destilada estéril en cada pocillo de la periferia de una placa de microtitulación de 96 pozos.
- b) Los restantes 60 pozos fueron llenados con 100 µL de 7H9-P. En la fila superior fueron colocadas las soluciones de Rifampicina e Isoniacida a una concentración 4

veces la máxima concentración a ser ensayada (2 µg/mL para Rifampicina y 1 µg/mL para Isoniacida).

c) Se realizaron diluciones seriadas, transfiriendo un volumen de 100 µL de cada pozo al siguiente con una pipeta multicanal.

d) Se colocó 100 µL del inóculo de trabajo en cada pozo.

e) Cada muestra contó con 4 pozos para controles de crecimiento, conteniendo 7H9-P mas el inóculo de trabajo. Se incluyó un pozo control de esterilidad del medio de cultivo en cada placa.

f) Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 5 días.

g) Al quinto día se agregó 12 µL de Tween 80 al 20% y 20 µL de Alamar Blue a uno de los pozos de control de crecimiento. Las placas fueron incubadas nuevamente por 24 horas y observó si aparecía el cambio de color del indicador, de azul a rosado; de no ser así, se agregó 12 µL de Tween 80 al 20% y 20 µL de Alamar Blue a otro de los pocillos de control de crecimiento, repitiendo esto con los siguientes 2 pocillos, si fuese necesario. Al aparecer el cambio de azul a rosado, se agregó 12 µL de Tween 80 al 20% y 20 µL de Alamar Blue al resto de los pozos e incubó las placas 24 horas mas a 37 °C.

h) La prueba fue interpretada usando la siguiente regla: las cepas con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a Rifampicina que superen el punto critico > 0.125 µg/mL fueron indicativos de resistencia. La misma regla fue usada para Isoniacida.

3.7.3.2 Prueba de susceptibilidad para drogas Antibacterianas en *M. tuberculosis*, usando el Sistema del Tubo Indicador del Crecimiento de Micobacterias (MGIT).

3.7.3.2.1 Principio de la prueba

Este sistema usa un indicador fluorescente embebido en una silicona ubicado en el fondo de un tubo de 16 por 100 mm que contiene un caldo Middlebrook 7H9 enriquecido. La fluorescencia del indicador es restringida en presencia de oxígeno, sin embargo, cuando un microorganismo metabólicamente activo usa el oxígeno disponible dentro del tubo se activa la fluorescencia. La fluorescencia indicadora del crecimiento bacteriano puede ser detectada cuando el tubo MGIT es expuesto a una luz ultravioleta de 365 nm. Colocando una cepa de *M. tuberculosis* en un tubo MGIT conteniendo un antibiótico puede determinarse la susceptibilidad por comparar la intensidad de la fluorescencia de este tubo con un tubo control sin antibiótico (7, 8, 19, 33, 37).

3.7.3.2.2 Procedimiento

La susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida fue evaluada usando 60 cepas de *M. tuberculosis* de las 93 disponibles (65 %) de acuerdo a los siguientes pasos:

3.7.3.2.3 Preparación de antibióticos

La Rifampicina e Isoniacida (S.I.R.E. drug kit; BD Biosciences) fueron preparados reconstituyendo los productos liofilizados usando agua destilada siguiendo las indicaciones de los fabricantes, que los provee en esta forma, prepesados, estériles y listos para emplearse.

3.7.3.2.4 Preparación del Inóculo.

- a) El inóculo fue preparado tomando con un asa bacteriológica el crecimiento de un cultivo fresco (2 a 5 semanas) de *M. tuberculosis* en el medio Löwenstein-Jensen y luego fue colocado en un tubo de vidrio con 8 - 10 perlas de vidrio conteniendo 4 mL de caldo 7H9-P.
- b) La suspensión fue homogenizada en un agitador de vórtex durante 1 minuto.
- c) La suspensión fue mantenida en reposo durante 20 minutos.
- d) El sobrenadante homogéneo fue transferido a otro tubo estéril y mantenido en reposo nuevamente durante 15 minutos.
- e) El sobrenadante fue transferido a un tercer tubo y la turbidez de la suspensión bacteriana fue ajustada a la correspondiente al tubo de McFarland 0.5.
- f) La suspensión ajustada fue diluida 1:5 con solución salina. Este fue el inóculo de trabajo.

3.7.3.2.5 Inoculación e Incubación de Tubos MGIT.

- a) Para cada cepa evaluada fueron usados 3 tubos. Los tubos fueron rotulados como: control de crecimiento (CC), Rifampicina (RIF) e Isoniacida (INH).
- b) Se agregó 0.5 mL del suplemento OADC a cada tubo
- c) Se agregó con una micropipeta fue adicionado 100 μ L de la solución de antibiótico correspondiente a los tubos RIF e INH (estos antibióticos son proveídos por el fabricante). El tubo CC no recibió antibiótico.
- d) Se agregó con una micropipeta 500 μ L del inóculo de trabajo a cada tubo.
- e) Los tubos fueron incubados a 37 °C.

3.7.3.2.6 Lectura de los tubos MGIT.

- a) Los tubos fueron retirados de la incubadora al tercer día y colocados sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UV).
- b) La fluorescencia de los tubos CC fue comparada con la de los tubos control positivo (tubo MGIT vaciado y vuelto a llenar con 4 mL de sulfito de sodio 1%) y negativo (tubo MGIT sin inocular). Los tubos de control positivo muestran una fuerte fluorescencia naranja en el fondo y en el menisco. El control negativo muestra una escasa fluorescencia.
- c) Si la fluorescencia en el tubo CC fue comparable a la del control positivo ello se consideró como un crecimiento positivo, indicando que deben interpretarse los tubos con antibiótico.
- d) Si la fluorescencia del tubo CC fue semejante al control negativo, los tres tubos fueron reincubados y controlados diariamente durante 12 días. Transcurrido este periodo la prueba fue considerada descartada y la prueba debe llevarse a cabo nuevamente.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Para describir la distribución de los datos obtenidos en la prueba del Micobacteriófago D29 se usó la técnica de **distribución de frecuencias** (3, 5).

La determinación del nivel de discriminación de las pruebas evaluadas (la capacidad de la prueba para separar correctamente las cepas de *M. tuberculosis* resistentes de las sensibles a los antibióticos evaluados) se realizó usando la **Curva de Operación Característica del Receptor (ROC)**. La curva ROC proporciona un buen índice de la capacidad de una prueba diagnóstica para discriminar entre estados alternativos de salud cuando los resultados son medidos en escala ordinal, intervalo o razón (10, 13, 21). El área bajo la curva ROC (AUC) es el mejor indicador global de la exactitud discriminatoria de una prueba diagnóstica (10, 13, 21). El AUC tiene un rango de 0.5 (sin capacidad discriminante) a 1 (discriminación perfecta) (10, 13, 21). Los valores del AUC fueron interpretados usando la siguiente regla: un AUC de 0.5 a 0.7 indica una baja exactitud, de 0.7 a 0.9 la prueba puede ser útil para algunos propósitos; valores por encima de 0.9 indican una alta exactitud de la prueba (10, 13, 21). Los cálculos fueron llevados a cabo usando la opción ROC CURVE del programa SPSS versión 11.0. La variación de la sensibilidad y especificidad según el punto de corte elegido fueron analizados adicionalmente a través de graficas bidimensionales.

Los parámetros de diagnóstico sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo fueron estimados según la siguiente definición:

a) **Sensibilidad (SEN)**, definida como la probabilidad que una cepa sea detectada como resistente en la prueba rápida siendo verdaderamente resistente, fue calculada usando la siguiente fórmula (20, 38, 39, 41):

$$\text{SEN} = \left[\frac{\text{N}^\circ \text{ cepas resistentes según la prueba rápida y el Método de las Proporciones}}{\text{N}^\circ \text{ cepas resistentes totales según el Método de las Proporciones}} \right]$$

b) **Especificidad (ESP)** definida como la probabilidad que una cepa sea detectada como sensible en la prueba rápida siendo verdaderamente sensible, fue calculada usando la siguiente fórmula (20, 38, 39, 41):

$$\text{ESP} = \left[\frac{\text{N}^\circ \text{ cepas susceptibles según la prueba rápida y el Metodo de las Proporciones}}{\text{N}^\circ \text{ cepas susceptibles totales según el Método de las Proporciones}} \right] \cdot 100$$

c) **Valor Predictivo Positivo (VPP)**, definido como la probabilidad que una cepa sea verdaderamente resistente apareciendo como resistente en la prueba rápida. El VPP fue calculado usando el Teorema de Bayes (20, 39, 41):

$$\text{VPP} = \left[\frac{p(D) \cdot \text{SEN}}{p(D) \cdot \text{SEN} + [(1 - p(D)) \cdot (1 - \text{ESP})]} \right] \cdot 100$$

donde $p(D)$ es la probabilidad que tiene una cepa de ser resistencia a un determinado antibiótico antes de llevarse a cabo la prueba rápida (la prevalencia de resistencia a un determinado antibiótico en cepas aisladas en la población donde será usada la prueba puede ser usada para estimar el valor de $p(D)$).

c) **Valor Predictivo Negativo (VPN)**, definido como la probabilidad que una cepa sea verdaderamente sensible apareciendo como sensible en la prueba rápida. El VPN fue calculado usando el Teorema de Bayes (20, 39, 41):

$$\text{VPN} = \left[\frac{[1 - p(D)] \cdot \text{ESP}}{[1 - p(D)] \cdot \text{ESP} + [p(D) \cdot (1 - \text{SEN})]} \right] \cdot 100$$

La definición de los términos en la formula anterior fue la misma usada para VPP.

El nivel de concordancia en los resultados de las pruebas rápidas fue medido usando el índice de concordancia kappa (κ) de acuerdo a los métodos descritos por Altman D (4). Este estadístico fue interpretado de la siguiente manera:

< 0.20	ninguna
0.21 – 0.40	escasa
0.41 - 0.60	moderada
0.61 – 0.80	buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Los cálculos fueron llevados a cabo usando la opción Crosstabs del programa SPSS versión 11.0.

5. RESULTADOS

5.1. Patrón de susceptibilidad antibiótica según el Método de las Proporciones

El patrón de susceptibilidad de las cepas evaluadas es mostrado en la TABLA 1. De acuerdo al método de las proporciones el 49.4 % de las 93 cepas evaluadas fueron resistentes a Rifampicina o Isoniacida y el porcentaje restante fue susceptibles a ambas drogas. Con respecto a Rifampicina según este método el 46 % (43/93) de las cepas de *M. tuberculosis* fue resistente mientras el 54 % (50/93) fue susceptible. Para Isoniacida, el Método de las Proporciones ha indicado que 49 % (46/93) de las cepas de *M. tuberculosis* fueron resistentes mientras que 51 % (47/93) fueron susceptibles. Dentro del grupo de las cepas resistentes el 93.5 % (43/46) fueron MDR.

5.2. Patrón de susceptibilidad antibiótica según el Método del Micobacteriófago D29

La distribución de los porcentajes de reducción del número de unidades formadoras de placa del Micobacteriófago D29 de acuerdo al patrón de susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida obtenido en el método de las proporciones es mostrado en las Figuras 3 y 4. Tal como puede apreciarse para Rifampicina hay una consistente pérdida de viabilidad de los bacilos de *M. tuberculosis* sensibles expuestos durante 24 horas, mientras la viabilidad de los bacilos resistentes se mantiene casi constante. Por el contrario, para Isoniacida hay una disminución de la viabilidad de las cepas susceptibles, pero no en el nivel observado para Rifampicina; aun cuando los bacilos fueron expuestos durante 48 horas, los bacilos resistentes han mostrado un rango de variabilidad amplio.

La capacidad discriminante de la prueba de susceptibilidad para Rifampicina e Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 según el área bajo la curva (AUC) de la curva ROC son mostrados en las Figuras 5 y 7. Con un valor mayor a 0.9 la prueba para Rifampicina muestra una alta exactitud mientras la prueba para Isoniacida podría ser útil para algunos propósitos. La variación de la sensibilidad y especificidad de la Prueba del Micobacteriófago D29 para Rifampicina e Isoniacida según el porcentaje de reducción de la infección de *M. tuberculosis* por el Micobacteriofago D29 causadas por el antibiótico elegido como punto de corte es mostrado en las Figuras 6 y 8. De acuerdo a este gráfico un rango de 88.8 % a 90 % de inhibición de la infección viral para Rifampicina incluiría la máxima sensibilidad y especificidad (100 y 98 % respectivamente). De igual modo para Isoniacida un rango de 90 a 90.3 de inhibición de la infección viral incluiría la máxima sensibilidad y especificidad (80.4 y 80.8 % respectivamente). Considerando un punto de corte de 90 % de inhibición de la infección viral, sugerido por otros investigadores (16), la sensibilidad y especificidad es mostrada en la Figura 9. El valor predictivo positivo y negativo de esta prueba en la detección de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y sensibles a Rifampicina e Isoniacida es mostrado en las Figuras 10 y 11.

La concordancia entre la resistencia a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 y el patrón de susceptibilidad multidrogoresiste es mostrado en la TABLA 2. De acuerdo al índice de concordancia kappa la concordancia fue muy buena entre estas pruebas.

La sensibilidad y especificidad fueron 100 y 98 % respectivamente. El AUC de la curva ROC fue 0.995 (Figura 12). El valor predictivo de la asociación resistencia de

la Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 con la multidrogorresistencia es mostrado en la Figura 13. Por el contrario, los resultados de la prueba de susceptibilidad a Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 tuvieron una concordancia moderada (Tabla 7).

5.3. Concordancia entre las pruebas del Micobacteriófago D29, MABA y MGIT.

Con respecto a Rifampicina, en la muestra de 60 cepas distribuidas según el método de las proporciones (método estándar) en 32 resistentes y 28 sensibles, la prueba de MGIT ha tenido una concordancia perfecta. Por el contrario, la prueba MABA ha detectado como resistentes a 31 y susceptibles a 27 de las 60 cepas evaluadas. La curva ROC de MABA en la determinación de la susceptibilidad a Rifampicina es mostrada en la Figura 14. El AUC de esta prueba fue muy similar al mostrado en para la prueba usando el Micobacteriófago D29. La concordancia entre la prueba de susceptibilidad a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 y MGIT es mostrada en la Tabla 3. De acuerdo al índice de concordancia kappa la concordancia fue muy buena entre estas pruebas. La concordancia entre la prueba de susceptibilidad a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 y MABA es mostrada en la Tabla 4. De acuerdo al índice de concordancia kappa la concordancia fue muy buena entre estas pruebas. Para Isoniacida el patrón de susceptibilidad de las 60 cepas seleccionadas según el método de las proporciones fue 27 sensibles y 33 resistentes; de ellas MABA detectó como sensibles a las mismas 27 cepas y como resistentes a solamente 30 cepas (3 cepas fueron falso - sensibles). La curva ROC de MABA en la determinación de la susceptibilidad a Isoniacida es mostrada en la Figura 15. El AUC de MABA indica que esta prueba tiene una mejor capacidad discriminante que la

prueba del Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Isoniacida. La concordancia entre la prueba de susceptibilidad a Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 y MABA es mostrada en la Tabla 5. Según el índice de concordancia kappa la concordancia fue moderada. El MGIT detectó como resistentes al total de las cepas resistentes y como sensibles a 26 cepas (una cepa se clasificó como falsamente resistente). La concordancia entre la prueba de susceptibilidad a Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 y MGIT es mostrada en la Tabla 6. La concordancia entre las pruebas también fue moderada.

6. DISCUSION

Después de la publicación de los hallazgos de Wilson y col. (48) sobre el potencial del Micobacteriófago D29 como una herramienta en la determinación de la susceptibilidad antibiótica de *M. tuberculosis* ha habido un creciente interés por diseñar y mejorar pruebas basadas en este Micobacteriófago.

Con respecto a Rifampicina, en la mayoría de los procedimientos hasta la fecha publicados el medio de cultivo empleado ha sido el medio sintético Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (Acido Oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y cloruro de calcio. Así, Wilson y col (1997) empleando este medio de cultivo en el Ensayo del Fago Biológicamente Amplificado (PhaB), encontraron una sensibilidad del 100 % (9 / 9) y una especificidad del 94.6 % (35/37) usando como prueba estándar el Método de la Razón de Resistencia (48). Aunque el empleo de un número pequeño de cepas resistentes hacia necesario un nuevo estudio para estimar adecuadamente el valor de la sensibilidad de la prueba, ya era evidente el alto grado de concordancia entre esta prueba y el método estándar.

Algo mas tarde, en 1998, Mc Nerney y col. usando caldo Luria mas cloruro de calcio en el ensayo de replicación del fago en placas de microtitulación (microwell phage replication assay) en dos muestras independientes de 18 y 19 cepas de *M. tuberculosis* han obtenido en ambos casos 100% de concordancia entre esta prueba y el método de las proporciones en el medio de cultivo Middlebrook 7H10 (30). Debido a una carencia en el número de cepas sensibles (sólo una cepa de las 37 evaluadas) no es posible determinar la especificidad de esta prueba, pero nuevamente fue observada una elevada concordancia.

Dada la alta concordancia entre los resultados de ambos estudios es evidente que el empleo de los medios de cultivo caldo Luria o Middlebrook 7H9 es indiferente en el desempeño de la prueba. No obstante, el medio Middlebrook 7H9 es aproximadamente 3 veces más costoso que el caldo Luria el cual es un medio de cultivo simple y de uso rutinario en los laboratorios de microbiología.

El presente estudio ha confirmado la observación anterior, con una muestra mayor y usando caldo Luria con cloruro de calcio se ha obtenido una alta concordancia entre la prueba evaluada y el método estándar.

Otro aspecto en el cual los investigadores se han diferenciado es lo referente al tiempo de exposición a Rifampicina de las cepas de *M. tuberculosis*. En la publicación de Wilson y col. (48) el tiempo de exposición fue 3 días con la alta concordancia indicada; sin embargo, de acuerdo a los datos de McNerney y col. (30) una exposición de 24 horas sería suficiente. Posteriormente Galí y col. (18) usando el medio Middlebrook 7H9 en una versión simplificada (a una sola concentración crítica de Rifampicina) del método anteriormente descrito por McNerney con una exposición de 24 horas y usando una muestra de 18 cepas resistentes y 71 cepas sensibles encontró una concordancia del 100 % confirmando los hallazgos de McNerney (30). De igual modo, Eltringham y col. usando una modificación del PhaB en el medio Middlebrook 7H9 con una exposición de 24 horas, encontraron en una muestra de 47 cepas susceptibles y 37 resistentes una concordancia del 100% con respecto a la Prueba de Susceptibilidad de la Razón de Resistencia (15).

En el presente estudio se ha confirmado que un tiempo de exposición de 24 horas con Rifampicina es suficiente para obtener una alta concordancia frente al Método de las Proporciones en el medio Lowestein-Jensen (prueba estándar).

Considerando el punto de corte de la prueba rápida del Micobacteriófago D29, los datos obtenidos en el presente trabajo corroboran la observación de otros investigadores (16) confirmando que un porcentaje de inhibición de la infección viral mayor al 90 % concordaría con la máxima sensibilidad y especificidad de la prueba. Sin embargo, el punto de corte no debe considerarse un valor fijo, sino que puede cambiar según la prevalencia de los patrones de resistencia a drogas antituberculosis y las necesidades de captar el máximo número de muestras resistentes.

Un aspecto importante en el patrón de susceptibilidad antibiótica de cepas de *M. tuberculosis* es la asociación entre la resistencia a Rifampicina y resistencia simultánea a Isoniacida (2, 18, 30). En la muestra estudiada en el presente trabajo más del 90 % de las cepas resistentes a Rifampicina también fueron resistentes a Isoniacida coincidiendo con la observación anterior. Dado que Rifampicina e Isoniacida son las drogas más importantes en el tratamiento de la TB se señala que la resistencia a Rifampicina puede ser un importante marcador para indicar que un paciente determinado no se beneficiaría con el tratamiento antituberculoso estándar y requeriría recibir drogas de segunda línea (2, 30). Como muchas cepas resistentes a Rifampicina son cepas MDR, la rapidez (48 horas) de la prueba del Micobacteriófago D29 es una ventaja sustancial para un mejor manejo terapéutico de los pacientes, para la detección de cepas potencialmente MDR y, al acortar el período del diagnóstico en

los pacientes que tienen cepas MDR, para posibilitar medidas que limiten la diseminación de la TB-MDR.

Con respecto a la concordancia entre los resultados obtenidos con el Método del Micobacteriófago D29 y otras pruebas rápidas (en particular MABA y MGIT) no hay hasta la fecha ningún trabajo publicado. Con respecto a Rifampicina, la alta concordancia con MGIT es importante considerando la alta concordancia de este último método frente a las pruebas estándar como el método de las proporciones, BACTEC, *etc.* tanto en estudios individuales como multicéntricos. Así, Walters y Hanna encuentran un alto grado de concordancia entre MGIT y el método de las proporciones (usando disco de papel filtro con antibiótico); reordenando sus datos la sensibilidad fue 96% (24/25) y la especificidad 100% (92/92) (43). Goloubeva y col. encuentran una sensibilidad de 96.4 % (53/55) y una especificidad del 100 % (46/46) usando como estándar el Método de las proporciones en el Medio Lowestein-Jensen (19). Rüsç-Gerdes y col. en un estudio multicéntrico que involucró tres centros de referencia para micobacterias con un total de 441 cepas de *M. tuberculosis* evaluadas usaron como prueba estándar BACTEC 460TB y encontraron una sensibilidad de 95.8 % y una especificidad de 100 %. (37). Con respecto a la alta concordancia entre la prueba del Micobacteriófago D29 y MABA, ella también es importante considerando que MABA es una prueba de alta concordancia con el Método de las proporciones. Así, Yajko y col. usando 50 cepas de *M. tuberculosis* (41 susceptibles y 9 resistentes) encontraron una concordancia porcentual de 98 % entre MABA (punto de corte 0.25 µg/mL) y Método de las Proporciones en el Medio Middlebrook

7H10 (49) . Posteriormente Palomino y Portaels (1999) con una versión simplificada del método descrito por Yajko y col. evaluaron 94 cepas de *M. tuberculosis* (58 susceptibles y 36 resistentes) usando una concentración crítica (1 µg/mL) frente al Método de las Proporciones en el Medio Löwenstein – Jensen encontraron una sensibilidad y especificidad de 100 % (34).

Dada la gran exactitud de las pruebas para la determinación de susceptibilidad a Rifampicina basada en Micobacteriófagos actualmente ha sido puesta en el mercado una prueba comercial de susceptibilidad a Rifampicina; este producto llamado *FASTPlaque*TB-RIFTM es objeto de una continua evaluación en diferentes países. Así, Albert y col. usando el método comercial *FASTPlaque*TB-RIFTM en dos estudios multicéntricos encontraron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97% y 94% con respecto al Método de las Proporciones en 7H11, Bactec y el Método de la Proporciones en Löwenstein-Jensen como pruebas estándar (2).

Con respecto a la prueba de susceptibilidad para Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 los resultados no han sido comparables a los obtenidos para Rifampicina. La menor especificidad obtenida en el presente estudio concuerda con los datos mostrados por Wilson y col. (1997) quienes encuentran una sensibilidad del 92 % (23/25) y una especificidad del 81 % (17/21) (48). Sin embargo, estos resultados han discrepado con los datos indicados por Eltringham y col. (1999) quienes usando el método PhaB determinaron la susceptibilidad a Isoniacida de 51 cepas de *M. tuberculosis* (33 cepas sensibles y 18 resistentes de acuerdo al Método de la Razón de Resistencia) encontrando una sensibilidad del 100 % y una especificidad

del 94 %. (16). La carencia de trabajos publicados no permite establecer el origen de la discrepancia entre los estudios.

Aunque fue también observada una baja concordancia entre la prueba del Micobacteriófago D29, MGIT y MABA en la determinación de la susceptibilidad a Isoniacida, las dos últimas pruebas han mostrado una alta concordancia con el método estándar tal como ha sido observado por otros investigadores. Así, Goloubeva y col. usando MGIT encontraron para Isoniacida una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 92.3 % con respecto al Método de las Proporciones (19). Yajko y col. evaluando la susceptibilidad a Isoniacida encontraron una concordancia del 98 % entre MABA y el Método de las Proporciones (Ellos usaron 50 cepas de *M. tuberculosis*) (49). Palomino y Portaels encontraron una concordancia completa en la susceptibilidad a Isoniacida entre una Prueba simplificada usando Alamar Blue y el Método de las Proporciones en el medio Löwenstein-Jensen, usando 94 cepas de *M. tuberculosis* (34).

En este estudio la prueba del Micobacteriófago D29 ha sido evaluada considerando no sólo su sensibilidad y especificidad sino también estimando su hipotético comportamiento bajo condiciones de campo mediante el valor predictivo (positivo y negativo). A primera vista los valores obtenidos parecerían menores a los encontrados en otros estudios, pero esto se debe a un sesgo habitualmente encontrado en los cálculos del valor predictivo efectuados por otros investigadores. Dado que el valor predictivo de una prueba de diagnóstico varía con la prevalencia de la enfermedad objetivo resulta sorprendente cómo frecuentemente el valor predictivo de las nuevas pruebas de susceptibilidad antibiótica para TB es calculado con base solamente en la

proporción de cepas resistentes y susceptibles presentes en la muestra de estudio. Por ejemplo, de acuerdo a los datos mostrados por Mayta y col. (2003), la prueba PCR-UHG-RIF (basada en la amplificación y detección de mutaciones en el gen *rpoB*) para la detección de *M. tuberculosis* directamente de esputo frente al cultivo en el medio Löwenstein-Jensen (prueba estándar) con una sensibilidad de 83.9 % y una especificidad del 89% tiene un valor predictivo positivo del 85.6 %. El error está en que en sus cálculos no tomaron en cuenta que la prevalencia de resistencia a Rifampicina en su muestra, de acuerdo al cultivo, es 43.8%, valor muy superior a los encontrados en cualquier población peruana (27). De no tomarse en cuenta el efecto de la prevalencia de la resistencia a Rifampicina en la muestra de estudio (46.2 %) en la susceptibilidad a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 el valor predictivo positivo sería 97.6%. Considerando que las cepas evaluadas son del Perú, la prevalencia estimada para pacientes nuevos y previamente tratados es 9 y 16.9% respectivamente; por lo tanto, esta práctica sobre-estima el valor predictivo de una prueba (46). En este estudio el comportamiento de las pruebas ha sido mostrado (valor predictivo) a diferentes probabilidades (pre test), y las curvas pueden ser aplicadas en estudios epidemiológicos y también en el manejo de pacientes en una manera individual. Sin embargo, la aplicación final deberá ser apoyada por estudios que determinen los verdaderos parámetros de exactitud diagnóstica a través de estudios multicéntricos.

La diferencia entre los resultados obtenidos entre Rifampicina e Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 de acuerdo a David y col. estaría relacionado con el sitio de acción de estas drogas (12). Así, drogas como Rifampicina y estreptomina que

bloquean los procesos de transcripción y traducción afectando directamente el ciclo de replicación viral serían los mejores candidatos en el desarrollo de pruebas de susceptibilidad antibiótica basados en el Micobacteriófago D29. La Isoniacida al ser una droga que actúa sobre la síntesis de ácidos micólicos afectando la estructura de la pared celular no interferiría suficientemente con el ciclo de desarrollo del Micobacteriófago (12).

Las futuras líneas de investigación orientadas a explotar el uso de micobacteriófagos para determinar de manera rápida y a bajo costo la resistencia de *M. tuberculosis* a Rifampicina e Isoniacida deberían buscar reducir el número de pasos requeridos para llevar a cabo la prueba mostrada en el presente trabajo. La simplificación de esta técnica requeriría el diseño de nuevas estrategias para medir la actividad lítica del Micobacteriófago tal como cuantificar algún metabolito liberado durante la lisis bacteriana (por ejemplo, ATP o alguna enzima específica) o el uso de algún agente de óxido-reducción que evidencie una disminución en la actividad metabólica de las bacterias afectadas por el antibiótico al cual han sido expuestas. De igual modo considerando los avances en el área de la biología molecular, el conocimiento de los receptores involucrados en la interacción micobacteria-micobacteriofago permitiría el diseño de micobacteriófagos con una mayor capacidad de adsorción y gran de especificidad, en este caso, para *M. tuberculosis*.

7. CONCLUSIONES

1. La prueba de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 por su alta exactitud diagnóstica frente al Método de las Proporciones (sensibilidad 100 % y especificidad 98%) y su concordancia con otras pruebas rápidas de mayor costo ($\kappa = 0.966$ con MGIT y MABA) podría ser una herramienta útil en el manejo terapéutico de pacientes con tuberculosis.
2. Medios de cultivo simples y de bajo costo pueden ser usados en la prueba de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 sin alterar su alta exactitud diagnóstica, lo cual hace a esta prueba atractiva para ser usada en países con escasos recursos.
3. El 93.5 % de las cepas resistentes a Rifampicina son simultáneamente resistentes a Isoniacida; por lo tanto, una rápida determinación de la resistencia a Rifampicina mediante el Micobacteriófago D29 podría detectar rápidamente a pacientes con TB-MDR y limitar la diseminación de los bacilos de Koch mediante una adecuada antibiótico terapia.
4. La prueba de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 no posee una exactitud diagnóstica muy buena frente al Método de las Proporciones y otras pruebas rápidas, limitando su utilidad en el manejo terapéutico de pacientes con tuberculosis.

8. RECOMENDACIONES

1. Analizar el potencial de la prueba de susceptibilidad antibiótica de *M. tuberculosis* usando el Micobacteriófago D29 para otros antibióticos tales como quinolonas (ciprofloxacina y ofloxacina) y aminoglicósidos (estreptomicina y kanamicina).
2. Evaluar otros métodos de detección de la actividad lítica del Micobacteriófago D29 tal como el uso de reactivos de óxido – reducción o métodos de detección de metabolitos tal como ATP a fin de simplificar los pasos requeridos para desarrollar esta prueba.
3. Evaluar la utilidad de esta técnica en estudios multicéntricos a fin de determinar la aceptabilidad entre el personal técnico de diferentes establecimientos de salud y determinar la variabilidad inter-laboratorios.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alarcón E. 2001. Evaluación epidemiológica y operacional del programa nacional de control de la tuberculosis en el Perú, al año 2000. pp. 25 - 39. *En:* Evaluación del programa nacional de control de la tuberculosis en el Perú – año 2000. Ministerio de Salud. Lima - Perú
2. Albert, H., A. Heydenrych, R. Mole, A. Trollip, L. Blumberg. 2001. Evaluation of *FASTPlaque*TB-RIF™ a rapid, manual test for the determination of rifampicin resistance from *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5 (10): 906 – 911.
3. Altman D. 1991. Describing data pp. 19 – 47. *En:* Chapman and Hall (ed.), *Practical statistics for medical research.* London. UK.
4. Altman D. 1991. Some common problems in medical research pp. 396 – 439. *En:* Chapman and Hall (ed.), *Practical statistics for medical research.* London. UK.
5. Armitage, P., and G. Berry. 1997. Métodos estadísticos en epidemiología, pp. 480 – 306. *En:* Harcourt Brace (ed.), *Estadística para la investigación biomédica.* Madrid. España.
6. Barry A, Thornsberry C. 1991. Susceptibility test: diffusion test procedures. pp. 1117 – 1125. *En:* ASM (ed), *Manual of clinical microbiology.* Washington – USA.
7. Bastian, I., L. Rigouts, J.C. Palomino, and F. Portaels. 2001. Kanamycin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using *Mycobacterium* Growth Indicator Tube and colorimetric method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (6): 1934 – 1936.

8. Bergmann, J., and G. Wood. 1997. Reliability of mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. *J. Clin. Microbiol.* 35 (12): 3325 – 3327.
9. BioSource International, Inc. AlamarBlue™. 2000?. Consultado 5 ene. 2004. Disponible en http://www.staff.uni-marburg.de/~parasito/ParaSoSe02/Produkt_INFOS/ alamar_blue.pdf.
10. Choi, B.C. 1998. Slopes of a receiver operating characteristic curve and likelihood ratios for a diagnostic test. *Am.J. Epidemiology.* 148 (11): 1127 – 1132.
11. David H, Clavel S, Clement F. 1980. Adsorption and growth of the bacteriophage D29 in selected mycobacteria. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 131 E: 167 – 184
12. David, H., S. Clavel, F. Clement, and J. Moniz-Pereira. 1980. Effects of antituberculosis and antileprosy drugs on mycobacteriophage D29 growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18 (2): 357 -359.
13. Domínguez E, González R. 2002. Análisis de las curvas receiver-operating characteristic: un método útil para evaluar procedimientos diagnósticos. *Rev. Cubana Endocrinol* 13 (2): 169 – 76.
14. Dooley S, Jarvis W, Snider D. 1996. *Mycobacterium tuberculosis*. pp. 1200 – 1223. *En:* Mayhall C (ed). *Hospital epidemiology and infection control*. U.S.A
15. Eltringham, I.J., F.A. Drobniowski, J. A. Mangan, P.D. Butcher, and S.M. Wilson. 1999 Evaluation of reverse transcription-PCR and a bacteriophage-based assay for rapid phenotypic detection of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 37 (11): 3524 – 3527

16. Eltringham, I.J., S.M. Wilson, and F. Drobniewski. 1999. Evaluation of a bacteriophage-based assay (Phage Amplified Biologically Assay) as rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 37 (11) : 3528 – 3532
17. Freixo I, Caldas P, Martins F, Brito R, Ferreira R, Fonseca L, Saad M. 2002. Evaluation of Etest strips for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (6): 2282 – 2284).
18. Galí N, Domínguez, Blanco S, Prat C, Quesada M, Matas L, Ausina V. 2003. Utility of an in-house mycobacteriophage-based assay for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2647 – 2649.
19. Goloubeva, V., M. Lecocq, P. Lassowsky, F. Matthys, F. Portaels, and I. Bastian. 2001. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for direct and indirect drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from respiratory specimens in a Siberian prison hospital. *J. Clin. Microbiol.* 39(4): 1501 – 1505.
20. Griner, P., R. Mayewski, A. Mushlin, and P. Greenland. 1981. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. *Ann. Int. Med.* 94 (part 2): 559 – 563.
21. Hanley, J.A., and B.J. McNeil. 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology.* 143 (1): 29 – 36.
22. Hatfull G. 1999. Mycobacteriophage pp. 38 - 58. *En: Blackwell Science (ed) Mycobacteria – Molecular Biology and Virulence. London – UK.*

23. Heifets L. 1991. Drug susceptibility test in the management of chemotherapy of tuberculosis. pp. 90 – 115. *En*: CRC (ed.) Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. Florida, USA.
24. Kent P, Kubica G. 1985. Public Health Mycobacteriology – A guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control. Atlanta, Georgia - USA.
25. Mathema B, Kreiswirth B. 2003. Rethinking tuberculosis epidemiology: the utility of molecular methods. *ASM News* 69 (2): 80 – 85
26. Mathur S. 2002. What is new in the diagnosis of tuberculosis? – Part II: Techniques for drug susceptibility testing. *ICMR Bulletin*. ISSN 0377-4910. 32 (9), New Delhi
27. Mayta H, Gilman R, Arenas F, Valencia T, Caviedes L, Montenegro S, Ticona E, Ortiz J, Chumpitaz R, Evans C, Williams D, The Tuberculosis Working Group in Perú. 2003. Evaluation of a PCR-based universal heteroduplex generator assay as a tool for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Perú. *J. Clin. Microbiol.* 41 (12): 5774 - 5777.
28. McNerney R, Wilson S, Sidhu A, Harley V, Al – Suwanidi Z, Nye P, Parish T, Stoker N. 1998. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 149: 487 – 495
29. McNerney R. 1999. TB: The return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3(3): 179 – 184.

30. McNerney, R., P. Kiepiela, K. Bishop, P. M. Nye, and N. G. Stoker. 2000. Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 4 (1) : 69 – 75
31. Ministerio de Salud. 2001. Situación actual de la tuberculosis pp. 11 – 19. *En: El laboratorio de salud pública frente a la emergencia de la tuberculosis resistente. Documento técnico N° 3 Enfermedades emergentes y reemergentes. Lima – Perú.*
32. Mitnick C, Bayona J, Palacios E, Shin S, Furin J, Alcántara F, Sánchez E, Sarria M, Becerra M, Smith M, Kapiga S, Neuberg D, Maguire J, Yong J, Farmer P. Community-Based therapy for multidrug – resistance tuberculosis in Lima, Perú. 2003. *N. Engl. J. Med* 348 (2): 119 – 128).
33. Palaci, M., S. Misuka, D. Nakamura, M. Da Silva, M. Curcio, and E. Matheus. 1996. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34(3): 762 – 764.
34. Palomino JC, Portaels F. 1999. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18 : 380 – 383
35. Ríos M, Suárez C, Muñoz D, Gómez M. 2002. Factores asociados a recaídas por tuberculosis en Lima Este – Perú. *Rev. Perú Med Exp Salud Publica* 19 (1): 35 – 38
36. Riska P, Jacobs W, Bloom B, McKittrick J, Chan J. 1997. Specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* with the luciferase reporter mycobacteriophage:

- use of p-nitro- α -acetilamino- β -hydroxy propiophenone. J. Clin. Microbiol. 35 (12): 3225 – 3231.
37. Rüsç-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondi M, Welscher H, Pfyffer G. 1999. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. Journal of Clinical Microbiology 37 (1): 45 – 48.
38. Shapiro D. 1999. The interpretation of diagnostic tests. Statistical Methods in Medical Research. 8: 113 - 134
39. Sox, H. 1986. Probability theory in the use of diagnostic tests. Ann. Intern. Med. 104: 60 – 66.
40. Suárez P. 2001. EL control de la tuberculosis en el Perú y sus logros en el periodo 1990 – 2000. pp. 17 - 24. En: Tuberculosis en el Perú - Informe 2000. Ministerio de Salud. Lima - Perú.
41. Swets, J. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. Science. 240: 1285 – 1293.
42. Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti M. 2002. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Four Major Antituberculous Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method and the Agar Plate Method of Proportion. J. Clin. Microbiol. 40 (2): 607 - 610.

43. Walters, S., and B. Hanna. 1996. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isonizid and rifampin by Mycobacterium Growth Indicator Tube method. . J. Clin. Microbiol.34(6): 1565 – 1567.
44. Watterson S, Drobniewski. 2000. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. J. Clin. Pathol. 53: 727 – 732
45. Watterson S, Wilson S, Yates W, Drobniewski F. 1998. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology.36: 1969 – 1973
46. WHO / IUATLD. 1998. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Int. J. Tuberc Lung Dis. 2 (1): 72 – 89
47. WHO. Global Tuberculosis Programme. Anti-tuberculosis drug resistance in the world – The WHO / IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1994 – 1997. pp. 153. Annex 2 – Individual Country Profiles.
48. Wilson S, Al-Suwaidi Z, McNERNEY R, Porter J, Drobniewski. 1997. Evaluation of a new rapid bacteriophage – based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature Medicine 34: 465 – 468.
49. Yajko, D., J. Madej, M. Lancaster, C. Sanders, V. Cawthon, B. Gee, A. Babst, and W. Hadley. 1995. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 33 (9): 2324 - 2327.

10. ANEXOS

TABLA 1. Patrón de susceptibilidad a Rifampicina (RIF) e Isoniacida (INH) en 93 cepas peruanas de *M. tuberculosis*.

Patrón de Susceptibilidad	Frecuencia	
	n	%
INH ^R / RIF ^R	43	46.2
INH ^R / RIF ^S	3	3.2
INH ^S / RIF ^R	0	0.0
INH ^S / RIF ^S	47	50.5
Total	93	100.0

**El superíndice R indica resistencia y S indica susceptibilidad. La evaluación fue hecha usando el Método de la Proporciones en Medio Löwenstein-Jensen.





	Rifampicina	Isoniacida	Control Sin Droga	Control Viricida
				
1. Antibiótico (µL) :				
Rifampicina (4 µg / mL)	250	0	0	0
Isoniacida (2 µg / mL)	0	250	0	0
2. LB - S (µL)	0	0	250	500
3. Muestra (µL)	250	250	250	0
4. Incubación 37° C	24 horas - Rifampicina y 48 horas - Isoniacida			
5. Micobacteriofago D29 (1 x 10⁸ UFP/mL)	170 µL			
6. Incubación 37° C	1,5 horas			
5. FAS 1%	340 µL (5 minutos)			
6. Dilución	1:4			
7. Inoculación de placas Indicadoras	Muestras del paso 6 mezcladas en 4 mL de agar (0.9 %) a 50 °C con 400 µL de un cultivo en fase estacionaria de <i>M. smegmatis</i> y vertido en placas de agar LB - S			

Figura 1. Procesamiento de la muestra en la prueba de susceptibilidad a Rifampicina e Isoniacida usando el Micobacteriófago D29. Todas las diluciones y reactivos fueron preparados usando Caldo Luria-1mM CaCl₂ (LB-S). El agar LB - S fue preparado adicionando 1.5 % de agar.

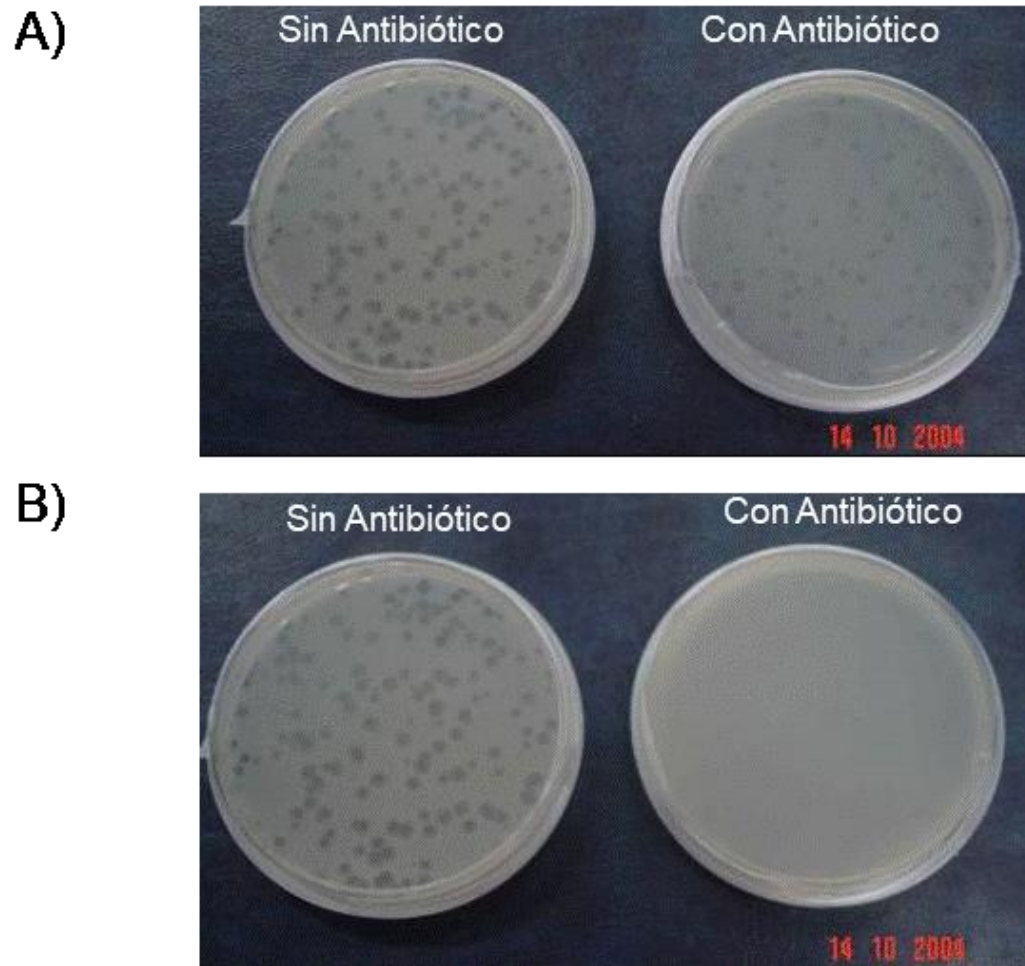


Figura 2. Detección del patrón de susceptibilidad antibiótica en cepas de *M. tuberculosis* resistentes y sensibles a Rifampicina e Isoniacida mediante el Micobacteriófago D29. A) patrón de una cepa resistente. B) patrón de una cepa sensible.

Susceptibilidad a Rifampicina según MP:

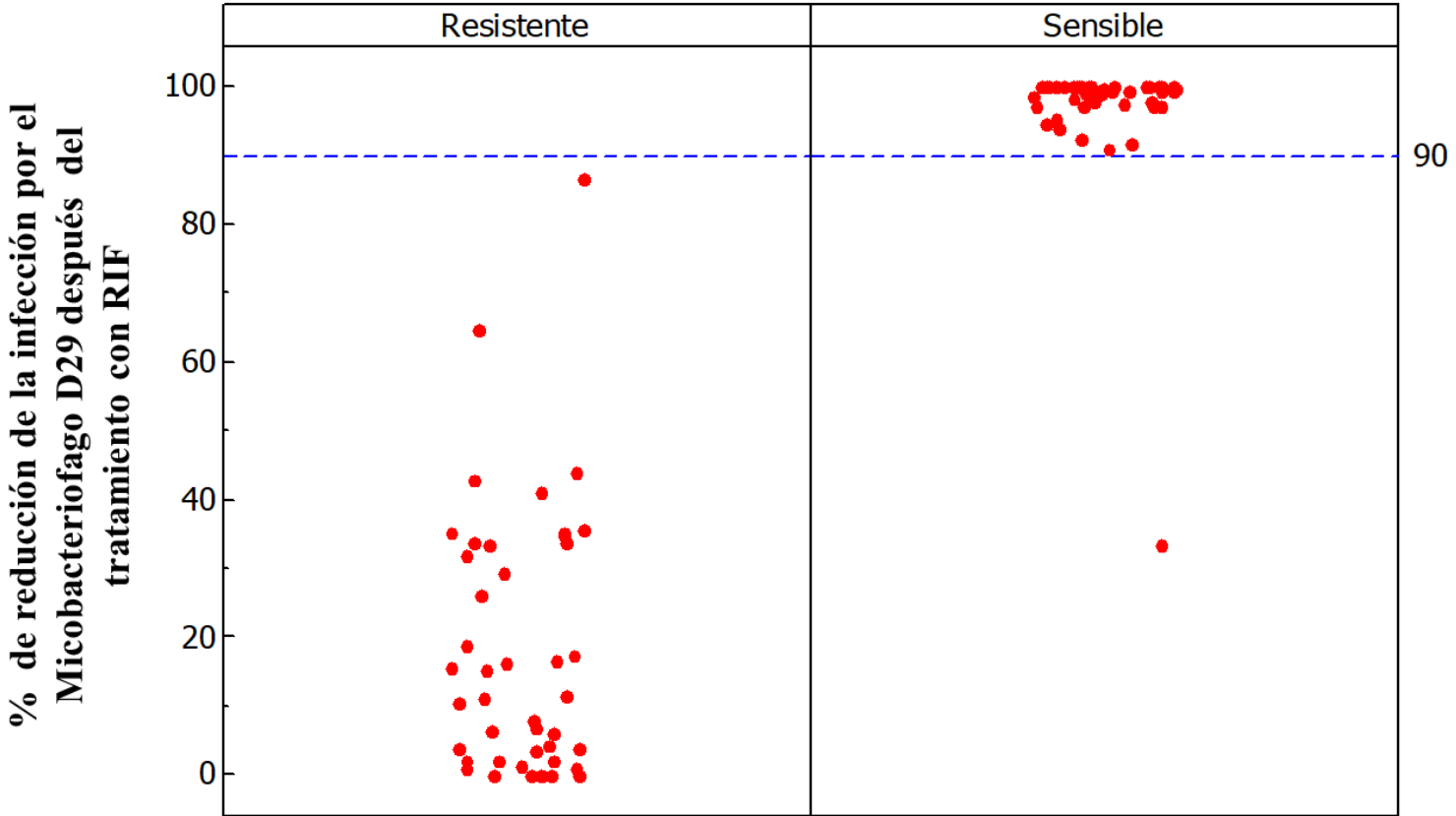


Figura 3. Distribución de las cepas de *M. tuberculosis* evaluadas ($n = 93$) según el patrón de susceptibilidad a Rifampicina (RIF) mediante el Método de las Proporciones (MP) y los porcentajes de reducción de la infección por Micobacteriófago D29 después de tratarlas con 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de RIF. La línea azul indica el punto de corte sugerido por otros investigadores (16).

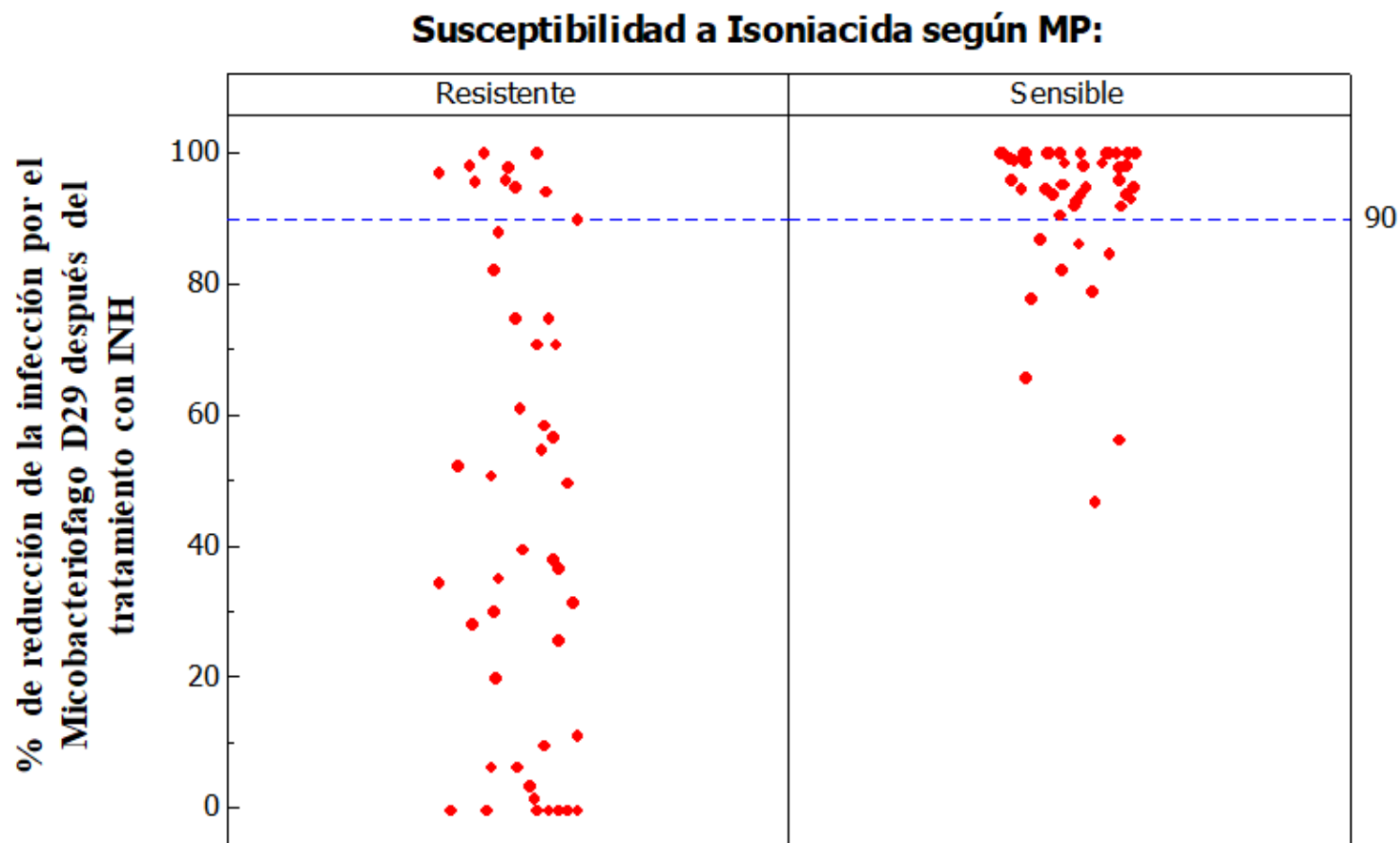


Figura 4. Distribución de las cepas de *M. tuberculosis* evaluadas (n = 93) según el patrón de susceptibilidad a Isoniacida (INH) mediante el Método de las Proporciones (MP) y los porcentajes de reducción de la infección por Micobacteriofago D29 después de tratarlas con 1 μg / mL de INH. La línea azul indica el punto de corte sugerido por otros investigadores (16).

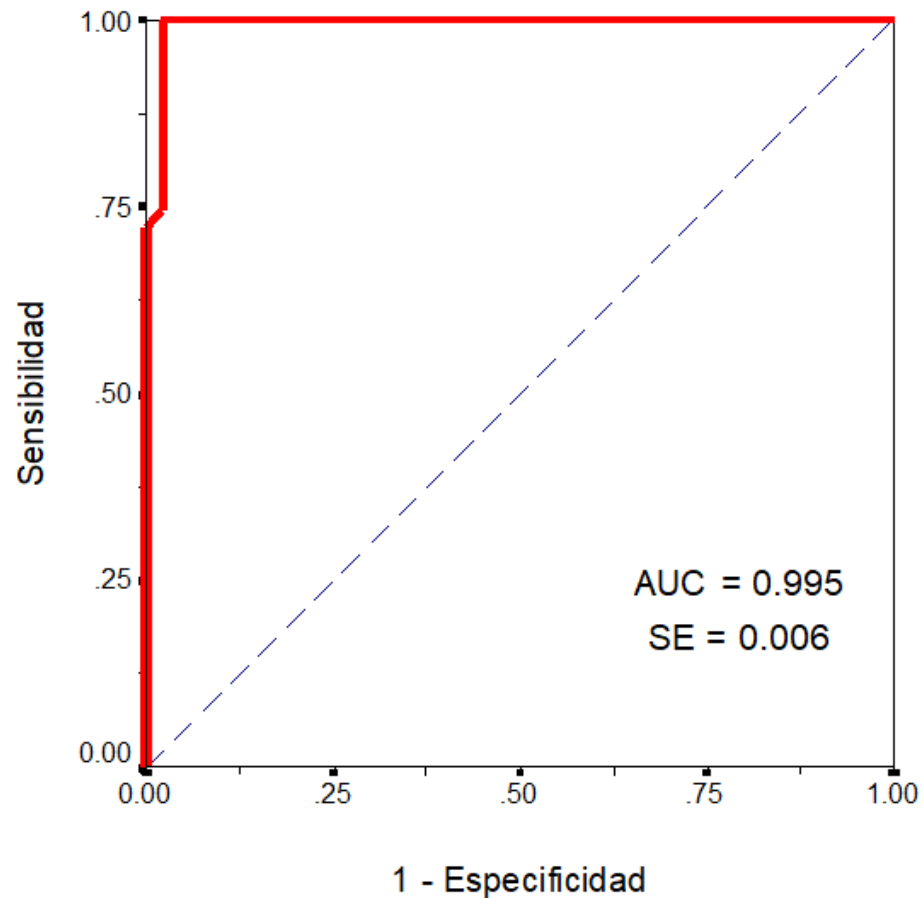


Figura 5. Curva ROC empírica (—) para la susceptibilidad de *M. tuberculosis* (n = 93) a Rifampicina usando la prueba del Micobacteriófago D29. La línea diagonal (--) representa una prueba teórica que no posee capacidad discriminante entre cepas resistentes y susceptibles. AUC = Área bajo la curva y SE = error estándar.

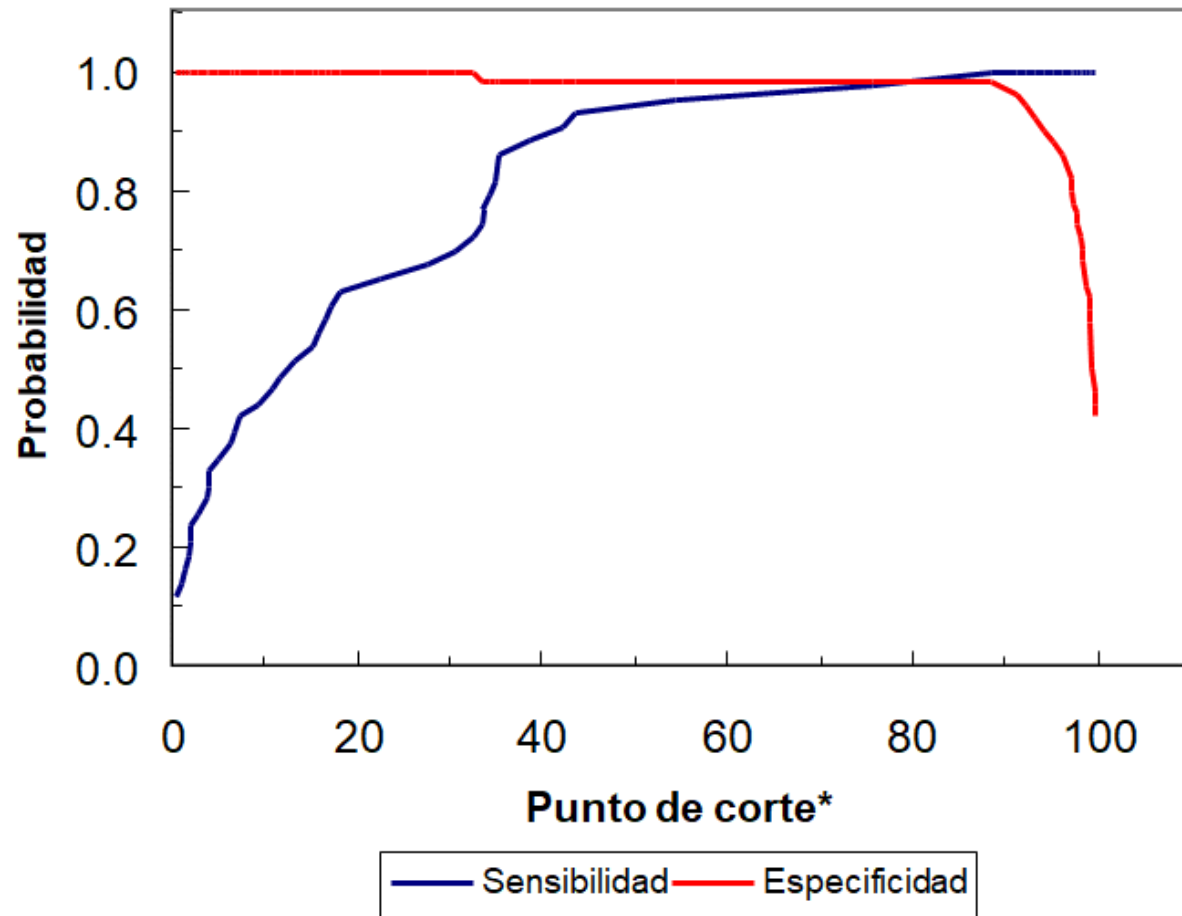


Figura 6. Variación de la sensibilidad y especificidad de la prueba del Micobacteriófago D29 (MD29) según el punto de corte elegido en la determinación de la susceptibilidad de cepas de *M. tuberculosis* a Rifampicina. *Porcentajes de reducción de la infección de *M. tuberculosis* por el Micobacteriófago D29 después del tratamiento con 2 μg / mL de RIF.

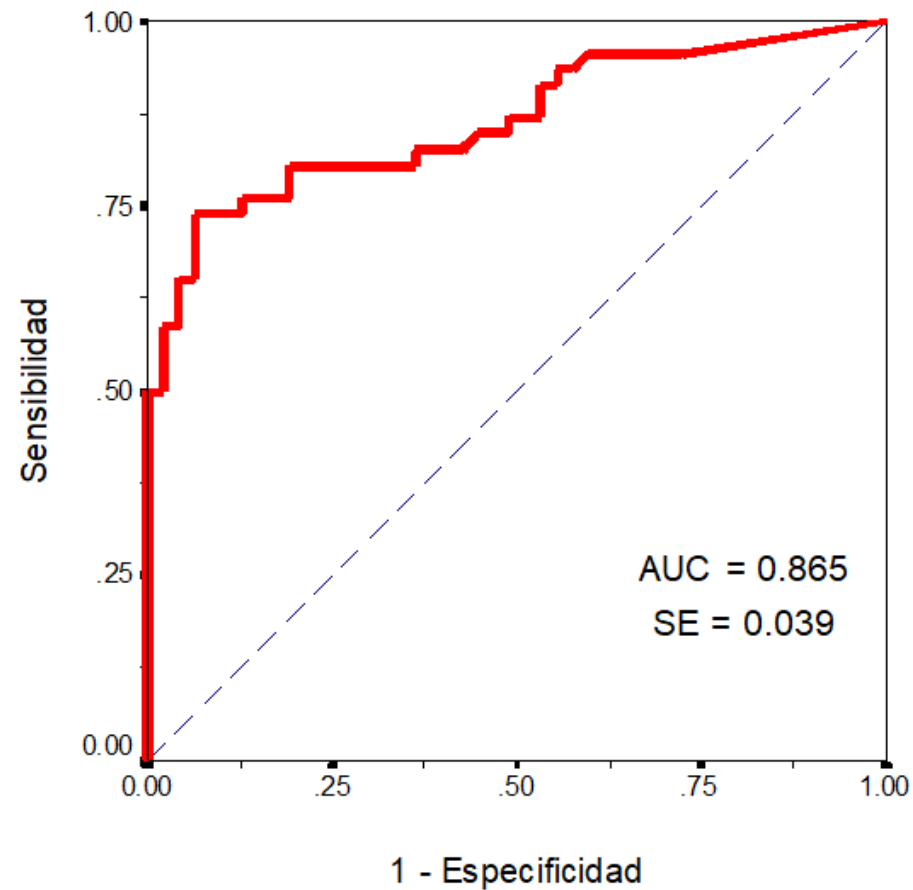


Figura 7. Curva ROC empírica (—) para la susceptibilidad de *M. tuberculosis* (n = 93) a Isoniacida usando la prueba del Micobacteriófago D29. La línea diagonal (--) representa una prueba teórica que no posee capacidad discriminante entre cepas resistentes y susceptibles. AUC = Área bajo la curva y SE = error estándar.

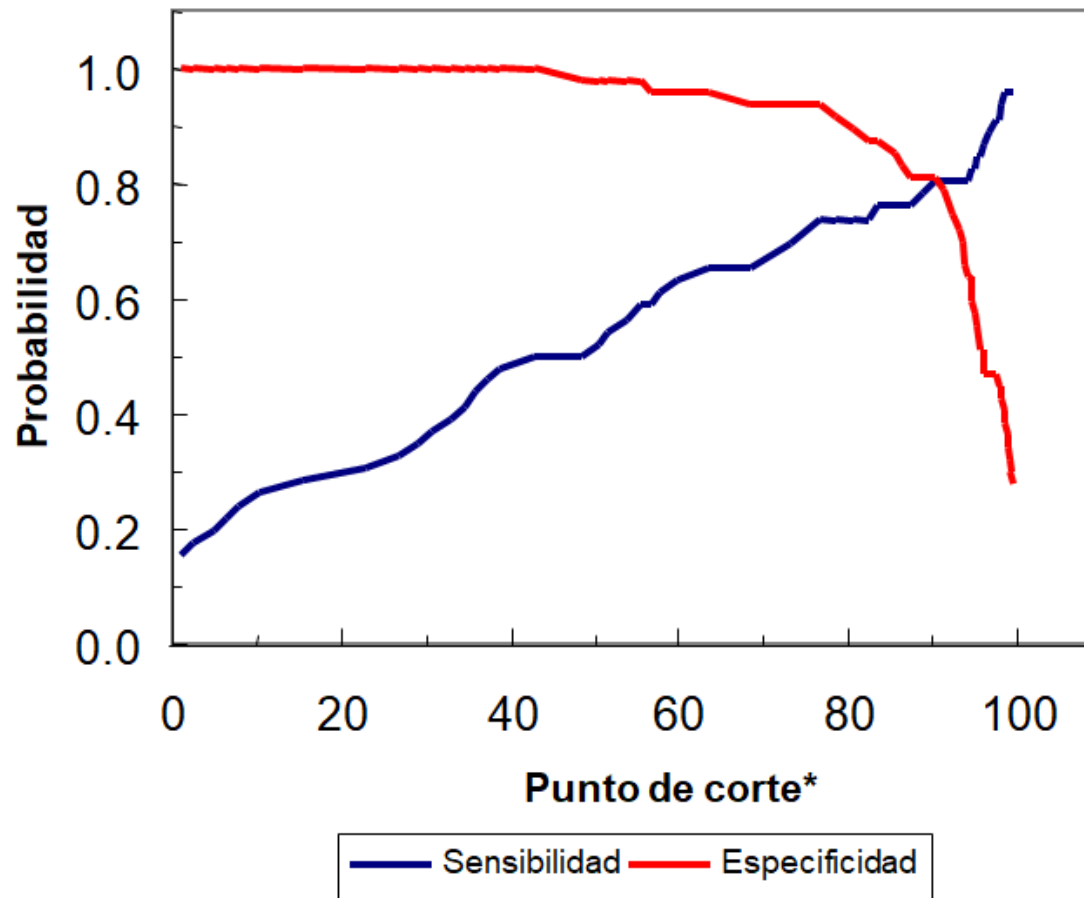


Figura 8. Variación de la sensibilidad y especificidad de la prueba del Micobacteriófago D29 (MD29) según el punto de corte elegido en la determinación de la susceptibilidad de cepas de *M. tuberculosis* a Isoniacida. * Porcentajes de reducción de la infección de *M. tuberculosis* por el Micobacteriófago D29 después del tratamiento con 1 μg / mL de INH.

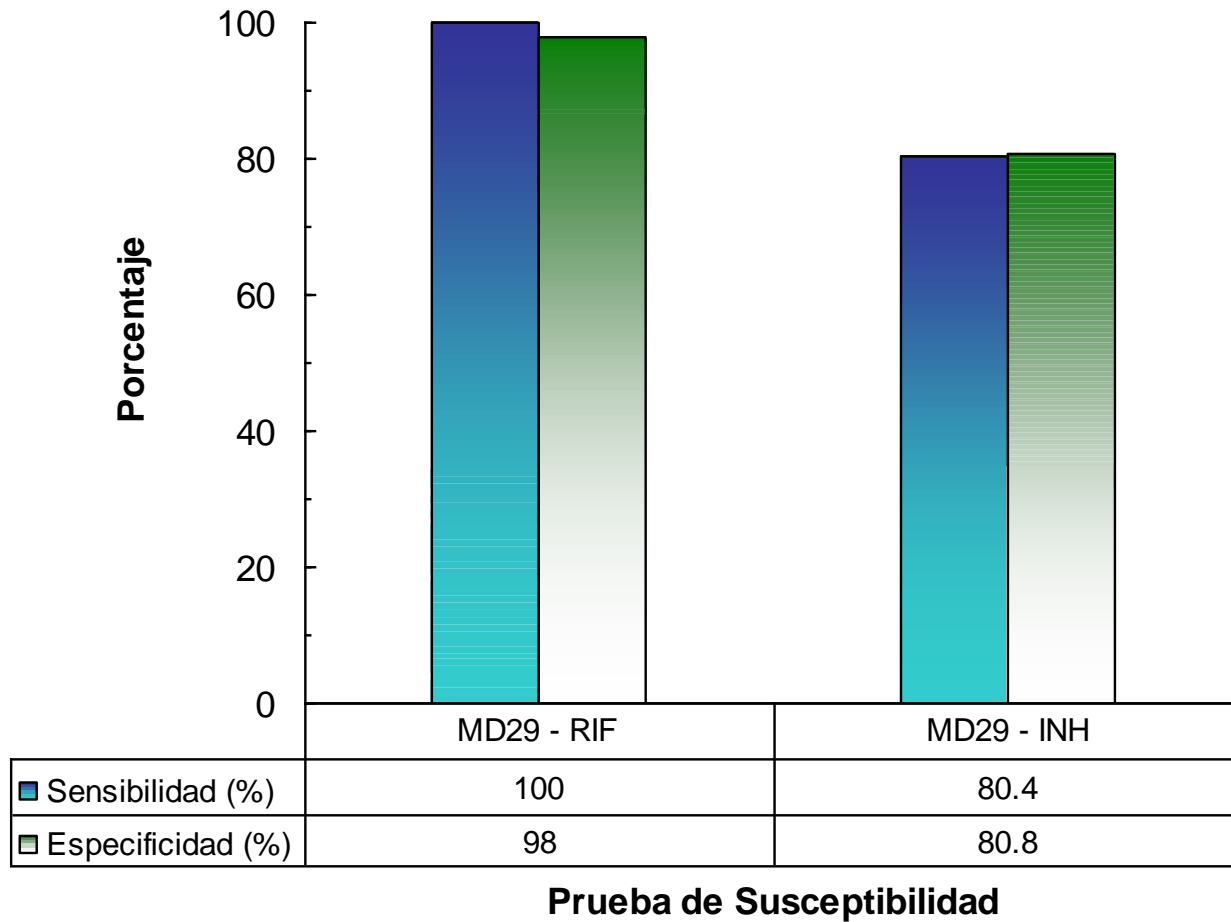


Figura 9. Sensibilidad y especificidad de la prueba del Micobacteriófago D29 (MD29) en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina e Isoniacida.

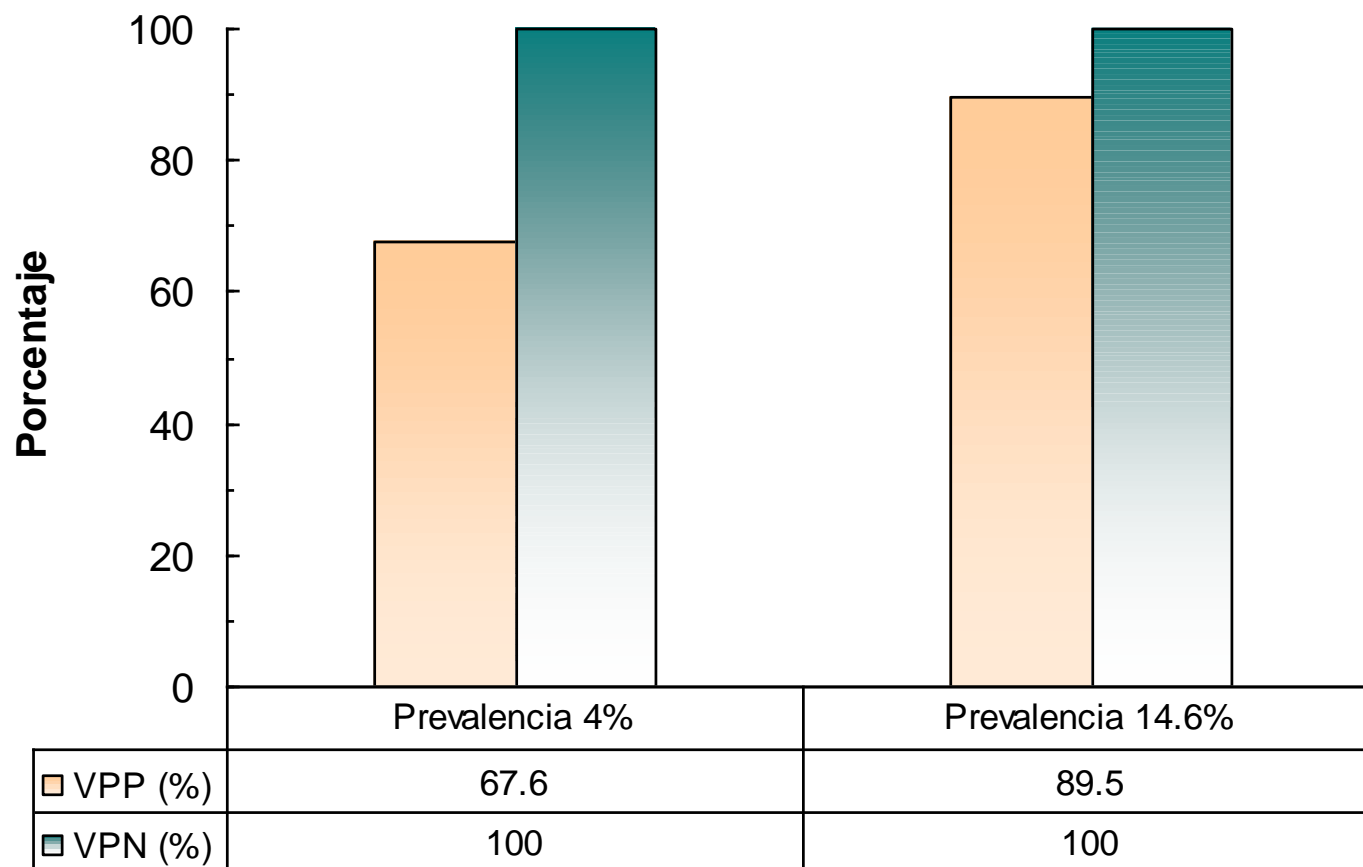


Figura 10. Valor Predictivo Positivo (VPP) y Negativo (VPN) de la prueba de susceptibilidad a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29. La prevalencia de 4 y 14.6 % corresponden a los niveles de resistencia a Rifampicina en el Perú entre pacientes con tuberculosis nuevos y previamente tratados respectivamente (47).

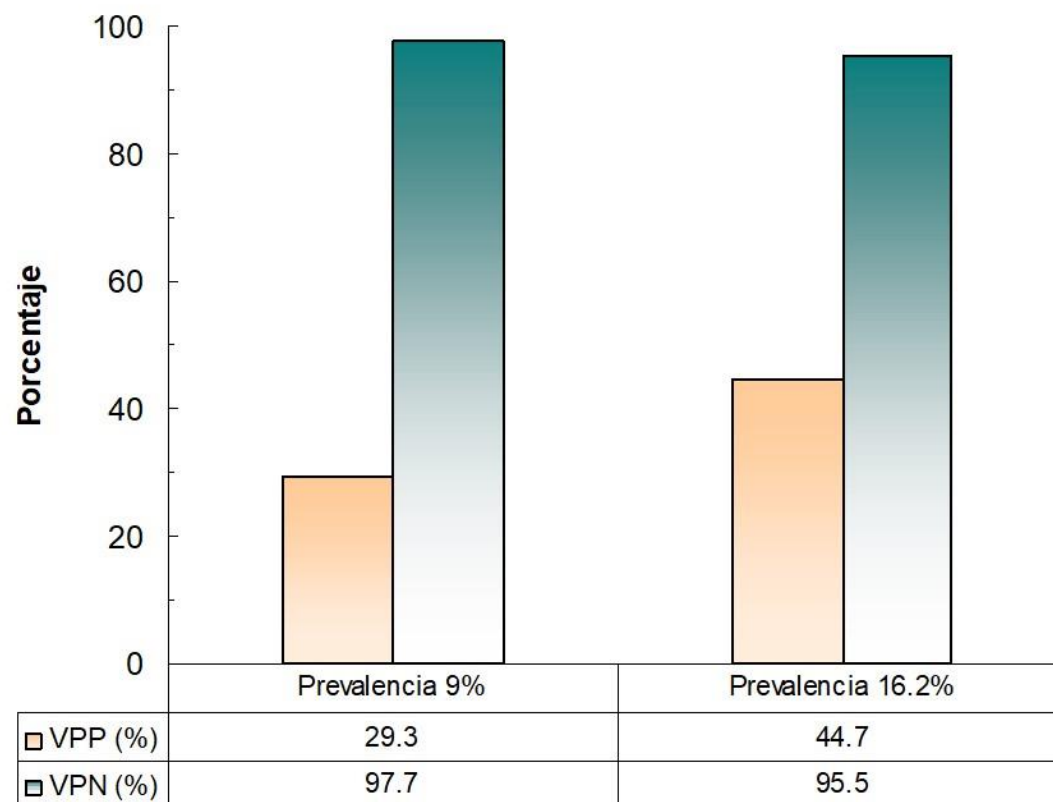


Figura 11. Valor Predictivo Positivo (VPP) y Negativo (VPN) de la prueba de susceptibilidad a Isoniacida usando el Micobacteriófago D29. La prevalencia de 9 y 16.2 % corresponden a los niveles de resistencia a Isoniacida en el Perú entre pacientes con tuberculosis nuevos y previamente tratados respectivamente (47).

TABLA 2. Concordancia de la prueba de susceptibilidad de 93 cepas de *M. tuberculosis* a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 y el patrón de susceptibilidad Multidrogorresistente (MDR).

MDR	Micobacteriófago D29 - RIF		Total
	Susceptible	Resistente	
Si	0 (0.0)	43 (46.2)	43 (46.2)
No	49 (52.7)	1 (1.1)	50 (53.8)
Total	49 (52.7)	44 (47.3)	93 (100)

$\kappa = 0.978$, se (κ) = 0.021, IC 95%: 0.937, 1.000

* Los datos sin paréntesis indican la frecuencia absoluta observada. Los datos entre paréntesis indican los porcentajes con respecto al total de muestras. κ , corresponde al estadístico Kappa; se, es el error estándar e IC 95%, el intervalo de confianza al 95%.

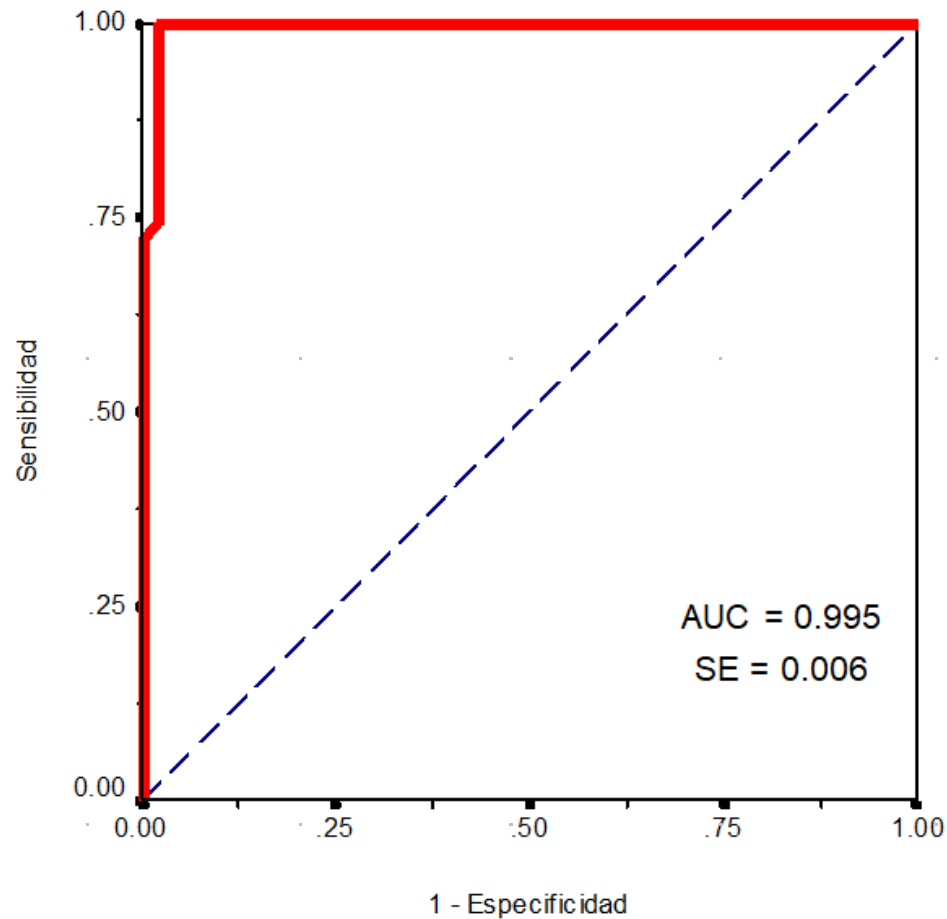


Figura 12. Curva ROC empírica (—) de la prueba del Micobacteriófago D29 para Rifampicina en la detección de cepas MDR de *M. tuberculosis*. La línea diagonal (--) representa una prueba teórica sin capacidad discriminante entre cepas MDR y cepas no MDR. AUC = Área bajo la curva, SE = error estándar.

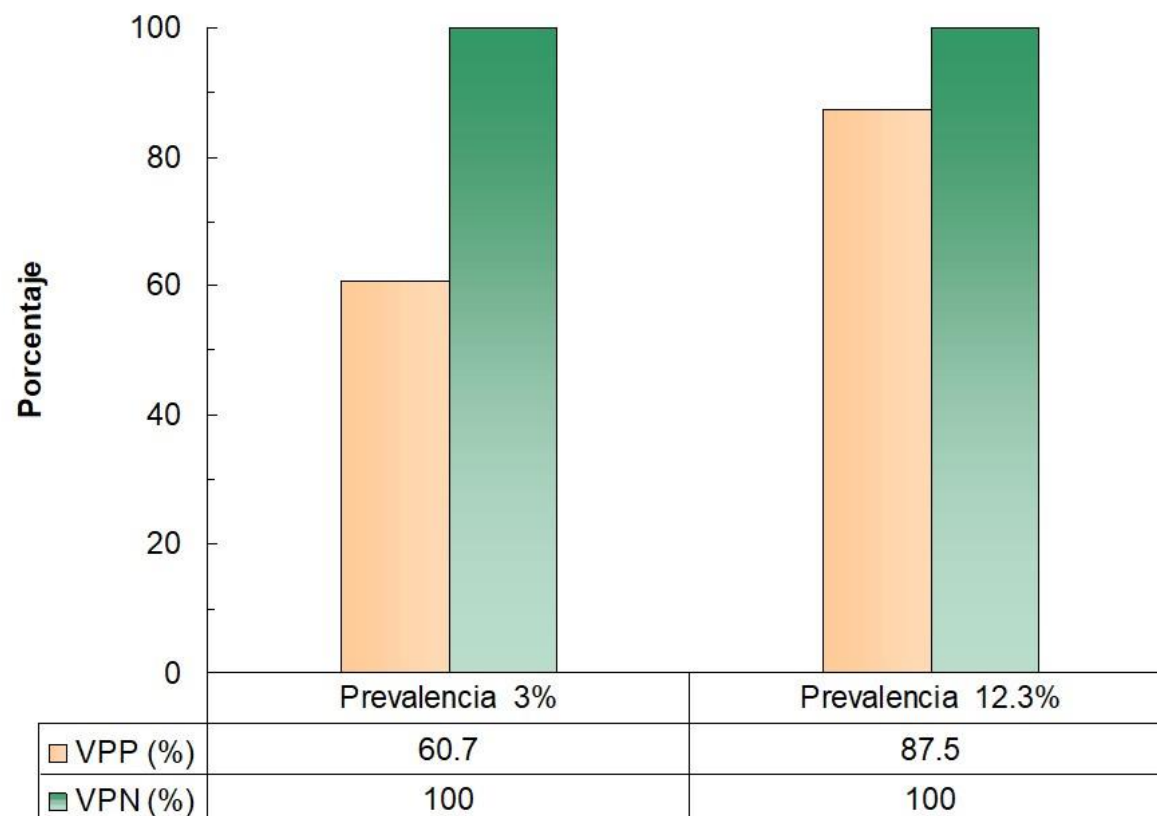


Figura 13. Valor Predictivo Positivo (VPP) y Negativo (VPN) de la prueba de susceptibilidad a Rifampicina usando el Micobacteriófago D29 como predictor del fenotipo MDR en cepas de *M. tuberculosis*. La prevalencia de 3 y 12.3 % corresponden a los niveles de prevalencia de TB por cepas MDR en el Perú entre pacientes con TB nuevos y previamente tratados respectivamente.

TABLA 3. Concordancia de las pruebas de susceptibilidad a Rifampicina MGIT y Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina

MGIT	Micobacteriófago D29 - RIF		Total	
	Susceptible	Resistente		
Susceptible	27 (45.0)	1 (1.7)	28 (46.7)	
Resistente	0 (0.0)	32 (53.3)	32 (53.3)	
Total	27 (45.0)	33 (55.0)	60 (100)	

$\kappa = 0.966$, $se(\kappa) = 0.033$, IC 95%: 0.901, 1.000

* Los datos sin paréntesis indican la frecuencia absoluta observada. Los datos entre paréntesis indican los porcentajes con respecto al total de muestras. κ , corresponde al estadístico Kappa; se , es el error estándar e IC 95%, el intervalo de confianza al 95%.

TABLA 4. Concordancia de las pruebas de susceptibilidad a Rifampicina mediante MABA y Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina

MABA	Micobacteriófago D29 - RIF		Total
	Susceptible	Resistente	
Susceptible	27 (45.0)	1 (1.7)	28 (46.7)
Resistente	0 (0.0)	32 (53.3)	32 (53.3)
Total	27 (45.0)	33 (55.0)	60 (100)

$\kappa = 0.966$, $se(\kappa) = 0.033$, IC 95%: 0.901, 1.000

* Los datos sin paréntesis indican la frecuencia absoluta observada. Los datos entre paréntesis indican los porcentajes con respecto al total de muestras. κ , corresponde al estadístico Kappa; se , es el error estándar e IC 95%, el intervalo de confianza al 95%.

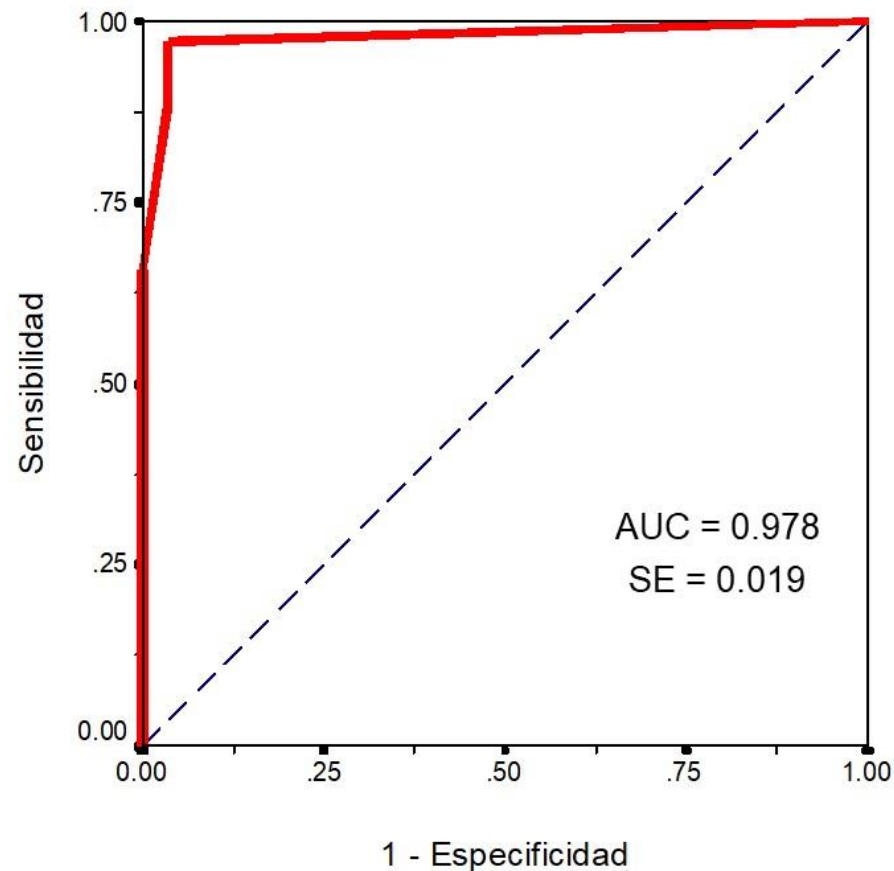


Figura 14. Curva ROC empírica (—) para la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Rifampicina usando la prueba MABA. La línea diagonal (--) representa una prueba teórica que no posee capacidad discriminante entre cepas resistentes y susceptibles. AUC = Área bajo la curva y SE = error estándar.

TABLA 5. Concordancia de las pruebas de susceptibilidad mediante MABA y Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Isoniacida

MABA	Micobacteriófago D29 - INH		Total
	Susceptible	Resistente	
Susceptible	24 (40.0)	6 (10.0)	30 (50.0)
Resistente	6 (10.0)	24 (40.0)	30 (50.0)
Total	30 (50.0)	30 (50.0)	60 (100)

$\kappa = 0.600$, $se(\kappa) = 0.103$, IC 95%: 0.398, 0.802

* Los datos sin paréntesis indican la frecuencia absoluta observada. Los datos entre paréntesis indican los porcentajes con respecto al total de muestras. κ , corresponde al estadístico Kappa; se, es el error estándar e IC 95%, el intervalo de confianza al 95%.

TABLA 6. Concordancia de las pruebas de susceptibilidad a Isoniacida MGIT y Micobacteriófago D29 en la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Isoniacida

MGIT	Micobacteriófago D29 - INH		Total
	Susceptible	Resistente	
Susceptible	22 (36.7)	4 (6.7)	26 (43.3)
Resistente	8 (13.3)	26 (43.3)	34 (56.7)
Total	30 (50.0)	30 (50.0)	60 (100)

$\kappa = 0.600$, $se(\kappa) = 0.102$, IC 95%: 0.400, 0.800

* Los datos sin paréntesis indican la frecuencia absoluta observada. Los datos entre paréntesis indican los porcentajes con respecto al total de muestras. κ , corresponde al estadístico Kappa; se , es el error estándar e IC 95%, el intervalo de confianza al 95%.

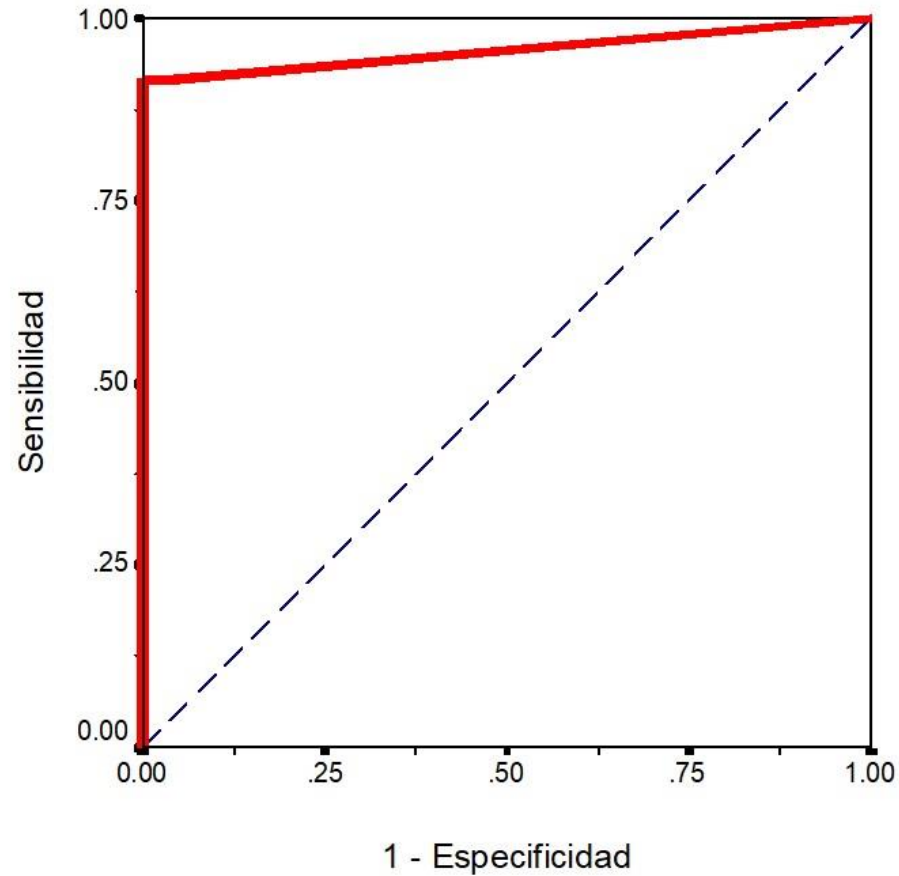


Figura 15. Curva ROC empírica (—) para la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a Isoniacida usando la prueba MABA. La línea diagonal (--) representa una prueba teórica que no posee capacidad discriminante entre cepas resistentes y susceptibles. AUC = Área bajo la curva y SE = error estándar.

TABLA 7. Concordancia entre los resultados de las pruebas de susceptibilidad a Isoniacida usando el Micobacteriófago D29 y el patrón de susceptibilidad multidrogorresistentes (MDR) en cepas de *M. tuberculosis*.

MDR	Micobacteriófago D29 - INH		Total
	Susceptible	Resistente	
Si	9 (9.7)	34 (36.6)	43 (46.2)
No	38 (40.9)	12 (12.9)	50 (53.8)
Total	47 (50.5)	46 (47.3)	93 (100)

$\kappa = 0.548$, se (κ) = 0.087 , IC 95%: 0.377, 0.719

* Los datos sin paréntesis indican la frecuencia absoluta observada. Los datos entre paréntesis indican los porcentajes con respecto al total de muestras. κ , corresponde al estadístico Kappa; se, es el error estándar e IC 95%, el intervalo de confianza al 95%.