



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A MOXIFLOXACINO EN
CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* AISLADAS DE PACIENTES**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Autor:

Vigo Tayro, Aiko Naomi

Asesor Interno:

Blga. Sáez Flores, Gloria

Asesor Externo:

PhD. Puyén Guerra, Zully Margoth

Jurados:

Mg. Santa Cruz Carpio, Carlos

Mg. Yupanqui Siccha, Gisella

Mg. Maldonado Peña, María

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, en especial a mi madre por su apoyo incondicional y constante, por su esfuerzo para lograr hacer de mí una mejor persona día a día, por su confianza en mis habilidades y a todos aquellos que contribuyeron de alguna manera al desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su apoyo incondicional en la decisión de estudiar Biología, a mi madre por siempre confiar en mí y haber estado en los momentos más importantes y difíciles de la carrera, a mi alma mater, a mis profesores y asesores, en especial a mi mentora la PhD. Zully Puyén por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas, por guiarme en el camino y permitirme ser parte de un gran equipo de investigación.

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. Introducción.....	10
1.1 Descripción y Formulación del Problema.....	15
1.2 Antecedentes	16
1.2.1 Investigaciones que emplearon la metodología APP para la determinación de la MIC de Moxifloxacino	16
1.2.2 Investigaciones que emplearon otras metodologías para la determinación de la MIC de Moxifloxacino	22
1.3 Objetivos	26
- Objetivo General.....	26
- Objetivos Específicos	26
1.4 Justificación.....	26
1.5 Hipótesis.....	28
H1:.....	28
H0:.....	28
II. Marco Teórico	29
2.1 Bases teóricas sobre el tema de Investigación	29
2.1.1 Micobacterias.....	29
2.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB).....	30

2.1.3 Tuberculosis.....	31
2.1.4 Resistencia a antibióticos.....	35
2.1.5 Fluoroquinolonas.....	37
2.1.6 Métodos de detección de resistencia a drogas anti-TB en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
2.2 Definición de Términos.....	41
2.2.1 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	41
2.2.2 Concentración Crítica (CC).....	41
2.2.3 Potencia.....	42
2.2.4 7H9.....	42
2.2.5 7H10.....	42
2.2.6 ADC.....	43
2.2.7 OADC.....	43
2.2.8 CSB.....	43
2.2.9 ECOFF.....	43
III. Método.....	45
3.1 Tipo de Investigación.....	45
3.2 Ámbito temporal y espacial.....	45
3.3 Variable.....	45
3.3.1 Variable Independiente:.....	45

3.3.2 Variables Dependientes:.....	45
3.4 Población y muestra	46
3.5 Instrumentos.....	46
3.5.1 Preparación de los Materiales	48
3.6 Procedimientos.....	50
3.6.1 Reactivación de las cepas criopreservadas.....	50
3.6.2 Sembrado de Löwenstein Jensen (L-J).....	51
3.6.3 Siembra en caldo Middlebrook 7H9.	51
3.6.4 Siembra en placas Middlebrook 7H10.	51
3.6.5 Lectura de las placas.	53
3.6.6 Cálculos.....	53
3.6.7 Informe de Resultados.....	54
3.6.8 Interpretación de Resultados.	54
3.7 Análisis de datos	54
IV. Resultados.....	55
4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	55
4.2 Comparación de la Actividad Antimicrobiana de Moxifloxacino	58
4.2.1 Comparación de la actividad antimicrobiana in vitro de Moxifloxacino (0.5 µg/mL) en cepas con perfil de resistencia TB sensible.....	58

4.2.2 Comparación de la actividad antimicrobiana in vitro de Moxifloxacino (0.5 µg/mL) en cepas con perfil de resistencia TB-MDR (LEV 1.0 µg/mL).....	59
4.2.3 Comparación de la actividad antimicrobiana in vitro de Moxifloxacino (0.5 µg/mL) en cepas con perfil de resistencia TB-MDR (LEV 1.0 µg/mL).....	60
4.3 Evaluación de los Parámetros de Sensibilidad, Especialidad, Precisión y Reproducibilidad.....	60
V. Discusión de Resultados.....	62
VI. Conclusiones.....	69
VII. Recomendaciones	70
VIII. Referencias	71
IX. Anexos	83
9.1 Anexo 1	83
9.2 Anexo 2	83
9.3 Anexo 3	84
9.4 Anexo 4	86
9.5 Anexo 5	86
9.6 Anexo 6	87
9.7 Anexo 7	88

RESUMEN

Objetivos: Validar y determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la droga Moxifloxacino en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) del Instituto Nacional de Salud (INS). **Métodos:** La MIC de Moxifloxacino se determinó mediante el método de proporción agar en placas (APP). Se analizaron 120 cepas con perfiles de resistencia previamente identificados y dos controles MTB H37Rv (ATCC 27294) y *M. avium*. Las cepas fueron sometidas a diferentes concentraciones de la droga Moxifloxacino (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 µg/mL). **Resultados:** de las 120 cepas, la MIC de todas las cepas susceptibles que incluyen probables cepas sensibles y cepas sensibles a levofloxacino (LEV) fue de 0.25 µg/mL (53/53, 100%). Por otro lado, la MIC de todas las cepas resistentes que incluyen probables cepas resistentes y cepas resistentes a la LEV fue ≥ 2 µg / mL para el 77% de las cepas (52/67) mientras que el 23% de las cepas (15/67) tenía una MIC de 1.0 µg / ml. Los resultados también apoyan la recomendación de la OMS para el ensayo de moxifloxacino en una concentración crítica de 0.5µg / mL. **Conclusiones:** La prueba de susceptibilidad a moxifloxacino utilizando el método de proporciones agar en placa en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes fue validada en la concentración de 0.5 µg/mL.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, MIC, APP, Moxifloxacino.

ABSTRACT

Objectives: To validate and determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the drug Moxifloxacin in strains of Mycobacterium tuberculosis (MTB) in the National Reference Laboratory of Mycobacteria of the National Institute of Health (INS). **Methods:** The MIC of Moxifloxacin was determined by the method of plate agar ratio (APP). We analyzed 120 strains with previously identified resistance profiles and two MTB controls H37Rv (ATCC 27294) and M. avium. The strains were subjected to different concentrations of the drug Moxifloxacin (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 µg / mL). **Results:** of the 120 isolates, the MIC of all the susceptible strains that include probable susceptible strains and strains sensitive to levofloxacin (LEV) was 0.25 µg / mL (53/53, 100%). On the other hand, the MIC of all the resistant strains that include probable resistant strains and strains resistant to LEV was ≥ 2 µg / mL for 77% of the strains (52/67) while 23% of the strains (15 / 67) had a MIC of 1.0 µg / mL. The results also support the WHO recommendation for the moxifloxacin assay at a critical concentration of 0.5µg / mL.

Conclusions: The moxifloxacin susceptibility test using the plaque agar ratio method in strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from patients was validated at the 0.5 µg / mL concentration.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, MIC, APP, Moxifloxacin.

I. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que viene afectando al humano durante miles de años y en la actualidad sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública mundial; reportándose anualmente diez millones de personas infectadas con esta enfermedad y siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo (World Health Organization, 2017).

La bacteria causante de esta enfermedad suele alojarse en los pulmones por lo cual es denominada TB pulmonar sin embargo cuando se aloja en otros órganos del cuerpo humano se le llama TB extrapulmonar (Kumar, Abbas, Fausto & Mitchell, 2007), así mismo la vía de transmisión se realiza cuando las personas afectadas con TB pulmonar expulsan los bacilos en el ambiente por ejemplo mediante la tos, estornudo y al hablar (Ministerio de Salud, 2017).

La TB es un problema de salud pública que afecta a la población en general y en los casos de personas infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) la probabilidad de desarrollar la enfermedad es mayor, caso similar sucede con las personas que presentan los factores de riesgo como: diabetes, desnutrición, alcoholismo y tabaquismo (World Health Organization, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que la TB representa la novena causa mundial de muerte; pero la primera por enfermedades infecciosas, por encima del VIH /SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida). Así mismo, para el año 2016 reportó que la cifra estimada de incidencia de TB fue de 10,4 millones, sin embargo, se notificó para este mismo año 6.3 millones de nuevos casos de TB, lo que equivale al 61% de la incidencia estimada. Adicionalmente, los datos más recientes sobre los resultados del tratamiento muestran una tasa mundial de éxitos terapéuticos del 83%, similar a la de los últimos años (World Health

Organization, 2017). Por su parte, el Perú es considerado uno de los países con alta carga de TB en las Américas, notificando para el año 2016, 31 079 casos de TB con una incidencia de 117 casos por 100 000 habitantes.

En la actualidad la TB constituye una enfermedad reemergente como consecuencia de la aparición de cepas con resistencia a múltiples drogas tradicionalmente empleadas en el tratamiento antituberculosis (anti-TB). En este sentido la OMS reportó que se inició un tratamiento contra la TB resistente en 129 689 casos, lo que representa un pequeño aumento con respecto a los 125 629 casos de 2015, pero solo un 22% de la incidencia estimada y que el éxito del tratamiento sigue siendo bajo: 54% a nivel mundial (World Health Organization, 2017). Este gran problema no ha dejado de lado al Perú ya que se encuentra ocupando el segundo lugar en la región de las Américas con el mayor número estimado de casos de TB-MDR (TB-multidrogorresistente) así mismo reporta el 33% de todos los casos de TB-MDR que anualmente se estiman en América (World Health Organization, 2017).

Por lo antes dicho, las cifras que el Perú presenta deben ser tomadas en cuenta como prioridad para abordar esta enfermedad desde todas sus aristas y plantear estrategias que puedan solucionar el manejo de la TB en el país. En este mismo sentido, el manejo de la TB debe de ser integral colocando especial énfasis en el diagnóstico temprano, tratamiento oportuno y manejo de las determinantes sociales a que los pacientes con TB están predispuestos.

En primer lugar, el diagnóstico de la TB es complejo ya que dependiendo de la cepa de MTB y su resistencia a las drogas utilizadas en el tratamiento que esté infectando al paciente puede clasificarse en: TB sensible aquella en donde MTB es susceptible a todas las drogas utilizadas en el tratamiento anti-TB; la TB multidrogorresistente (TB-MDR), aquella en donde MTB es resistente simultáneamente a la Isoniacida (INH) y a la Rifampicina (RIF); y la TB extensamente

resistente (TB-XDR), en donde MTB es multidrogorresistente además de presentar resistencia a una fluoroquinolona (Levofloxacino, Ofloxacino, Moxifloxacino) y a un aminoglucósido (Capreomicina, Amikacina, Kanamicina) utilizado en el tratamiento para la TB (Ministerio de Salud, 2013).

Por un lado, los procedimientos utilizados para el diagnóstico de la TB son la microscopía de esputo, pruebas moleculares rápidas como Ensayo de Sonda en Línea y Gene Xpert MTB/RIF, medios de cultivo Löwenstein-Jensen, Ogawa, entre otros. En el 2016, solo el 57% de los casos de TB pulmonar que se informó a la OMS fueron confirmados bacteriológicamente (World Health Organization, 2017). Por otro lado, aquellos procedimientos que se realizan para la determinación del perfil de susceptibilidad a drogas anti-TB incluyen métodos fenotípicos (método Proporciones Agar en Placa (APP), Susceptibilidad a Drogas Mediante Observación Microscópica (MODS), BACTEC MGIT 960, entre otros) y genotípicos (Gen Xpert MTB/RIF y del ensayo en sonda lineal (LPA)).

Los métodos fenotípicos son los que se han venido utilizando convencionalmente para determinar la susceptibilidad a las diferentes drogas utilizadas en el tratamiento anti-TB y además suelen ser los estándares de referencia. Actualmente se utilizan dos enfoques para poder determinar la susceptibilidad a drogas por estos métodos: el primero basado en el uso de concentraciones críticas (CC) definido como 'la menor concentración de droga que inhibirá el 95% (90% para Pirazinamida) de cepas salvajes de MTB que nunca ha estado expuesto a drogas, mientras que al mismo tiempo, no inhibe las cepas clínicas de MTB que se consideran resistentes (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011) y el segundo basado en concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), definida como la concentración más baja de una droga que resulta

en la inhibición completa del crecimiento *in vitro* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

En el Perú para la determinación del perfil completo de susceptibilidad a drogas anti-TB se realiza mediante el método APP en el cual se incluye drogas anti-TB de primera línea como: Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF), Estreptomicina (STR), Etambutol (EMB) y Pirazinamida (PZ) (en este último caso por el método de la pirazinamidaza o por BACTEC MGIT 960); las drogas de segunda línea: Levofloxacino (LEV), Kanamicina (KAN), Capreomicina (CAP), Cicloserina (CS), Acido Paraminosalicílico (PAS), Etionamida (ETH).

En segundo lugar, el tratamiento de la TB depende en gran medida del diagnóstico temprano y adecuado de los pacientes con esta enfermedad, en este sentido hace varios años se han ido descubriendo diferentes drogas que son eficaces para poder tratar a un paciente con TB, dentro de estas drogas se tiene al grupo de las fluoroquinolonas (FQ), las cuales tienen excelente acción contra MTB tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha demostrado ser uno de las drogas de segunda línea más eficaces para el tratamiento de la TB resistente (World Health Organization, 2008). El grupo de las fluoroquinolonas está compuesto por FQ de primera, segunda, tercera y cuarta generación, la eficacia de estas drogas radica en que inhiben la actividad del ADN girasa de las bacterias, produciendo la fragmentación de su ADN e interrumpiendo la replicación bacteriana (Bergan, 1988). Las FQ particularmente las de cuarta generación (Levofloxacino y Moxifloxacino) son drogas esenciales con actividad bactericida, esterilizante y con buena eficacia. De acuerdo con la actual clasificación de las drogas anti-TB de la OMS, las FQ están incluidas dentro del grupo 3 (Caminero, Matteelli & Lange, 2012) (Caminero, 2013). La importancia de poder utilizar una FQ es que ha sido identificada como el mejor predictor de un resultado favorable del tratamiento de pacientes con TB MDR.

En este sentido, Moxifloxacino (Mox) es una de las FQ más importantes de este grupo de drogas, que presentan una potente actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas aerobias y facultativas, además presenta un buen perfil farmacocinético; es decir una buena absorción oral y buen efecto post-antibiótico y un perfil de toxicidad favorable cuando se administran por vía oral (Alós, 2003). Esta droga se incluyó en los regímenes anti-TB desde finales de los años 80 y en la actualidad representa la base del tratamiento para la TB MDR y TB XDR por su acción bactericida ya que inhiben el ADN girasa de MTB (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015). Existen datos de investigación que indican la eficacia en el control de la TB cuando se combina con regímenes bien establecidos. La acción de Moxifloxacino, con una buena tolerancia y un costo asequible hace que la sea una mejor opción para las drogas de segunda línea que se caracterizan por actividad antimicrobiana de amplio espectro.

Adicionalmente, el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) es el único laboratorio en el Perú que realiza la prueba de susceptibilidad a drogas para la detección de TB-XDR y actualmente no cuenta con la determinación de la susceptibilidad a Moxifloxacino en su método de referencia nacional, el APP.

Por consiguiente, el objetivo de la presente investigación es determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la que la droga Moxifloxacino puede inhibir el crecimiento de las cepas de MTB, así como validar la utilización de esta droga en el método de referencia nacional, método de proporciones agar en placa en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias.

1.1 Descripción y Formulación del Problema

La TB es una infección bacteriana contagiosa, causada por MTB; que compromete principalmente a los pulmones, pero puede propagarse a otros órganos (Kumar, Abbas, Fausto & Mitchell, 2007). En el Perú, la TB es una de las enfermedades infecciosas más importantes desde el punto de vista de salud pública, siendo posiblemente la más prevalente en el mundo. A pesar que esta patología, es predominantemente de los pulmones puede afectar también el sistema nervioso central, el sistema linfático, el sistema circulatorio, el sistema genitourinario, el aparato digestivo, los huesos, las articulaciones incluso la piel (Raviglione, 2003).

El diagnóstico de la TB es complejo ya que dependiendo de qué cepa de MTB esté infectando al paciente puede clasificarse en tres clases: la TB sensible, aquella en donde MTB es susceptible a todas las drogas utilizadas en el tratamiento anti-TB; la TB multidrogorresistente (MDR), aquella en donde MTB es resistente a la isoniacida (INH) y a la rifampicina (RIF); y la TB extensamente resistente, en donde MTB es resistente además a una fluoroquinolona (Levofloxacino, Ofloxacino, Moxifloxacino) y un aminoglucósido (Capreomicina, Amikacina, Kanamicina) (Ministerio de Salud, 2013). En este sentido, la resistencia de MTB a las drogas antituberculosis es una de las principales amenazas para el control de la TB y por consiguiente para su futura erradicación en el Perú y en el mundo.

El tratamiento de la TB depende en gran medida del diagnóstico temprano y adecuado de los pacientes con esta enfermedad, en este sentido hace varios años se han ido descubriendo diferentes drogas que son eficaces para poder matar a MTB, dentro de estas drogas se tiene al grupo de las fluoroquinolonas (FQ), las cuales tienen excelente acción contra MTB tanto in vitro como in vivo y ha demostrado ser uno de los fármacos de segunda línea más eficaces para el tratamiento de la TB resistente (World Health Organization, 2008). Dentro de este grupo de

drogas se encuentran ciprofloxacino, la levofloxacino, ofloxacino y moxifloxacino, siendo actualmente levofloxacino la que se diagnóstica por el método de proporciones agar en placa (APP- método de referencia nacional) en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM)

1.2 Antecedentes

La validación de la prueba de Susceptibilidad a Moxifloxacino contribuiría a un mejor manejo en la detección temprana de cepas resistentes a fluoroquinolonas que a su vez contribuiría a un mejor manejo terapéutico del paciente, disminución del riesgo de propagación de cepas TB-XDR.

La prueba de Susceptibilidad de Proporciones Agar en Placa se ha venido utilizando para la determinación de la MIC de drogas anti-TB, ya que considerado como el Gold Standard según la OMS y el CLSI. A continuación, hacemos referencia de algunos trabajos desarrollados bajo esta técnica para la terminación de la MIC de determinadas drogas (World Health Organization, 2018) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

1.2.1 Investigaciones que emplearon la metodología APP para la determinación de la MIC de Moxifloxacino

Un estudio en Taiwán realizado por Wang & colaboradores (Wang et al., 2007), cuyo objetivo fue evaluar la susceptibilidad de aislados de MTB en áreas endémicas, donde se evaluaron las mutaciones genéticas responsables para la resistencia a FQ, un total de 420 aislados clínicos de MTB durante los meses de enero 2004 hasta diciembre 2005 Se determinaron las MIC de Ofloxacino, Ciprofloxacino, Levofloxacino y Moxifloxacino. Spoligotyping y la secuencia de los genes *gyrA* y *gyrB* se realizaron para todos los aislados resistentes a cualquier FQ probado,

demonstró que los porcentajes de susceptibilidad de ofloxacino, ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino fueron de 98.3%, 98.6%, 98.6% y 97.6%, respectivamente, con una tasa de resistencia global de 3.3% a alguna FQ evaluada. Encontraron que 45 pacientes tuvieron exposición previa a FQ de >1 semanas y 63 pacientes tuvieron exposición previa a FQ de ≤1 semana. Sin embargo, ni las exposiciones previas a FQ ni la duración de la exposición a FQ fue relacionada con la resistencia a FQ de MTB. La resistencia a medicamentos antituberculosis de primera línea, especialmente TB MDR, y el tratamiento antituberculosis previo fueron significativamente asociados con resistencia a FQ de MTB aislados.

El estudio de Angeby (Angeby et al., 2010) tuvo como objetivo describir las distribuciones de tipo salvaje de la MIC de las fluoroquinolonas para MTB en relación a las CC actuales utilizados para las pruebas de sensibilidad a los drogas y los datos farmacocinéticos / farmacodinámicos (PK / PD), utilizando un replicador de 96-stick sobre medio Middlebrook 7H10 se utilizó para definir las CIM de ciprofloxacino, ofloxacino, moxifloxacino y levofloxacino de 90 cepas clínicas consecutivas y 24 cepas resistentes a las drogas. Las MICs se compararon con la rutina BACTEC 460 resultados de susceptibilidad y con determinaciones de MIC en el sistema BACTEC MGIT 960 en un subconjunto de cepas utilizando ofloxacino como un representante de la clase. PK datos / PD para cada droga se revisaron con respecto a la distribución de MIC de tipo salvaje. Los resultados de las MICs de tipo salvaje de la ciprofloxacino, ofloxacino, moxifloxacino y levofloxacino se distribuyeron desde 0.125 a 1, 0,25 a 1, 0,032 a 0,5 0.125 a 0,5 mg / L, respectivamente. Los datos de MIC correlacionaron bien con resultados de BACTEC MGIT 960 y BACTEC 460. Índices PD eran los más favorables para levofloxacino, moxifloxacino, seguido de, ofloxacino y ciprofloxacino. En conclusión, se propusieron: S (susceptible) ≤1.0 mg / L como la tentativa epidemiológica de corte (ECOFF) para ofloxacino y

ciprofloxacino, y $S \leq 0.5$ mg / L para levofloxacino y moxifloxacino, aunque es posible que la adición de más datos MIC podrían desplazar las ECOFFs para ofloxacino y levofloxacino una dilución anterior. Los ECOFFs propuestos pueden ser más apropiados si se usan como puntos de interrupción clínicos sobre agar Middlebrook 7H10 que las CC actuales de $S \leq 2.0$ mg / L para la ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, y $S \leq 0.5$ mg / L podría ser considerado como un punto de interrupción clínico para moxifloxacino.

Van Ingen (Van Ingen et al., 2010) realizó un estudio comparativo de la actual prueba estándar de oro en los Países Bajos (APP), el método de dilución en agar Middlebrook 7H10, el sistema MGIT960, y el método genotípico genotipo MTBDRsl para la detección rápida de los aminoglucósidos y la resistencia a fluoroquinolonas. Se seleccionaron 28 cepas de MTB multirresistente y cepas del complejo MTB H37Rv y resistente a fármacos. Se incluyeron amikacina, capreomicina, moxifloxacino, protionamida, clofazimina, linezolid y rifabutina en los paneles de ensayo fenotípicas. Para protionamida y moxifloxacino, las diversas concentraciones de punto de interrupción propuesta se ensayaron utilizando el método MGIT960. El método MGIT960 dio resultados 10 días más rápido que el método de dilución en agar. Para amikacina, capreomicina, linezolid, y rifabutina, los resultados obtenidos por todos los métodos fueron completamente concordantes. La aplicación de un punto de interrupción de 0,5 g / mL para moxifloxacino condujo a resultados concordantes con los de tanto el método de dilución en agar y el método genotípico. Para protionamida, la concordancia se observó sólo en los países de ingresos medios y bajos. Los métodos fenotípicos dieron resultados en gran medida idénticos, a excepción de aquellos para protionamida. El estudio apoya los siguientes puntos de corte para el método MGIT960: 1 g / mL para amikacina, linezolid, y la clofazimina, 0,5 g / mL para moxifloxacino y rifabutina, y 2,5 g / mL para capreomicina. Para protionamida, una división en

sensible, intermedio, y resistente parece justificada, a pesar de los límites requieren de estudios adicionales. El ensayo genotípico demostró ser un método fiable y rápido para la predicción de resistencia para aminoglucósido y fluoroquinolona.

Pholwat (Pholwat et al., 2011) evidenció que el tiempo de respuesta para resultados de susceptibilidad de MTB a drogas era lento y una barrera a la atención. Entonces desarrolló un PCR cuantitativo rápido (qPCR) basado en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica que utiliza la amplificación del gen 16S rRNA de MTB después de 3 días de incubación con fármacos antituberculosis. Para disminuir el fondo a partir de organismos muertos, se utilizó monoazida de propidio (PMA), un colorante de unión a ADN que penetra en las células bacterianas dañado y hace no amplificable el ADN. MTB se cultivó en medio de caldo que contenía PMA con o sin drogas para 3 días antes de la extracción de ADN y PCR en tiempo real. qPCR 16S rRNA exhibió una disminución significativa en los valores de tiempo de ciclo umbral (CT), con cepas susceptibles a las drogas en comparación con cepas resistentes, datos de susceptibilidad se informaron como CT o como 2 CT y con puntos de corte apropiadas produjo una precisión del 89 a 100% en 38 cepas resistentes a múltiples drogas y resistente a drogas en comparación con resultados de proporción de agar susceptibles convencionales para la isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin, amikacina, kanamicina, capreomicina, ofloxacino, moxifloxacino, etionamida, ácido para-aminosalicílico, linezolid, y cicloserina y comparación con los resultados BACTEC MGIT para pirazinamida. Este ensayo PMA-qPCR es útil como un rápido de 3 días de primera y prueba de susceptibilidad a las drogas de segunda línea para MTB.

El estudio de Malik (Malik, Willby, Sikes, Tsodikov, & Posey, 2012) se analizaron veintiséis mutaciones en los genes *gyrA* (siete) y *gyrB* (diecinueve) para determinar la relevancia clínica y

el papel de estas mutaciones en la resistencia a FQ. Aislados clínicos que albergan T80A, T80A+A90G, A90G, G247S y A384V mutaciones gyrA fueron susceptibles a todas las FQ probadas. La mutación A74S confirió un bajo nivel de resistencia a moxifloxacino, pero la susceptibilidad a ciprofloxacino, levofloxacino y ofloxacino, y los A74S+D94G doble mutación confiere resistencia cruzada a todas las FQ ensayadas y sólo tres mutaciones, N538D, E540V y R485C+T539N, confiere resistencia a los cuatro FQ en al menos una base genética. Las mutaciones D500H y D500N confirieron resistencia única a la levofloxacino y ofloxacino mientras N538K y E540D conferidos consistentemente la resistencia a moxifloxacino solamente, aislados clínicos que albergan mutaciones T539N, T539P o N538T, T546M exhibieron bajo nivel de resistencia a moxifloxacino única, pero no siempre. Estos hallazgos indicaron que ciertas mutaciones en gyrB confieren resistencia a FQ, pero el nivel y el patrón de resistencia varía entre las diferentes mutaciones. Los resultados de este estudio proporcionan apoyo a la inclusión de la QRDR de gyrB en ensayos moleculares utilizados para detectar la resistencia a FQ en MTB.

Farhat & colaboradores (Farhat et al., 2015) estudió la concordancia de MTB pruebas de resistencia a las FQ: implicaciones para el tratamiento. La prueba de susceptibilidad a drogas anti-TB como las FQ es un paso importante en el diseño de los regímenes de tratamiento eficaces para la TB resistente a múltiples drogas anti-TB. En este estudio se comparó la resistencia a Ciprofloxacino, Ofloxacino y Moxifloxacino en 226 muestras resistentes a múltiples drogas. El bajo nivel de concordancia que se observó en este estudio sugiere que la prueba de susceptibilidad a drogas debe desarrollar para una FQ en específico para uso clínico. Además, los resultados tienen un soporte de la nueva recomendación de la OMS para la prueba de Moxifloxacino a una concentración crítica de 2.0 µg/mL.

En el estudio realizado por Willby & colaboradores (Willby et al., 2015), determinaron las CC para las pruebas de susceptibilidad de MTB a Moxifloxacino y Levofloxacino ya que estas no están bien establecidas. Además, el grado de resistencia cruzada entre Ofloxacino (Ofx) y estas nuevas FQ no se ha investigado a fondo. En este estudio, las MICs para Mox y Lev y la susceptibilidad a la CC de Ofx se determinaron utilizando el método de proporción de agar en placa para 133 cepas de MTB. La mayoría de los aislados resistentes a OFX tenían MICs Lev de > 1 g/mL y MICs Mox de $> 0,5$ g/mL. La presencia de mutaciones dentro de las regiones de resistencia de determinación de FQ *gyrA* (QRDR) se correlacionó bien con el aumento de parámetros, y el nivel de Lev y Mox resistencia era dependiente de la mutación específica presente *gyrA*. Sustituciones Ala90Val, Asp94Ala, y Asp94Tyr resultaron en bajo nivel de resistencia Mox (MICs fueron $> 0,5$ pero < 2 g/mL), mientras que otras mutaciones condujeron a MICs Mox de > 2 g/mL. Basándose en estos resultados, una CC de 1 g/mL se sugiere para Lev y 0,5 g/mL para Mox pruebas de sensibilidad a los medicamentos por la proporción de agar con las pruebas de reflejos para Mox a 2 g/mL.

Farhat publicó un estudio (Farhat et al., 2016) acerca del diagnóstico molecular que rápidamente y con precisión predice la resistencia a drogas fluoroquinolonas y especialmente agentes que prometen mejorar los resultados del tratamiento anti-TB resistentes a múltiples drogas y evitar la propagación. Las mutaciones en los genes *gyr* son conocidos para conferir resistencia a la mayoría de las fluoroquinolonas, pero el conocimiento sobre los efectos de las mutaciones *gyr* en la susceptibilidad temprana frente a las FQ con susceptibilidad tardía. Se analizaron 240 cepas de MTB con mutaciones en sus regiones *gyrA* y *gyrB* resistentes a múltiples y se cuantificó su MIC a ofloxacino y moxifloxacino mediante el ensayo de crecimiento en seis concentraciones de cada droga. Se construyó un modelo de regresión

multivariante para evaluar tanto los efectos de mutaciones individuales y las interacciones en las MICs de drogas. Se encontró que las mutaciones *gyrB* contribuyen a la resistencia a FQ tanto individualmente como a través de interacciones con mutaciones *gyrA*. Estos efectos fueron estadísticamente significativos. En estos aislados clínicos, varias mutaciones *gyrA* y *gyrB* presentaron diferentes niveles de resistencia a la ofloxacino y moxifloxacino. En consideración de las combinaciones de mutaciones *gyr* durante la interpretación de resultados de la prueba molecular se concluyó que puede mejorar la precisión de la predicción del fenotipo de resistencia a FQ. Además, los efectos diferenciales de mutaciones *gyr* sobre la actividad de las FQ temprana y más tarde generación requieren más investigación y podrían informar a la selección de una fluoroquinolona para el tratamiento.

1.2.2 Investigaciones que emplearon otras metodologías para la determinación de la MIC de Moxifloxacino

El estudio de Somasundaram & Paramasivan (Somasundaram & Paramasivan, 2006) fue dirigido para definir la resistencia a estos dos drogas: Gatifloxacino y Moxifloxacino. Un total de 50 aislados de MTB, que consisten en 30 cepas ofloxacino susceptible y 20 cepas ofloxacino resistentes que se ensayaron para determinar su susceptibilidad a la gatifloxacino y moxifloxacino usando diferentes métodos de ensayo de susceptibilidad: el método concentración absoluta en medio Löwenstein-Jensen (LJ), el método de ensayo de la susceptibilidad proporción (PST) en LJ y medios de agar 7H11, y el método radiométrico BACTEC. Resultado así la MIC de gatifloxacino y moxifloxacino fue de 1 g / mL por el método de concentración absoluta en LJ. En el método de PST en LJ y 7H11, usando un criterio de 61% de crecimiento como resistentes, había 100% de acuerdo con el método de concentración a una concentración de 0,5 g / mL para gatifloxacino, y 96% de acuerdo con el método BACTEC a una concentración de 0,25 g / mL.

Para moxifloxacino, resultados por el método de PST mostraron 96% de acuerdo con el método de concentración absoluta en LJ a una concentración de 1 g / mL y 92% acuerdo a una concentración de 0,5 g / mL tanto para el método de concentración absoluta en 7H11 y el método BACTEC. En conclusión, las MICs de gatifloxacino y moxifloxacino fueron mucho menores que las CIM de otras FQ como ofloxacino y ciprofloxacino. Además, estos dos fármacos han mostrado una baja MIC media y baja concentración como definición de la resistencia, lo que podría ayudar en el tratamiento de los pacientes con bajos niveles de resistencia a FQ.

Piersimoni (Piersimoni et al., 2007) realizó un estudio para correlacionar tentativamente el resultado clínico con resultados in vitro de Moxifloxacino, trataron de establecer las condiciones de ensayo de susceptibilidad para MTB contra Mox utilizando el método de referencia proporción agar en placa, el sistema radiométrico BACTEC 460 y el sistema no radiométrico BACTEC MGIT 960 recientemente validado. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de ensayo de Mox crítico para ser usado con los métodos antes mencionados para las pruebas de sensibilidad de rutina. Se determinaron MICs para 20 cepas pan-susceptibles, 10 cepas resistentes a múltiples drogas y 10 cepas resistentes a FQ con mutaciones gyrA definidos. MICs Mox resultó en un patrón bimodal con valores para los mutantes gyrA considerablemente más altos que los de las cepas de pan-susceptibles y resistentes a múltiples drogas. Los datos del estudio demostraron que una concentración de 0,5 g / mL permitió una separación clara entre las cepas susceptibles y resistentes cuando se prueba por todos los métodos estudiados. Ensayo de confirmación con un subconjunto de cepas pan sensible y MDR apareció para validar la concentración crítica seleccionada. Las cepas de Mox-resistentes fueron casi aisladas de pacientes con exposición fluoroquinolona anterior.

Sirgel y colaboradores (Sirgel et al., 2012) realizaron un estudio cuyo objetivo fue comparar las mutaciones en la región de resistencia de determinación de fluoroquinolona del gen *gyrA* y secuencias flanqueantes con las MIC de ofloxacino y moxifloxacino para MTB, en un total de 177 cepas aisladas de MTB se determinó su perfil de resistencia mediante secuenciación de ADN y MICs cuantificados por MGIT 960. Los polimorfismos de nucleótido único se detectaron en los codones 94 (n ¼30), 90 (n ¼12), 91 (n ¼3), 89 (n ¼1), 88 (n ¼1) y 80 (n ¼1). Cuatro cepas con mutaciones doble D94G más A90V (n¼2) y D94G más D94N (n ¼2) reflejan poblaciones mixtas. De acuerdo entre la susceptibilidad genotípica y fenotípica fue alta ($\geq 97\%$) para ambas drogas. Cepas mutantes tenían una CMI₅₀ de 8,0 mg / L y un MIC₉₀ de .10 mg / L para ofloxacino en comparación con un MIC₅₀ y MIC₉₀ de 2,0 mg / L para moxifloxacino. Los codones 94 y 88 estaban relacionados con niveles más altos de resistencia a fluoroquinolonas en comparación con los codones 90, 91 y 89. Las distribuciones de MIC para el tipo salvaje variaron de ≤ 0.5 a 2,0 mg / L para ofloxacino y desde ≤ 0.125 a 0,25 mg / L para moxifloxacino. Sin embargo, 96% de los aislamientos con alteraciones genéticas tenía MICs ≤ 2.0 mg / L para moxifloxacino, que es dentro de sus niveles séricos alcanzables. Este estudio proporcionó evidencia cuantitativa de que la adición de moxifloxacino a cepas TB-XDR resistente a los medicamentos regímenes basados en un punto de interrupción clínica de 2,0 mg / L tiene mérito. El uso de moxifloxacino en el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos puede impedir la adquisición de mutaciones y el desarrollo de la tuberculosis extremadamente resistente.

El estudio de Barletta (Barletta, Zamudio, Rigouts, & Seas, 2014) determinó los perfiles de resistencia de las FQ; ciprofloxacino (Cpx), ofloxacino (Ofx), gatifloxacino (Gfx) y moxifloxacino (Mfx), y de los inyectables; kanamicina (Km), amikacina (Am) y capreomicina

(Cm) en cepas multidrogasresistente (MDR). Se buscó la presencia de mutaciones en los genes *rrs*, *tlyA* y *gyrA/B*, y su posible asociación con la resistencia a inyectables y quinolonas. En este estudio piloto descriptivo se seleccionaron cepas MDR aisladas durante junio a diciembre del 2004, que fueron criopreservadas en el banco de muestras del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” en Lima, Perú. Se determinó la MIC para Cpx, Ofx, Gfx, Mfx, Km, Am y Cm. Se investigó las mutaciones presentes en los genes *rrs*, *tlyA* y *gyrA/B* a través de un PCR convencional y posterior secuenciamiento de los productos obtenidos. Como resultado cuatro de los once aislados presentaron resistencia contra los inyectables y en todas se observó una alta MIC; >120 µg/mL para Km y >160 µg/mL para Am y Cm. Solo dos aislados presentaron resistencia a Ofx con un MIC= 4 µg/mL. Los resultados de secuenciamiento sugirieron que la mutación A1401T en *rrs* podría ser la causa molecular de resistencia a los inyectables; mientras que en este estudio no se halló ninguna mutación en *tlyA* ni en *gyrA/B* asociada a resistencia. En conclusión, este estudio sugiere una posible asociación entre la mutación en A1401G y la resistencia a las drogas inyectables.

Por lo expuesto, es fundamental poder contar con el diagnóstico de laboratorio para Moxifloxacino; en este sentido la presente investigación se basa en obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la que la droga moxifloxacino puede inhibir el crecimiento de las cepas de MTB, así como validar su utilización en el método de referencia nacional proporciones agar en placa (APP) que se viene utilizando el LRNM y que es considerado como el Gold Standard por la Organización Mundial de Salud (World Health Organization, 2018).

1.3 Objetivos

- **Objetivo General**

Validar la prueba de susceptibilidad a la droga moxifloxacino utilizando el método de proporciones agar en placa en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis.

- **Objetivos Específicos**

Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la droga moxifloxacino utilizando el método de proporciones agar en placa en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis.

Comparar la actividad antibacteriana *in vitro* de la droga moxifloxacino utilizando el método de proporciones agar en placa en cepas de *M. tuberculosis* con patrones de resistencia definido aisladas de pacientes con TB sensible, TB MDR y TB XDR.

Implementar la prueba de susceptibilidad a drogas de resistencia de *M. tuberculosis* a moxifloxacino, evaluando los parámetros de sensibilidad, especificidad, precisión y reproducibilidad, la misma que se utilizará en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM).

1.4 Justificación

El grupo de las fluoroquinolonas está compuesto por FQ de primera, segunda, tercera y cuarta generación, la eficacia de estas drogas radica en que inhiben la actividad del ADN girasa de las bacterias, produciendo la fragmentación de su ADN e interrumpiendo la replicación bacteriana (Bergan, 1988). Las FQ particularmente las de última generación (levofloxacino y moxifloxacino) son drogas esenciales con actividad bactericida, esterilizante y con buen perfil de

seguridad y eficacia. De acuerdo con la actual clasificación de las drogas anti-TB de la OMS, las FQ están incluidas dentro del grupo 3 (Caminero, Matteelli, & Lange, 2012) (Caminero, 2013). La importancia de poder utilizar una FQ es que ha sido identificada como el mejor predictor de un resultado favorable del tratamiento de pacientes con TB MDR.

En específico, Moxifloxacino se incluyó en los regímenes antituberculosis desde finales de los años 80 y en la actualidad representa la base del tratamiento para la TB MDR y TB XDR por su acción bactericida ya que inhiben el ADN girasa de MTB (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015), existen datos de investigación que indican la eficacia en el control de la TB cuando se combina con regímenes bien establecidos. La acción de Moxifloxacino, con una buena tolerancia y un costo asequible hace que la sea una mejor opción para las drogas de segunda línea que se caracterizan por actividad antimicrobiana de amplio espectro.

En el LRNM, se detecta la susceptibilidad mediante el método de proporciones agar en placa, desde el año 2005 se utilizó en el laboratorio Ciprofloxacino, y desde el año 2015 se comenzó a utilizar levofloxacino, sin embargo, la detección de la susceptibilidad a moxifloxacino es de vital importancia ya que es la última droga con mayor eficacia dentro del grupo de las FQ.

Por su parte moxifloxacino es una de las FQ más importantes de este grupo de drogas, que presentan una potente actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas aerobias y facultativas, además presenta un buen perfil farmacocinética; es decir una buena absorción oral y buen efecto post-antibiótico y un perfil de toxicidad favorable cuando se administran por vía oral (Alós, 2003). Por consiguiente, poder contar con el diagnóstico de laboratorio para esta droga es fundamental para el tratamiento de un paciente con TB, en este sentido la presente investigación se basa en obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la que la droga moxifloxacino

puede inhibir el crecimiento de las cepas de MTB, así como validar la utilización de esta droga en el método de referencia nacional que viene utilizando el LRNM.

1.5 Hipótesis

H1: Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis son susceptibles a la droga moxifloxacino a una concentración de 2.0 µg/mL y 0.5 µg/mL utilizando el método de proporciones agar en placa.

H0: Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis no son susceptibles a la droga moxifloxacino a ninguna evaluada

II. Marco Teórico

2.1 Bases teóricas sobre el tema de Investigación

2.1.1 Micobacterias.

Las micobacterias son bacterias pertenecientes a la familia Mycobacteriaceae, se caracterizan por ser bacilos aeróbicos, inmóviles no esporulados que pueden presentar una forma ligeramente curva o recta. Las micobacterias poseen una pared con abundante contenido de lípidos y ácidos micólicos lo que la vuelve impermeable ante los agentes hidrofílicos esta característica impide que esta bacteria sea penetrada por los colorantes habituales y no sea teñida fácilmente con la coloración Gram, si no deben ser teñidas adecuadamente por el método Ziehl-Neelsen para ser visualizadas (Fraser, Muller, Colmman, & Pare, 2002).

En la actualidad se han descrito aproximadamente 120 especies dentro del género *Mycobacterium* que se caracterizan por ser Bacilos Acido Alcohol Resistente (BAAR) debido a su alto contenido de lípidos que tiene su pared celular, esta característica hace que una vez teñidas no se decoloren con una mezcla de alcohol y ácido (Pfyffer, 2015).

Las micobacterias pueden sobrevivir protegidas de la luz solar durante semanas o meses en la superficie de objetos inanimados; además son resistentes a la desecación y congelación, excepto al calor (>65°C por 3 minutos) y luz ultravioleta (Pfyffer, 2015).

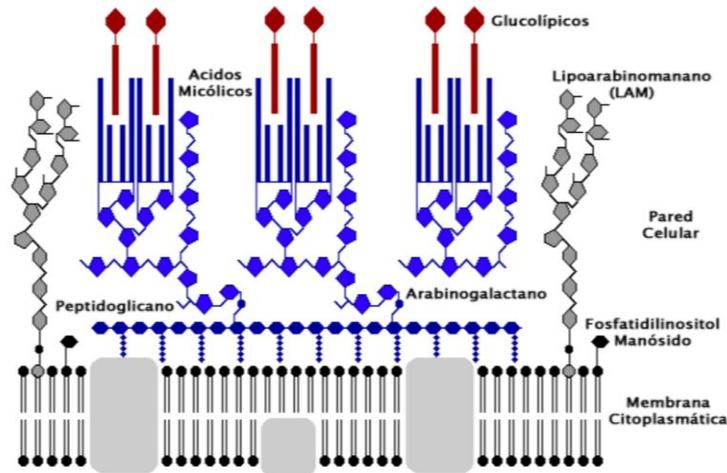


Figura 1. Esquema de las envolturas de una eubacteria Acido-Alcohol Resistente.

<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis319.pdf> (Cortes, 2009)

2.1.2 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

Robert Koch describió el agente etiológico de la tuberculosis en 1882 denominándolo *Bacterium tuberculosis* (Koch & Brock, 1884).

En 1896 Lehmann y Neumann sustituyó el nombre inicial por *Mycobacterium tuberculosis* (Collins, Grange, & Yates, 1985). Esta denominación se debe al aspecto de los cultivos que parecen hongos, es por eso que *Mycobacterium* significa hongo-bacteria (Collins, Grange, & Yates, 1985).

M. tuberculosis es un bacilo aerobio estricto, de crecimiento lento e inmóvil. Su membrana citoplasmática se encuentra cubierta por peptidoglicanos unidos a polisacáridos esterificados con los ácidos micólicos formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglucolípidos, que le brinda una apariencia cerosa con alta hidrofobicidad, resistencia a detergente, a un buen número de antibióticos, a las tinciones habituales, pero no a la tinción Ziehl-Neelsen y Kinyoun (Hong & Hopfinger, 2004).

MTB es el agente causal de la tuberculosis, una enfermedad infectocontagiosa más letal y antigua que afecta a la población en el mundo (Smith, 2003) (Beresford et al., 2007). En la actualidad existen moléculas activas contra MTB que se dividen en fármacos de primera y segunda línea según su eficacia. La aparición de mutaciones espontáneas en su genoma generan que MTB creen resistencia a fármacos antituberculosis (Rinder, Mieskes, & Loscher, 2001).

2.1.3 Tuberculosis.

La TB es una enfermedad infectocontagiosa crónica producida por el *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta al ser humano y se localiza generalmente en el pulmón, posee una amplia distribución en el mundo, produciendo cada año la muerte de alrededor de 2 millones de personas (Smith, 2003). Esta enfermedad se transmite a través de partículas expelidas de persona a persona (con TB activa), por inhalación de aerosoles contaminados que han sido eliminados a por individuos enfermos al toser, estornudar, hablar, cantar, etc., por lo que se recomienda no tener contacto con terceras personas (Cole, 1998). A pesar de que el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado lograría la curación en la mayoría de los pacientes, con la consiguiente disminución de las fuentes de infección y el riesgo de contraer la enfermedad en la población, debido a algunos problemas de funcionamiento del sistema de salud en el manejo de la enfermedad, como la falta de detección de los casos existentes, los abandonos del tratamiento y, más recientemente la aparición de resistencia a los fármacos antituberculosis tradicionales, la TB en la actualidad sigue siendo un importante problema de salud pública, por el daño que provoca, principalmente, como causa de enfermedad y, en menor medida, también como causa de mortalidad (Center for Disease Control and Prevention, 2000). Aún en el caso que se disponga de una adecuada red de diagnóstico de la enfermedad y de tratamiento y seguimiento de los casos, existen otros factores que determinan la ocurrencia de enfermedad como las

condiciones ambientales, sociales, sanitarias e individuales que son factores predisponentes de la TB (World Health Organization, 2001).

El hacinamiento, la malnutrición, el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), el abuso de alcohol y las malas condiciones de vida disminuyen la inmunidad posibilitando la aparición de la enfermedad. También ocurre que otros trastornos que impactan en la inmunidad predisponen a la TB, como es la diabetes y otros trastornos respiratorios crónicos (Griffith & Kerr, 1996).

2.1.3.1 Tuberculosis en el mundo.

La TB sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y su tratamiento se ha vuelto más complejo debido a su gran resistencia a los medicamentos anti-TB de uso común (World Health Organization, 2008). A nivel mundial la TB ocupa el noveno lugar en causales de muerte, pero el primero en enfermedades infecciosas superando al VIH/sida. (World Health Organization, 2017). En el 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó aproximadamente 1,3 millones de muertes por TB (aproximadamente 3 muertes por minuto) y 10,4 millones de casos nuevos, se calcula que 1,9 millones eran atribuibles a la desnutrición, 1,0 millones a la infección por el VIH, 0.8 millones al tabaquismo y 0.8 millones a la diabetes; además se calcula que el 90% eran adulto y de estos nuevos casos solo se notificaron 6,3 millones lo cual equivale al 61% de los estimados y solo el 81% de estos casos notificados tuvieron éxito terapéutico; además. En este mismo año se registraron 600 000 casos nuevos de TB farmacorresistente, de los cuales 490 000 fueron TB-MDR, así mismo se detectó que el 60% de los pacientes previamente tratados y el 33% de los casos nuevos de TB farmacorresistente tuvieron acceso a pruebas de susceptibilidad a fármacos, 41% de manera general (World Health Organization, 2017), panorama que mejoró respecto al 2015, donde solo el 31% de casos nuevos

tuvieron acceso a pruebas de susceptibilidad a fármacos (World Health Organization, 2016); Para el caso de la comorbilidad TB-VIH en el 2016 el aumento del porcentaje de personas co-infectadas de un 55% (2015) a un 57%.

La incidencia estimada de TB en todas sus formas se distribuye en los continentes de la siguiente manera: Sudeste Asiático 45%, África 25%, Pacífico Occidental 17%, Mediterráneo Este 7%, Europa y América 3% (World Health Organization, 2016); es por eso que en la actualidad al menos 35 países han introducido tratamientos más breves para la TB fármaco resistente como parte de los refuerzos para mejorar los resultados terapéuticos en la TB-MDR y TB-XDR (World Health Organization, 2016).

2.1.3.2 Tuberculosis en América.

En el año 2016 la Organización Mundial de la Salud estimó 273 574 casos de TB sin embargo 222 750 casos fueron notificados, también estimó una incidencia de TB de 27,5 por cada 100 000 habitantes; sin embargo, solo 22.4 casos se notificaron, dejando una brecha de 49 774 casos, además se calculó que el 95% de la población infectada tuvieron una edad mayor a los 15 años y el 15% menor a ello y , de la misma manera se estimó 30 483 casos de TB asociados a VIH, pero solo 20 625 fueron notificados lo cual equivale al 68% de lo estimado. En este mismo año la OMS realizó una estimación de 8 129 casos de TB-MDR, de los cuales solo 3 731 fueron notificados (46%) (World Health Organization, 2017).

La incidencia estimada de muerte de TB en el año 2016 para el continente americano fue de 2.3 por cada 100 000 habitantes (23 226), pero solo 1.5 fueron notificadas (14 402) (World Health Organization, 2017).

América es uno de los continentes con menor carga de TB (3%) a nivel mundial; sin embargo, en él se ubica Brasil, uno de los 30 países con mayor carga de TB en el mundo (87 000 casos nuevos), siendo el primero el América, seguido de Perú (37 000), México (28 000), Haití (20 000), Colombia (16 000), Bolivia (12 000), Argentina (11 000), Estados Unidos (10 000), Venezuela (10 000) y Ecuador (8 200) (World Health Organization, 2017).

2.1.3.3 Tuberculosis en el Perú.

El Perú es considerado como el 2º país con mayor carga de TB en América, es el 1º con TB resistente a múltiples fármacos a nivel de América y junto a Brasil conforman el 50% de la carga de TB fármaco resistente de todo el continente.

En el 2015, se informó que la tasa de incidencia fue de 88 nuevos casos por cada 100 000 habitantes; en total 30 988 pacientes con TB notificado, de los cuales 1 366 TB MDR y 103 TB XDR (Ministerio de Salud, 2016).

En el 2016, se informó que la tasa de incidencia estimada fue de 116,4 nuevos casos por cada 100 000 habitantes y la notificada de 86,4; en total 31 079 pacientes con TB notificados de los 37 000 estimados, de los cuales 27 217 fueron casos nuevos notificados (World Health Organization, 2017), de los casos nuevos, 16 747 (65%) fueron confirmados por bacteriología. en ese mismo año el Ministerio de Salud notificó 1 299 casos TB MDR y 109 casos de TB XDR (Ministerio de Salud, 2017).

Entonces para reducir estas cifras de enfermos por TB, es necesario el manejo de los componentes clave para el control de la TB, como el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno. En la más reciente encuesta nacional de resistencia a los medicamentos, en el Perú, 1

de cada 5 los pacientes con TB diagnosticados en Lima son resistente a rifampicina (RIF) o isoniacida (INH) (Asencios et. al., 2009).

En el Perú el 64% de casos de TB (19 860), 79% de TB-MDR (1 020) y el 70% de TB-XDR (76) notificados se concentran en Lima y Callao seguido de La Libertad y Loreto que presentan el 4% cada uno (Ministerio de Salud, 2017).

2.1.4 Resistencia a antibióticos.

La quimioterapia redujo exitosamente la incidencia y la transmisión de tuberculosis en los años 50, sin embargo, la aparición de cepas resistentes a drogas antimicrobianas a mediados de los 80 hizo que se declare una emergencia a nivel mundial (Dye, Scheele, Dolin, Pathania, & Raviglione, 1999). En 1990 surge lo que se denominó "la nueva tuberculosis" alertando la emergencia y propagación de cepas de micobacterias resistentes a múltiples antibióticos, especialmente a drogas anti-TB de primera línea, que aumentado por el incremento de infecciones micobacteriana en pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), complicando la epidemiología de la TB (Dye, Williams, Espinal, & Raviglione, 2002). La OMS estableció la terapia multidrogo en 1991, debido a la aparición de cepas mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a algunos antibióticos utilizados para el momento, creyendo que la cepa resistente podía ser controlada, al adicionar al menos otros dos componentes antimicrobianos (World Health Organization, 1994). Las cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a isoniacida y rifampicina, con o sin resistencia a otras drogas, han sido denominadas cepas multirresistentes a drogas o TB-MDR (Loddenkemper, Sagebiel, & Brendel, 2002).

2.1.4.1 *Mycobacterium tuberculosis* resistente a drogas anti-TB.

La resistencia a drogas anti-TB se define como "una disminución en el grado de susceptibilidad suficiente para estar razonablemente seguro de que la cepa en cuestión es diferente de una muestra de cepa salvaje de tipo humano que nunca ha entrado en contacto con la droga" (World Health Organization, 2012). La resistencia de MTB a drogas anti-TB básicamente está asociada a las características fenotípicas (incapacidad de crecimiento en presencia de la concentración de una determinada droga). MTB resistente amenaza la atención y la prevención de la TB a nivel mundial y sigue siendo un importante problema de salud pública en muchos países (World Health Organization, 2016).

En la actualidad se utilizan tres categorías principales para la vigilancia global y tratamiento:

2.1.4.1.1 *Cepa sensible (TB-sensible).*

Se refiere a una cepa de MTB que es susceptible a todas las drogas utilizadas en el tratamiento anti-TB (Ministerio de Salud, 2013), es decir se considera sensible si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en la dosis habitual del tratamiento (Asencios et. al., 2009).

2.1.4.1.2 *Cepa multidrogorresistente (TB-MDR).*

Hace referencia a una forma grave de TB, es aquella en donde MTB es resistente a la isoniacida (INH) y a la rifampicina (RIF) que son las principales drogas anti-TB de primera línea para el tratamiento de TB-sensible (Ministerio de Salud, 2013) (Asencios et. al., 2009).

2.1.4.1.3 *Cepa extensamente resistente (TB-XDR).*

Refiere la forma más grave de la TB, en donde MTB es resistente a isoniacida (INH) y a rifampicina (RIF) (TB-MDR) y además a una fluoroquinolona (Levofloxacino, Ofloxacino,

Moxifloxacino) y un agente inyectable de segunda línea o aminoglucósido (Capreomicina, Amikacina, Kanamicina) (Ministerio de Salud, 2013) (Asencios et. al., 2009).

2.1.5 Fluoroquinolonas.

Las fluoroquinolonas son agentes antimicrobianos con un amplio espectro de actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que actúan por la inhibición de ADN girasa o topoisomerasa IV. La primera generación de quinolonas comenzó a utilizarse a principios de los años 60. Las generaciones subsecuentes han sido modificadas (Leyva & Leyva, 2008).

Las fluoroquinolonas son una familia de antibióticos que presenta gran importancia en el manejo de muchas enfermedades comunitarias y nosocomiales (Barletta, Zamudio, Rigouts, & Seas, 2014). Debido al uso inadecuado de las quinolonas han comenzado a presentarse resistencia de diversos gérmenes a estas (Hooper, 2000). Estas drogas se encuentran en el Grupo A dentro del esquema de tratamiento anti-TB en la actualidad existe una gran variedad de fluoroquinolonas, las más utilizadas son Ciprofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino y Gatifloxacino (World Health Organization, 2018).

2.1.5.1 Moxifloxacino (MOX).

Moxifloxacino es un antibacteriano de amplio espectro que fue aprobado en 1999 para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio en adultos, pertenece al grupo farmacoterapéutico de las quinolonas y se caracteriza porque tiene un grupo metoxi en la posición 8 y un anillo fusionado a la pirrolidona diazabicyclo en la posición 7 que aumenta la acción contra los Gram positivos (Gutierrez, 2004), moxifloxacino posee actividad in Vitro frente a un amplio espectro de microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos, la

acción bactericida de moxifloxacino resulta de la inhibición de ambos tipos de topoisomerasas II (ADN girasa y topoisomerasa IV) necesarias para la replicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano. (Alós, 2003).

Las investigaciones farmacodinámicas demostraron que moxifloxacino presenta una actividad bactericida dependiente de la concentración (Ministerio de Sanidad Y Política Social, 2010).

2.1.6 Métodos de detección de resistencia a drogas anti-TB en *Mycobacterium tuberculosis*.

Según la Norma Técnica para el control de la Tuberculosis, en el Perú existen distintas pruebas de susceptibilidad que permiten determinar la resistencia de MTB a distintas drogas anti-TB (Ministerio de Salud, 2013) estas pruebas se dividen en 2 grandes grupos: Pruebas rápidas para la detección de tuberculosis multidrogoresistente (TB-MDR) y pruebas de sensibilidad convencionales a medicamentos de primera y segunda línea.

En la actualidad los métodos para determinar la susceptibilidad de MTB se comparan con los métodos de proporción descrito por Canetti y colaboradores, utilizados globalmente, estos se basan en una definición bacteriológica de la resistencia a los medicamentos que se desarrolló en reconocimiento de las dificultades para definir la resistencia clínica a las micobacterias (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

2.1.6.1 Método de las proporciones.

Método descrito por Canetti y colaboradores se basa en comparar el número de colonias desarrolladas en medio con diferentes diluciones de drogas anti-TB con las desarrolladas en medios sin droga, el resultado se interpreta por la proporción de colonias capaces de crecer en presencia de la droga (Canetti, Rist, & Grosset, 1963).

2.1.6.2 Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS).

Es un método fenotípico rápido de tamizaje que se realiza a partir de muestras de esputo que permite diagnosticar de manera simultánea la presencia de MTB y la resistencia a Isoniacida y Rifampicina (drogas de primera línea) (Caviedes et al., 2000), este método se basa en sembrar esputo descontaminado en microplacas que contienen caldo Middlebrook 7H9 lo cual permite que MTB tenga un crecimiento muy rápido en comparación con medios solidos; además permite identificar la morfología de los cordones de MTB con ayuda de un microscopio de luz invertido (Ministerio de Salud, 2013).

2.1.6.3 BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc.).

Es un método de cultivo fenotípico automatizado de diagnóstico y sensibilidad a drogas de primera línea (Isoniacida, Rifampicina, Estreptomycin, Etambutol y Pirazinamida) (Ministerio de Salud, 2013). El resultado es obtenido entre 4 a 12 días, mucho más rápido que el método de las proporciones; pero tiene un costo más elevado. Bactec 960 es un método no radioactivo lo cual lo hace más seguro para el personal de laboratorio, en comparación con Bactec 460 (Tortoli, Benedetti, Fontanelli, & Simonetti, 2002).

Esta metodología se basa en un sistema automatizado *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) que tiene una propiedad fluorescente de un compuesto sensible al oxígeno que se encuentra contenido en un tampón de silicona ubicado en el fondo del tubo que contiene caldo Middlebrook 7H9. Este tubo tiene oxígeno disuelto en el medio lo cual extingue la fluorescencia, de tal forma, que la remoción del oxígeno producto del metabolismo de las micobacterias permite la manifestación de fluorescencia cuando el tubo es expuesto a un transiluminador de luz ultravioleta con un $\lambda=365$ nm. Entonces cuando se emplean drogas anti-TB capaces de inhibir el

crecimiento de MTB se ve imposibilitada la manifestación de fluorescencia (Sanders, Nieda, & Desmond, 2004).

2.1.6.4 Genexpert MTB/RIF.

Esta metodología consiste en identificar todas las mutaciones de resistencia a RIF en el gen *rpoB* del genoma de MTB en tiempo real usando sondas fluorescentes llamados balizas moleculares. El Genexpert MTB/RIF detecta secuencias de ADN específicas para MTB y resistencia a la RIF por PCR (Van Rie, Page-Shipp, Scott, Sanne, & Stevens, 2010) (Helb et. al., 2010).

2.1.6.5 Genotype MTBDRplus.

La prueba Genotype®MDR-TBPlus es una metodología que se realiza tanto de forma directa como indirecta, que detecta mutaciones asociadas a isoniacida y rifampicina a partir de una muestra de esputo con baciloscopia positiva o cultivos (Ministerio de Salud, 2013), esta metodología es realizada con tiras reactivas de nitrocelulosa (tecnología DNA Strip), que contienen regiones parciales de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* fijadas sobre ella. La prueba está basada en un PCR multiplex que genera múltiples productos de amplificación (sondas) los cuales, mediante una hibridación reversa, reconocen las mutaciones génicas más frecuentes asociadas con la resistencia a rifampicina e isoniacida (Hillemann, Rüsç-Gerdes, & Richter, 2007).

2.1.6.6 Método de las proporciones agar en placa (APP).

El método de proporciones agar en placa permite determinar la proporción de mutantes resistentes en una población de MTB a una determinada droga anti-TB (Asencios, Salinas, Quispe, Leo, & Salazar, 2015). Este método consiste en inocular cantidades iguales de varias

diluciones de un inóculo estandarizado en los cuadrantes de la placa que contengan medio Middlebrook 7H10 con y sin la droga de prueba, se deben observar colonias contables separadas en un cuadrante de control sin ninguna droga; el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que crecen en el medio que contiene la droga en comparación con las que crecen en el medio libre de drogas se determina y expresa como un porcentaje. Para cepas de MTB en las cuales el crecimiento de los cuadrantes que contienen droga representa más del 1% del número de colonias que se desarrollan en cuadrantes libres de drogas se consideran resistentes a la droga anti-TB probada (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

Durante varias décadas, el método de proporción utilizando Middlebrook 7H10 o 7H11 agar se ha considerado el método Gold Standard (World Health Organization, 2012).

2.2 Definición de Términos

2.2.1 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Es la concentración más baja de una droga anti-TB que impide el crecimiento de más del 99% de un microorganismo en un sólido prueba de susceptibilidad medio o caldo de dilución (World Health Organization, 2018).

2.2.2 Concentración Crítica (CC).

La concentración crítica de una droga anti-TB se ha adoptado y modificado a partir de convención internacional. La concentración crítica se define como la concentración más baja de un agente anti-TB in vitro que inhibirá el crecimiento de 99% de las cepas de tipo fenotípicamente salvaje de complejo de *M. tuberculosis* (World Health Organization, 2018).

2.2.3 Potencia.

Para el uso de las drogas anti-TB se realizan ensayos para determinar las unidades estándar de actividad o potencia.

Estas unidades de ensayo pueden variar ampliamente a partir de peso real del polvo, estos a menudo difieren entre lotes de producción. Es por eso que los laboratorios deben estandarizar las soluciones de drogas anti-TB basadas en ensayos de los lotes de polvo que están siendo utilizados. Existen tres puntos de consideración que se deben de tener en cuenta para la determinación de la potencia de una droga:

- Medidas de pureza (por lo general mediante ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento)
- Contenido de agua (por ejemplo, por análisis de Karl Fischer o por la pérdida de peso en el secado)
- Fracción de Sal (si el compuesto se suministra como una sal en lugar de ácido o base libre)
- La potencia puede ser expresada como un porcentaje, o en unidades de microgramos por miligramos (w / w) (World Health Organization, 2018).

2.2.4 7H9.

Caldo Middlebrook 7H9 es un medio de crecimiento líquido, especialmente para el cultivo de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Summers & Snyder, 2006).

2.2.5 7H10.

Agar Middlebrook 7H10 es un medio sólido especialmente utilizado para el cultivo de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Summers & Snyder, 2006).

2.2.6 ADC.

Suplemento de enriquecimiento del medio líquido Middlebrook 7H9, este suplemento contiene Albúmina, Dextrosa y Catalasa (Yamane, Nakasone, Yamashita, Toyoda, & Okazawa, 1998).

2.2.7 OADC.

Suplemento de enriquecimiento del medio sólido Middlebrook 7H10, este suplemento contiene Ácido Oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa (Yamane, Nakasone, Yamashita, Toyoda, & Okazawa, 1998).

2.2.8 CSB.

Las Cabinas de Bioseguridad (CBS) están diseñadas para proteger al trabajador, al ambiente y al propio material, siempre que se utilicen en las condiciones adecuadas (si no es así, incluso pueden ser contraproducentes). La protección brindada por estas se basa en las barreras o cortinas de aire en flujo laminar, generadas mediante un sistema impulsor, y en el paso del aire circulante a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Airborne) (World Health Organization, 2004).

2.2.9 ECOFF.

Son medidas de una distribución de MIC de medicamentos que separan las poblaciones bacterianas en aquellas representativas de una población de tipo salvaje y aquellas con resistencia adquirida o mutacional al medicamento (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018).

Por consiguiente, diagnóstico de laboratorio para Moxifloxacino es necesario para el tratamiento de un paciente con TB ya que es la FQ más importante de este grupo de drogas, que

presentan una potente actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas aerobias y facultativas, además presenta un buen perfil farmacocinética; es decir una buena absorción oral y buen efecto post-antibiótico y un perfil de toxicidad favorable cuando se administran por vía oral (Alós, 2003). En este sentido la presente investigación se basa en obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la que la droga moxifloxacino puede inhibir el crecimiento de las cepas de MTB, así como validar la utilización de esta droga en el método de referencia nacional proporciones agar en placas que se viene utilizando el LRNM.

III. Método

3.1 Tipo de Investigación

En este proyecto se identificó la concentración mínima inhibitoria a la que Moxifloxacino inhibió el crecimiento de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes utilizando el método de susceptibilidad proporción agar en placas. El estudio fue de tipo prospectivo, transversal y observacional porque se reunieron datos en un tiempo determinado y descriptivo, ya que los datos se recogieron a medida que iban sucediendo.

3.2 Ámbito temporal y espacial

Se utilizaron cepas de *M. tuberculosis* con diferentes patrones de resistencia a drogas antituberculosis, la selección de las cepas fue por conveniencia entre los años 2014 y 2015, estas cepas fueron obtenidas del banco de cepas del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud que se encuentra en el distrito de Chorrillos, Lima-Perú.

3.3 Variable

3.3.1 Variable Independiente:

- **Concentraciones de MOX trabajadas:** 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1.0 µg/ml, 2.0 µg/mL, 4.0 µg/mL.

3.3.2 Variables Dependientes:

- **TB MDR:** resistente a isoniacida (INH) y resistente a rifampicina (RIF).
- **TB XDR:** MDR, resistente a una fluoroquinolona y a un inyectable de segunda línea.
- **TB Sensible:** cepas sensibles a todas las drogas.
- **Susceptibilidad a MOX:** resultado sensible o resistente.

3.4 Población y muestra

El estudio se realizó a partir de las cepas criopreservadas y almacenadas en el banco de cepas del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias y que cumplían con los criterios establecidos para el protocolo.

- Cepas de *M. tuberculosis* de pacientes nuevos que nunca recibieron tratamiento y sensibles a todas las drogas.
- Cepas de *M. tuberculosis* de pacientes TB-MDR.
- Cepas de *M. tuberculosis* de pacientes TB-XDR.

Adicionalmente se utilizaron MTB H37Rv (ATCC 27294) y *M. avium* como control positivo y negativo, respectivamente.

3.5 Instrumentos

- Cabina de flujo laminar
- Coagulador
- Potenciómetro
- Probeta de 1Lt, 500mL y 100mL
- Micropipetas de 1000 μ L y 100 μ L
- Tips para micropipetas de 1000 μ L y 100 μ L
- Pipetas de 10mL, 5mL y 1mL.
- Matraz Erlenmeyer de 1Lt.
- Balanza digital
- Dispensador
- Baño María
- Autoclave

- Estufa
- Incubadora
- Gasa estéril
- Placas Petri con cuatro cuadrantes
- Tubos de ensayo de 16 x 125mm
- Tubos de ensayo de 20 x 125mm
- Tubos de ensayo de 20 x 150mm
- Tubos de polipropileno de 16 x 125mm
- Cabina de bioseguridad
- Bolsas de polipropileno transparente
- Pipetas de transferencia
- Microespátulas de acero
- Bandejas inclinada
- Gradillas
- Agitador (vortex)
- Densitómetro / Escala Mc Farland
- Bolsas de polipropileno transparente
- Cilindros de metal
- Estereoscopio
- Hojas de trabajo (Anexo 6)

3.5.1 Preparación de los Materiales

3.5.1.1 Caldo Middlebrook 7H9.

Se pesó 4.7g de medio Middlebrook 7H9 y se colocó en un matraz con 900mL de agua destilada, se le adicionó 2mL de glicerina y se mezcló hasta que se disolviera completamente, luego se llevó a la autoclave a una temperatura (T°) de 121°C durante 10 minutos; se dejó enfriar al medio ambiente y se añadió asépticamente 100mL de ADC y se ajustó su pH a 6.6, una vez ajustado el pH se procedió a dispensar en tubos estériles de polipropileno de 16x125mm de tapa rosca, 5mL por tubo (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.5.1.2 Medio Löwenstein Jensen (L-J).

Primero se preparan las sales: se pesaron 2.4g de Fosfato Mono potásico KH_2PO_4 , 0.24g de Sulfato de Magnesio, 0.6g de Citrato de Magnesio, 3.6g de L-Asparagina y se disolvieron en 300mL de agua destilada en un matraz, se calentó en Baño María hasta su completa disolución, una vez disuelto se enrazó a 600mL con agua destilada; Después se le adicionó 12mL de glicerina y se esterilizó en Baño María por 30 minutos (min.) a 100°C ; Paralelamente se limpiaron huevos con algodón embebido en alcohol de 70% y se dejaron secar, luego se rompieron uno por uno vertiendo su contenido sobre un Beaker y se mezclaron con ayuda de una batidora, una vez mezclado se filtró 1000mL utilizando gasa estéril de 4 capas y se mezcló con las sales previamente preparadas, luego se adicionó verde de malaquita al 2% y se mezcló suavemente con movimientos circulares, se dejó reposar el medio durante 30min tapado con una franela oscura para protegerlo de la luz y se procedió a dispensar 6.5mL en tubos de 20x125mm y 7.5mL en tubos de 20x150mm (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.5.1.3 Solución Salina Tween.

Se pesó 17.0g de NaCl y se disolvió en un matraz con 2000mL de agua destilada, se añadió 2.0mL de Tween 80, se mezcló completamente (se observó lechoso) y se llevó a auto clavar por 20 min. a T° de 121°C; después se dispensó en tubos estériles de 16x125mm con tapa rosca, 4.5mL por tubo (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.5.1.4 Concentraciones de la Moxifloxacin.

La droga utilizada para la preparación de las concentraciones de trabajo fue *Moxifloxacin hydrochloride*, de la marca Molekula la cual tuvo una pureza del 99.2%.

Se calculó el peso exacto de la droga a utilizar para una determinada concentración a partir de su pureza. (Anexo 1)

Una vez calculado el peso se preparó la solución madre con 80.65mg de la droga en su versión original diluida en 10mL de agua destilada estéril, esta solución tuvo una concentración denominada C: 8 mg/mL (8000µg/mL).

Luego se realizó una dilución 1/10 a partir de la concentración C para llegar a la concentración A: 800µg/mL.

Después a partir de la concentración A se realizó otra dilución 1/2 para llegar a una concentración de trabajo B: 400µg/mL. (Anexo 2)

De igual manera después se hicieron diluciones seriadas para llegar a las concentraciones de trabajo:

- 4.0 µg/mL
- 2.0 µg/mL

- $\mu\text{g/mL}$
- 0.5 $\mu\text{g/mL}$
- 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo 3)

3.5.1.5 Preparación de agar en placa.

Se pesó 7.6mL de medio Middlebrook 7H10 Agar Base y se diluyó en 360mL de agua destilada, se agregó 2mL de glicerol y se llevó a autoclavar por 10 min. a T° de 121°C. Luego se dejó enfriar el medio por 15 minutos y se le adicionó 20mL de suplemento OADC.

Para cada cuadrante (placa con cuatro cuadrantes) se preparó un lote de medio 7H10 Agar Base con las concentraciones correspondientes (4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 $\mu\text{g/mL}$). (**Anexo 4**)

Se dispensó 4.5mL de medio 7H10 Agar Base en cada cuadrante con las concentraciones establecidas.

Se hicieron dos placas de agar de cuatro cuadrantes por cada cultivo. Cinco cuadrantes fueron inoculados con diluciones seriadas de MOX. Tres cuadrantes fueron los controles sin drogas, las cuales correspondieron a las diluciones 0, -2 y -4. (Anexo 5)

Por otro lado, se incluyeron controles de preparación de drogas (H37Rv ATCC 27294)

3.6 Procedimientos

3.6.1 Reactivación de las cepas criopreservadas.

Se trasvasó el contenido de las cepas de *M. tuberculosis* criopreservadas a los tubos con medio Middlebrook 7H9 correctamente codificados (uno por cepa) con ayuda de una pipeta de transferencia y se colocaron en la incubadora de 5 a 7 días a T° de 37 °C (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.6.2 Sembrado de Löwenstein Jensen (L-J).

Se sembraron 0.2mL de los caldos Middlebrook 7H9 previamente inoculados en 2 tubos que contienen medio Löwenstein Jensen cada uno y se dejó incubar durante 21 días a una T° de 37°C (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.6.3 Siembra en caldo Middlebrook 7H9.

Se rotularon los tubos de caldo Middlebrook 7H9 con el código de la cepa a inocular; utilizando una microespátula, se extrajeron colonias del medio L-J previamente reactivado y se transfirieron a los tubos de caldo Middlebrook 7H9 codificados, con ayuda de la microespátula se maceró cuidadosamente las colonias en la pared interna del tubo y se homogenizó el contenido. Luego se cerró la tapa del tubo herméticamente y se colocaron los tubos codificados en una gradilla correctamente rotulada con fecha de inoculación y se dejó en la incubadora por 7 días a T° de 37°C (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.6.4 Siembra en placas Middlebrook 7H10.

Se sacaron de la incubadora los tubos de cultivo en medio líquido Middlebrook 7H9 y se colocaron dentro de la cabina de bioseguridad (CSB) luego se agitaron los tubos por 30 segundos para homogenizar el contenido y se dejó reposar durante 12 minutos para que sedimente sus partículas gruesas y disminuyan los aerosoles, utilizando una pipeta de transferencia se trasvasó el sobrenadante a un tubo de solución salina Tween y se estandarizó la suspensión bacteriana comparando con la escala patrón Mc Farland 0.5; luego se colocaron en una gradilla 4 tubos con solución salina Tween para realizar las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 2 tubos con medio Löwenstein Jensen rotulados con el código de la cepa. Después con ayuda de una pipeta serológica estéril de 1mL se pipeteó 0.5mL de la solución estandarizada y se trasvasó al primer tubo de solución salina Tween (dilución 10^{-1}), con otra pipeta serológica estéril se realizaron

movimientos circulares para obtener una mezcla homogénea y se prosiguió con las diluciones trasvasando 0.5mL del primer tubo al segundo y así sucesivamente hasta el cuarto tubo (10^{-4}), seguidamente se sembró 0.2mL de la suspensión sin diluir en los 2 tubos con medio L-J codificados, bañando por completo la superficie del medio y se colocó en una bandeja inclinada con las tapas de los tubos sembrados ligeramente flojas y se pusieron a incubar a 37°C por 21 días. Luego se rotularon las placas con medio Middlebrook 7H10 con el código de la cepa, con una micropipeta se procedió a sembrar la “placa control” empezando con la dilución más alta 10^{-4} , se sembraron 3 gotas equidistantes ($100\mu\text{L}$) de la dilución 10^{-4} en el cuadrante control -4, con el mismo tip se continuó la siembra de la dilución 10^{-2} en los cuadrantes control -2, Mox 0.25, Mox 0.5, Mox 1.0, Mox 2.0 y Mox 4.0 de la segunda placa correspondiente, se terminó la siembra con la suspensión sin diluir en el cuadrante control 0 de la placa control. Las placas sembradas se dejaron secar dentro de la CSB en funcionamiento y con la luz apagada durante 2 horas, luego se colocaron cuidadosamente cada placa dentro de una bolsa de polipropileno transparente y se sellaron, una vez selladas las placas se colocaron de forma ordenada en cilindros de metal previamente limpiados y desinfectados con alcohol al 70% luego se rotuló cada cilindro anotando:

- Fecha de siembra en placa
- Fecha para voltear las placas
- Fecha de lectura
- Iniciales del analista

Después se colocaron los cilindros en la incubadora a 37°C , pasados 5 días se retiraron los cilindros de la incubadora y se sacaron las placas y se revisaron si existió contaminación, además se voltearon las placas para eliminar liquido de condensación, luego se devolvieron las placas a

los cilindros y se volvió a incubar a 37°C hasta completar los 21 días (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.6.5 Lectura de las placas.

Se sacaron los cilindros de la incubadora y se colocaron las placas sobre la mesa de trabajo para iniciar la lectura con ayuda de un estereoscopio, se observó el crecimiento de las cepas en los cuadrantes de cada placa y se anotó en la hoja de trabajo (**Anexo 6**) los resultados de las lecturas de cada cuadrante durante la lectura se tuvieron presente los siguientes criterios:

La placa control en la dilución 10^{-2} debe tener crecimiento entre 100 a 200 colonias contables. Si se observa menos de 100 colonias, se repite la prueba, porque puede dar resultado de falso sensible.

Si en placa control 10^{-2} , se observa crecimiento mayor a 200 colonias (o confluyente), la prueba es aceptada solamente cuando la cepa es sensible para todas las concentraciones. Si se observa resistencia a una o más concentraciones, la prueba se repite.

En la placa control dilución 10^{-4} , debe tener crecimiento menor o igual a 50 colonias para que la prueba sea válida.

Si en la placa control dilución 10^{-4} , se observa mayor de 50 colonias, repetir la prueba. La prueba no se repitió por el desarrollo de micro-colonias (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.6.6 Cálculos.

Para hallar la sensibilidad o resistencia de la cepa, se determinó la proporción para cada concentración utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ Colonias en un Cuadrante con Droga}}{N^{\circ} \text{ de Colonias en Placa Control Dilución } 10^{-2}} \times 100 = \% \text{ Resistencia}$$

3.6.7 Informe de Resultados.

Los resultados de registraron en las hojas de trabajo impresas de manera física y en las hojas Excel de manera virtual según se fueron dando las lecturas.

3.6.8 Interpretación de Resultados.

Si la proporción del crecimiento de colonias en el medio que contenía droga fue mayor al 1%. El resultado, se informó como **resistente**.

Si la proporción del crecimiento de colonias en el medio que contenía droga fue menor de 1%. El resultado, se informó como **sensible** (Quispe, Leo, & Salazar, 2015).

3.7 Análisis de datos

La información obtenida fue registrada en hojas de trabajo (ANEXO 6) de manera física y en hojas de Microsoft Excel de manera virtual. Una vez completa la base de datos se procedió a analizar mediante el programa SPSS versión 17.0 con la finalidad de realizar los análisis estadísticos.

IV. Resultados

4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Los resultados fueron obtenidos de acuerdo a los grupos de muestras; se analizaron 120 cepas de las cuales 40 fueron sensibles, 40 TB-MDR y 40 TB-XDR, en este último caso clasificado por la resistencia a levofloxacino. A continuación, se muestra el detalle de los resultados obtenidos:

En este estudio, se determinó las MIC de MOX para 120 aislados clínicos utilizando el método proporciones agar en placa.

La totalidad del grupo 1 que correspondían a los aislados probablemente susceptibles (40/40, 100%) que incluyeron muestras de pacientes nuevos tuvieron una MIC de ≤ 0.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Fig. 1 y tabla 1).

Las MIC para MOX para el grupo 2, que incluían “cepas probablemente resistentes” con perfil resistente a LEV, oscilaron entre 1,0 y 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

La MIC del 87% de las cepas resistentes (35/40) en el grupo 2 fue ≥ 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$, mientras que el 13% (5/40) tenía una MIC de 1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Fig. 1 y Tabla 2).

Además, todas las cepas (100%, 13/13) del grupo 3 que corresponden a los aislados susceptibles a la LEV probados previamente mostraron una MIC de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La MIC para MOX para el 63% (17/27) de las cepas resistentes a la LEV en el grupo 4 fue ≥ 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el 37% (10/27) de las cepas resistentes a la LEV tuvo una MIC de 1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Fig. 1 y Tabla 2).

En general, la MIC de todas las cepas susceptibles que incluyen probables cepas sensibles y cepas sensibles a LEV (grupo 1 + 3) fue de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (53/53, 100%).

Por otro lado, la MIC de todas las cepas resistentes que incluyen probables cepas resistentes y cepas resistentes a la LEV (grupo 2 y 4) fue $\geq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$ para el 77% de las cepas (52/67) mientras que el 23% de las cepas (15/67) tenía una MIC de $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ (Fig. 1 y Tabla 3).

Tabla 1

Concentración mínima inhibitoria de Moxifloxacino ($\mu\text{g}/\text{mL}$) según perfiles de resistencia de los aislamientos clínicos de Mycobacterium tuberculosis que ingresaron al estudio.

Perfiles de resistencia	MIC MOX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						Total
	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	>4.0	
Sensibles	53						53
XDR			5	10	19	6	40
PRE XDR			10	6	8	3	27
TOTAL	53		15	16	27	9	120

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 2

Concentración mínima inhibitoria de Moxifloxacino ($\mu\text{g}/\text{mL}$) según grupos de los aislamientos clínicos de Mycobacterium tuberculosis que ingresaron al estudio.

Grupo	MIC MOX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						Total
	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	>4.0	
1	40						40
2			5	10	19	6	40
3	13						13
4			10	6	8	3	27
TOTAL	53		15	16	27	9	120

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 3
Distribución de la MIC en aislados clínicos utilizados en el estudio

Perfil de Cepas	Numero de cepas	Rango de MIC y porcentaje de cepas
Grupo 1: Cepas probablemente sensibles (pacientes nunca tratados)	40	$\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ 0.25 (100%)
Grupo 2: Cepas probablemente resistentes (con perfil resistente a levofloxacino)	40	1.0 - >4.0 $\mu\text{g/mL}$ 1.0 (13%) 2.0 (25%) 4.0 (47%) >4.0 (15%)
Grupo 3: Cepas sensibles a Levofloxacino (con perfil TB-MDR)	13	$\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ 0.25 (100%)
Grupo 4: Cepas resistentes a Levofloxacino (con perfil TB pre XDR)	27	1.0 - >4.0 $\mu\text{g/mL}$ 1.0 (37%) 2.0 (22%) 4.0 (30%) > 4.0 (11%)
Grupo 1 + Grupo 3: Total de cepas sensibles	53	$\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ 0.25 (100%)
Grupo 2 + Grupo 4: Total de cepas resistentes	67	1.0 - >4.0 $\mu\text{g/mL}$ 1.0 (22%) 2.0 (24%) 4.0 (40%) >4.0 (14%)

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

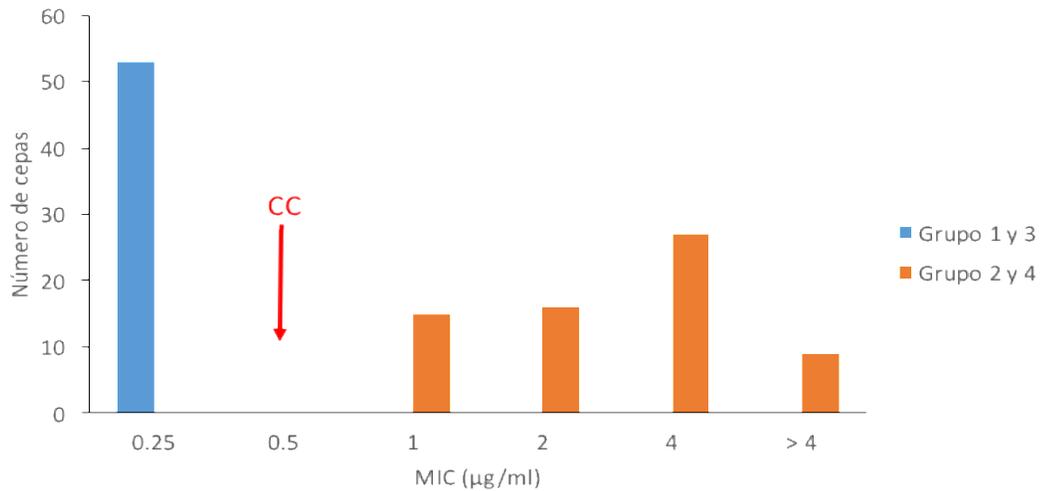


Figura 1. Resultados de las MICs a Moxifloxacino de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* por el método Proporciones Agar en Placa (Fuente: Elaboración propia)

4.2 Comparación de la Actividad Antimicrobiana de Moxifloxacino

Se comparó la actividad antimicrobiana *in vitro* de Moxifloxacino utilizando el método de proporciones agar en placa en cepas de *M. tuberculosis* con patrones de resistencia definido aisladas de pacientes con TB sensible, TB MDR y TB XDR.

4.2.1 Comparación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de Moxifloxacino (0.5 μg/mL) en cepas con perfil de resistencia TB sensible.

Se obtuvo 100% (40/40) de concordancia para la definición de casos de TB sensible

Tabla 4

Comparación de la actividad antimicrobiana en cepas de TB sensible frente a Moxifloxacino

Cepas TB- Sensibles		LEV		
		1.0 µg/mL		
		R	S	
MOX	0.5 µg/mL	R	0	0
		S	0	40

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

4.2.2 Comparación de la actividad antimicrobiana in vitro de Moxifloxacino (0.5 µg/mL)

en cepas con perfil de resistencia TB-MDR (LEV 1.0 µg/mL).

Se obtuvo 100% (4/40) de concordancia para la definición de casos de TB MDR.

Tabla 5

Comparación de la actividad antimicrobiana en cepas de TB-MDR frente a Moxifloxacino

Cepas TB-MDR				LEV	
				1.0 µg/mL	
				R	S
MOX	0.5 µg/mL	PRE- XDR	R	27	0
			S	0	0
		MDR	R	0	0
			S	0	13

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

4.2.3 Comparación de la actividad antimicrobiana in vitro de Moxifloxacino (0.5 µg/mL)

en cepas con perfil de resistencia TB-MDR (LEV 1.0 µg/mL).

Se obtuvo 100% (40/40) de concordancia para la definición de casos de TB XDR

Tabla 6

Comparación de la actividad antimicrobiana en cepas de TB-XDR frente a Moxifloxacino

CEPAS TB-XDR		LEV		
		1.0 µg/mL		
		R	S	
MOX	0.5 µg/mL	R	40	0
		S	0	0

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

4.3 Evaluación de los Parámetros de Sensibilidad, Especialidad, Precisión y Reproducibilidad

Se determinó la sensibilidad y especificidad de la MIC_{Mox} 0.5 µg/mL respecto a MIC_{Lev} 1.0 µg/mL, dada la recomendación de la OMS de utilizar estas concentraciones:

La sensibilidad encontrada fue de 100% (67/67 cepas con MIC_{Lev} >1.0 µg/mL tienen una MIC_{Mox} >0.5 µg/mL) y la especificidad fue de 100% (53/53 cepas con MIC_{Lev} >1.0 µg/mL tienen una MIC_{Mox} >0.5 µg/mL)

Tabla 7

Determinación de los parámetros de sensibilidad y especificidad de Moxifloxacino 0.5 µg/mL respecto a Levofloxacino.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD		LEV 1.0µg/mL	
		R	S
MOX 0.5 µg/mL	R	67	0
	S	0	53

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

Se analizaron 120 cepas de MTB y cada una de ellas fue procesada por triplicado (360 ensayos) por el método APP con la finalidad de evaluar la precisión y reproducibilidad. Los resultados de precisión encontrados fueron de 91.4% (329/360) y la reproducibilidad encontrada fue de 100%.

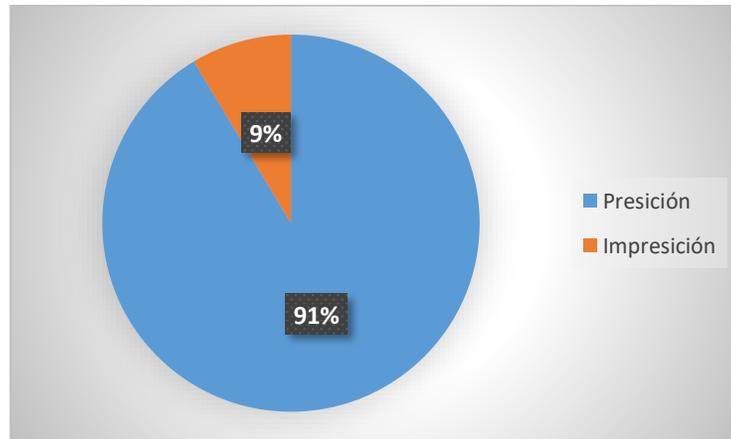


Figura 2. Precisión de la prueba de susceptibilidad a Moxifloxacino en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes (Fuente: Elaboración propia)

V. Discusión de Resultados

Esta investigación tuvo como propósito validar la prueba de susceptibilidad a Moxifloxacino utilizando el método de proporciones agar en placa en cepas de MTB aisladas de pacientes. Los resultados evidenciaron una marcada inhibición del crecimiento de las cepas con distintos perfiles de crecimiento (TB-sensible, TB-MDR y TB-XDR) a la concentración evaluada de 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

La MIC (concentración mínima inhibitoria), concentración más baja de una droga que impide el crecimiento visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011). Se determinó mediante la prueba de susceptibilidad fenotípica APP, para ello nuestras cepas de MTB fueron sometidas a distintas concentraciones, lo cual permitieron evidenciar las MIC de moxifloxacino (MIC_{Mox}). La guía CLSI M24-A2 y el Informe Técnico sobre las Concentraciones Críticas para las Pruebas de Susceptibilidad a las Drogas utilizadas en el tratamiento de la Tuberculosis Resistente (World Health Organization, 2018) recomiendan que para la determinación de la susceptibilidad de MTB se debe utilizar una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ como concentración crítica (CC) y 2.0 $\mu\text{g/mL}$ como punto de interrupción clínica (CB) en medio Middlebrook 7H10 para Moxifloxacino, en este estudio la OMS comparó los datos de CC y CB para diferenciar mutaciones de alto y bajo nivel. (World Health Organization, 2018).

Las concentraciones de MIC_{Mox} fueron variando de acuerdo a los patrones de resistencia de las cepas de MTB, en las cepas TB-sensibles tuvieron unas MIC_{Mox} bajas y no hubo variación alguna a diferencia de las cepas TB- MDR y TB-XDR que tuvieron un rango de $1.0\mu\text{g/mL} \leq \text{MIC}_{\text{Mox}} \leq 4\mu\text{g/mL}$; estas variaciones también se pudieron observar en el estudio realizado por Pholwat & col. en donde reportaron una variación en cuanto a sus resultados de MIC para

fluoroquinolonas, ellos argumentaron que la gran variación en sus MICs se debe a que las FQ inhiben el DNA girasa y de este modo detienen la replicación del DNA directamente, a diferencia de otras drogas anti-TB que inhiben el DNA indirectamente, además del hecho de que existen cepas de MTB que pueden desarrollarse preferentemente en medio que contengan concentraciones supra-fisiológicas de fármaco (Pholwat, Heysell, Stroup, Foongladda, & Houpt, 2011).

De los resultados obtenidos las cepas probablemente sensibles analizadas (grupo 1 y 3) presentaron una $MIC_{Mox} \leq 0.25 \mu\text{g/mL}$, estos resultados concuerdan con estudios realizados anteriormente por Sirgel, en donde se reportó que la MIC_{Mox} variaron entre ≤ 0.125 a 0.25 (Sirgel et al., 2012), además los estudios de Angeby y Willby demostraron que la MIC_{Mox} más alta que había llegado alcanzar una cepa TB sensible fue $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ (Angeby et al., 2010) (Willby, Sikes, Malik, Metchock, & Posey, 2015), otro estudio realizado por Van Ingen describe una $MIC_{Mox} 0.5 \mu\text{g/mL}$ para cepas sin mutaciones GyrA y que las cepas de MTB que presenten $MIC_{Mox} \geq 2.0 \mu\text{g/mL}$ utilizando la metodología APP deben ser considerados como susceptibles (Van Ingen et al., 2010). Sin embargo nuestros resultados no concuerdan con los estudios previamente realizados por Piersimoni que presentaron una MIC_{Mox} para cepas TB-sensibles de $0.5 \mu\text{g/mL}$, esto se debe porque el criterio de inclusión en nuestro estudio para cepas TB-sensibles fue de pacientes nuevos que no recibieron tratamiento anteriormente (pan-sensibles) a diferencia del estudio de Piersimoni (Piersimoni et al., 2007); Además observó que nuestro MIC_{Mox} fue consistentemente menor para los actuales estándares de la OMS (World Health Organization, 2018) (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2011).

La MIC_{Mox} para las cepas probablemente resistentes (grupo 2 y 4) oscilaban entre $1.0\mu\text{g/mL}$ a $4.0\mu\text{g/mL}$, este resultado concuerda con los estudios previos realizados en cepas con mutaciones

en la región GyrA que reportaron una MIC_{Mox} 2.0 µg/mL (Piersimoni et al., 2007). En este mismo estudio Piersimoni clasifica algunas cepas TB-MDR como Moxifloxacino resistentes (siempre y cuando no exista resistencia cruzada con dogas de primera línea) y en su base de datos se observa que presentan una MIC_{Mox} que varía a partir de 1.0µg/mL en adelante, en nuestro estudio sucede algo similar con las cepas TB-MDR con resistencia a Levofloxacino (pre-XDR), estas cepas presentan una MIC_{Mox} a partir de 1.0 µg/mL en adelante. Los análisis realizados por Sirgel también concuerdan con nuestros datos, dicho estudio concluye que las cepas de MTB con alteraciones genéticas presentan una MIC_{Mox} \geq 2.0µg/mL. (Sirgel et al., 2012)

Por otra parte, el estudio de Van Ingen determinó que las cepas de MTB que presenten mutación en el gen GyrA no presentaron ni falsos positivos ni falsos negativos y que utilizando la metodología APP presentaron una MIC_{Mox} \geq 0.5 µg/mL, lo cual concuerda con nuestros resultados, pero discrepa con el estudio de Sirgel debido a que sus resultados muestran que las cepas de MTB con alteraciones genéticas presentaron una MIC_{Mox} \geq 2.0 µg/mL y determinaron que las cepas con MIC_{Mox} entre 2.0 µg/mL y 10.0 µg/mL deben considerarse como susceptibilidad intermedia y que a partir de una MIC_{Mox} 10.0 µg/mL recién deben considerarse resistentes (Van Ingen et al., 2010) (Sirgel et al., 2012).

Con respecto a la variabilidad de las MICs determinadas en este estudio, existe evidencia de que varias mutaciones puntuales en la subunidad A de la DNA girasa (GyrA), tiene diferentes efectos en la resistencia temprana y tardía a fluoroquinolonas, nuestros datos apoyan esta conclusión debido a que las concentraciones varían de acuerdo a los perfiles detectados mediante secuenciamiento, además estas mutaciones se asociaron con una MIC mayor (Farhat et al., 2016), de igual manera los datos del estudio de Sirgel proporcionan evidencia de que la susceptibilidad a Moxifloxacino disminuyó en los aislados de MTB esto se puede producir a

partir de cualquiera de las mutaciones en GyrA y esto concuerda con los valores elevados de MIC_{Mox} determinados en las cepas que presentan mutación en la región GyrA confirmadas por secuenciamiento (Sirgel et al., 2012). Otros estudios propusieron que por la variabilidad encontrada asociada a las mutaciones se designe un segundo punto de interrupción para la resistencia a Moxifloxacino, para determinar un bajo nivel 0.5µg/mL y alto nivel 2.0µg/mL (Willby, Sikes, Malik, Metchock, & Posey, 2015), en la actualidad estas concentraciones ya fueron oficializadas y recomendadas por la Organización Mundial de Salud.

Sin embargo al comparar las MICs de Moxifloxacino con las MICs de Levofloxacino, podemos observar que Mox presenta los valores más bajos de MICs en el grupo de las fluoroquinolonas, puesto que es considerablemente menor que Levofloxacino (1.0µg/mL), que presenta niveles eficaces de PK/PD (PK: fármaco cinético, PD: fármaco dinámico) y que las MIC_{Mox} para el método APP pueden variar (Angeby et al., 2010).

La concentración 0.5 µg/µL permitió a Piersimoni una separación clara entre las cepas susceptibles y resistentes a Moxifloxacino, cuando se prueba por todos los métodos estudiados, en nuestro estudio el método estudiado fue el APP y la concentración 0.5µg/mL también nos permitió marcar una diferencia entre las cepas sensibles y resistentes, esta concentración actúa como una Concentración Crítica y confirma lo recomendado por la OMS (World Health Organization, 2018) y el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011) (Piersimoni et al., 2007), de igual manera en los estudios de Van Ingen esta concentración fue tomada como punto de interrupción tras realizar comparaciones entre los métodos fenotípicos y genotípicos (Van Ingen et al., 2010).

La precisión del método de proporciones agar en placa en este estudio fue de 91,4% este resultado fue muy similar al estudio realizado por Pholwat, ellos obtuvieron en sus ensayos

realizados una precisión de 89% a 100 % para las drogas utilizadas; sin embargo, ellos afirmaron que la fiabilidad de esta prueba de susceptibilidad a fármacos de segunda línea y sus concentraciones críticas aprobadas aún son cuestionadas (Pholwat, Heysell, Stroup, Foongladda, & Houpt, 2011).

Para determinar los valores de reproducibilidad en nuestro estudio se hicieron tres repeticiones por separado y con diferentes analistas de nuestras cepas analizadas a diferencia del estudio de Sirgel que enviaron algunas cepas a la Universidad de Zurich (para tener resultados por duplicados) (Sirgel et al., 2012).

En el estudio de Sirgel se utilizaron cepas de referencia H37Rv, ATCC 27294 (MTB sensibles a todas drogas) para fines de control de calidad, estas cepas se incluyeron como control, esta misma cepa de MTB se incluyó en nuestro estudio en cada corrida de muestras con sus repeticiones correspondientes (Sirgel et al., 2012), dadas las complejidades de la pruebas de susceptibilidad, estas subrayan la necesidad de los refuerzos de control de calidad tanto internos como externos, el uso de cepas control es preferible para asegurar la reproducibilidad de los laboratorios (Van Ingen et al., 2010).

En este trabajo se evidencio que existe una fuerte correlación entre la resistencia a fluoroquinolonas y la resistencia a drogas de primera línea, en el trabajo realizado por Wang & col. en 2007 (Wang et al., 2007), también existe esta misma correlación más aun en las cepas TB-MDR y TB-XDR debido a su potente actividad *in vivo* e *in vitro* así como su excelente historial de seguridad en la terapia a largo plazo (Miyazaki, Miyazaki, Chen, Chaisson. & Bishai, 1999) ya que las fluoroquinolonas son utilizadas en los tratamientos de TB resistentes y en casos de intolerancia a drogas de primera línea (Burman et al., 2006).

El método utilizado en este estudio fue el de Proporciones Agar en Placa en medio Middlebrook 7H10 (Asencios, Salinas, Quispe, Leo, & Salazar, 2015), este es un método importante para orientar la elección de drogas en el tratamiento de TB-MDR y TB-XDR (Van Ingen et al., 2010), sin embargo en diversos estudios ha sido complejo comparar las cepas de MTB resistentes a fluoroquinolonas debido la falta de estandarización en la metodología (diferencias en los procedimientos de prueba) y las diferentes definiciones de resistencia, esto puede causar errores en la interpretación y la validez de los resultados de las pruebas de susceptibilidad a drogas (Somasundaram & Paramasivan, 2006), en nuestro estudio las cepas se consideraron resistentes si la MIC para un fluoroquinolona particular era mayor que la concentración crítica recomendada para el método APP (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011), tal y como lo hizo el estudio realizado por Malik (Malik, Willby, Sikes, Tsodikov, & Posey, 2012).

La concordancia en este estudio fue de un 100% dado que todas las cepas con resistencia a Levofloxacino fueron resistentes a Moxifloxacino, estos resultados fueron corroborados por las metodologías de MTBDRplus que fueron totalmente concordante (igual el Gold Standard) y Bactec MGIT960. Además el análisis molecular proporcionó un apoyo fundamental en la comparación de resultados (Van Ingen et al., 2010). Nuestra concordancia fue mayor de lo esperado a diferencia de otros estudios que presentan una discordancia con la resistencia a FQ de 1/3 a 1/2 del total de sus muestras (menor a lo esperado) (Farhat et al., 2015) y otros estudios donde se determinaron concordancia de un 94% (Somasundaram & Paramasivan, 2006) y de 91% (Sirgel et al., 2012), estas pequeñas deficiencias en las concordancias discordancias pueden deberse al tamaño del inóculo y la viabilidad de los organismos y a la repetición en las pruebas respectivamente.

En la familia de las fluoroquinolonas, Moxifloxacino es considerado la droga anti-TB más prometedora (Rustomjee et al, 2008) (Nijland et al., 2007), el resultado in vivo de la prueba de susceptibilidad de esta droga se ha convertido muy importante (Van Ingen et al., 2010). Estudios realizados por Barletta concluyeron que existe una baja resistencia a fluoroquinolonas y la posibilidad de continuar su uso de manera segura para el tratamiento de TB-XDR (Barletta, Zamudio, Rigouts, & Seas, 2014).

Es importante recordar que la pruebas MIC convencionales no miden la MIC de las células individuales sino la de toda una población presente en el inoculo, la presencia de incluso pequeñas cantidades de células resistentes puede resultar en un aumento de las MICs (Willby, Sikes, Malik, Metchock, & Posey, 2015) y que una cepa de MTB se considera resistente a una fluoroquinolona si la MIC_{Mox} era mayor que la CC recomendada para el método APP sugerido por el CLSI (Poissy et al., 2010).

VI. Conclusiones

- Se determinó que la MIC de Moxifloxacino para cepas *M. tuberculosis* aisladas de pacientes, utilizando el método de proporciones agar en placa fue de 0.5 µg/mL.
- Al comparar la actividad antibacteriana in vitro de Moxifloxacino utilizando el método APP en cepas de *M. tuberculosis* con patrones de resistencia definidos se obtuvo una concordancia del 100%.
- Se realizó la implementación de la prueba de susceptibilidad a Moxifloxacino en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes, obteniendo resultados del 100% de sensibilidad, 100% de especificidad, 91% de precisión y reproducibilidad del 100%.
- Se validó la prueba de susceptibilidad a Moxifloxacino utilizando el método de proporciones agar en placa en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes.

VII. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar otras metodologías para determinar la MIC de Moxifloxacino que permita detectar la resistencia a drogas en un menor tiempo.

- Monitorear y realizar vigilancia de la resistencia a Moxifloxacino con las concentraciones estudiadas.

VIII. Referencias

Alós I. (2003), Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(5), 261-8.

DOI: 10.1016/S0213-005X(03)72932-2

Angeby, K. A., Jureen, P., Giske, C. G., Chryssanthou, E., Sturegård, E., Nordvall, M., Johansson A. G., Werngren J., Kahlmeter G., Hoffner S. E., & Schön, T. (2010). Wild-type MIC distributions of four fluoroquinolones active against *Mycobacterium tuberculosis* in relation to current critical concentrations and available pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(5), 946-952. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq091>

Asencios, L., Quispe, N., Mendoza-Ticona, A., Leo, E., Vásquez, L., Jave, O., & Bonilla, C. (2009). Vigilancia nacional de la resistencia a medicamentos antituberculosos, Perú 2005-2006. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(3), 278-288.

Asencios, L., Salinas, G., Quispe, N., Leo, E., & Salazar, R., (2015). Susceptibilidad a drogas antituberculosis de primera y segunda línea por el método de las proporciones agar en placa. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(3), 112-129.

Barletta, F., Zamudio, C., Rigouts, L., & Seas, C. (2014). Resistance to second-line anti-tuberculosis drugs among peruvian multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, 31(4), 676-682.

Bergan, T. (1988). Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. In: Andriole VT, ed. The quinolones. *London: Academic Press*, 119-54.

- Beresford, N., Patel, S., Armstrong, J., Szöör, B., Fordham-Skelton, A. P., & Taberner, L. (2007). MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. *The Biochemical journal*, *406*(1), 13–18.
doi:10.1042/BJ20070670
- Burman, W. J., Goldberg, S., Johnson J. L., Muzanye. G., Engle, M., Mosher A. W., Choundhri, S., Daley, C. L., Munsiff, S. S., Zhao, Z., Vernon, A., & Chaisson, R. E. (2006) Moxifloxacin versus ethambutol in the first 2 months of treatment for pulmonary tuberculosis. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*, *174*, 331–8.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200603-360OC>
- Caminero J. A., Matteelli, A., & Lange, C. (2012) Treatment of TB. In: Lange C, Migliori GB, eds. Tuberculosis (ERS Monograph). *Sheffield, European Respiratory Society*, 154–166.
- Caminero J. A. (2013). Ed. Guidelines for Clinical and Operational Management of drug-Resistant Tuberculosis. Paris, *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*.
- Canetti, G., Rist, N., & Grosset, J. (1963). Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, *27*, 217-272.
- Caviedes, L., Lee, T. S., Gilman, R. H., Sheen, P., Spellman, E., Lee, E. H., Berg, D. E., & Montenegro-James, S. (2000). Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *Journal of clinical microbiology*, *38*(3), 1203–1208.

Center for Disease Control and Prevention (2000), Division of Tuberculosis Elimination. 4ª edición. Actualizado en agosto de 2003. Citado el 15 de agosto de 2018 de <http://www.cdc.gov/nchstp/tb/pubs/corecurr/default.htm>.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; *approved standard, 2nd ed. CLSI document M24-A2*. CLSI, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility tests for Bacteria that grow Aerobically; *approved standard, 9th ed. CLSI document M07-A9*. CLSI, Wayne, PA.

Cole, E. C., & Cook, C. E. (1998). Characterization of infectious aerosols in health care facilities: an aid to effective engineering controls and preventive strategies. *American Journal of Infection Control*, 26(4), 453-64

Collins, C. H., Grange J. M., & Yates M. D. (1985). Identification of species and variants of tubercle bacilli. Londres Boston: *Organization and practice in tuberculosis bacteriology*, 59-66.

Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. (2015). Pediamécum. Moxifloxacino. Citado el 27 de marzo de 2018 de <http://www.pediamecum.es>.

Cortes, E. (2009). Descripción de técnicas fenotípicas y moléculares para la identificación de Mycobacterium tuberculosis y micobacterias atípicas en el laboratorio clínico. Bogotá, D. C., 20. Citado el 15 de agosto de 2018 de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis319.pdf>

- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., & Raviglione, M. C. (1999). Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Journal of the American Medical Association*, 282, 677-686.
- Dye, C., Williams, B. G., Espinal, M. A., & Raviglione M. C. (2002). Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science*, 15, 295: 2042-6.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2018) *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Citado el 18 de agosto de 2018 de http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/
- Farhat, M. R., Mitnick, C. D., Franke, M. F., Kaur, D., Sloutsky, A., Murray, M., & Jacobson, K. R. (2015). Concordance of Mycobacterium tuberculosis fluoroquinolone resistance testing: implications for treatment. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 19(3), 339-341. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0814>
- Farhat, M. R., Jacobson, K. R., Franke, M. F., Kaur, D., Sloutsky, A., Mitnick, C. D., & Murray, M. (2016). Gyrase Mutations Are Associated with Variable Levels of Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 727-733. <https://doi.org/10.1128/JCM.02775-15>
- Fraser, R. S., Muller, N. L., Colmman N., & Pare, P.D. (2002) Diagnóstico de la Enfermedades del Torax. Micobacteriosis. Buenos Aires. *Editorial Médica Panamericana*, 27(4), 837-838.

- Griffith, D., & Kerr, C. M. (1996). Tuberculosis: disease of the past, disease of the present. *Journal of Perianesthesia Nursing*, 11(4), 240-5
- Gutierrez, Z. (2004), Relación Estructura Actividad y Efectos Adversos de las Quinolonas, *Revista Española de Quimioterapia*, 17(3), 232-243.
- Helb, D., Jones, M., Story, E., Boehme, C., Wallace, E., Ho, K., Kop J. A., Owens, M., Rodgers, R., Banada, P., Safi, H., Blakemore, R., Ngoc Lan, N. T., Jones-López, E., Levi, M., Burday, M., Ayakaka, I., Mugerwa, R. D., McMillan, B., Winn-Deen, E., Chistel, L., Dailey, P., Perkins, M. D., Persing, D. H., & Alland, D. (2010). Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of clinical microbiology*, 48(1), 229–237. doi:10.1128/JCM.01463-09
- Hillemann, D., Rüsç-Gerdes, S., & Richter, E. (2007). Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 45(8), 2635–2640. doi:10.1128/JCM.00521-07
- Hooper, D. C. (2000). New uses for new and older quinolones and the challenge of resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 30(2), 243-54.
- Hong, X., & Hopfinger, A. J. (2004). Molecular modeling and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell wall permeability. *Biomacromolecules*, 5(3), 1066-1077.
- Koch, R., & Brock, T. (1884). Die Aetiologie der Tuberkulose, Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsampte. *Milestones in Microbiology*, 2(1), 1-88.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Mitchell, R. N. (2007). Robbins Basic Pathology. *Saunders Elsevier*, 8(1), 516-522.
- Leyva, S., & Leyva, E. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Sociedad Química de México*, 13.
- Loddenkemper, R., Sagebiel, D., & Brendel, A. (2002). Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. *The European Respiratory Journal. Supplement*, 3, 66-77.
- Malik, S., Willby, M., Sikes, D., Tsodikov, O. V., & Posey, J. E. (2012). New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. *PloS One*, 7(6), e39754.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039754>
- Ministerio de Salud, Perú. (2013). Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectadas por tuberculosis. NTS 104-MINSA/DGSP-V.01 2013. Lima: Perú. Citado el 15 de agosto de 2018 de <ftp://ftp2.minsa.gob.pe/descargas/dgsp/ESN-tuberculosis/normaspublicaciones/NTSTBC.pdf>
- Ministerio de Salud, Perú. (2016). Dirección de Prevención y Control de la Tuberculosis, Indicadores Epidemiológicos al año 2015. Lima: Perú. Citado el 15 de agosto de 2018 de <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2016/SE36/tb.pdf>
- Ministerio de Salud, Perú. (2017). Dirección de Prevención y Control de la Tuberculosis, Reporte situacional al año 2016. Lima: Perú. Citado el 27 de marzo de 2018 de <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/Dashboard.aspx>

Ministerio de Sanidad y Política Social. (2010). Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha Técnica Actira® 400 mg comprimidos. España. Citado el 27 de marzo de 2018 de https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/actira-article-6-12-referral-annex-i-ii-iii_es.pdf

Miyazaki, E., Miyazaki, M., Chen, J. M., Chaisson, R. E., & Bishai, W. R. (1999). Moxifloxacin (BAY12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *43*(1), 85–89.

Nijland, H. M., Ruslami, R., Suroto, A. J., Burger, D. M., Alisjahbana, B., van Crevel, R., & Aarnoutse, R. E. (2007). Rifampicin reduces plasma concentrations of moxifloxacin in patients with tuberculosis. *Clin. Infect. Dis*, *45*, 1001–1007. DOI:10.1086/521894

Pholwat, S., Heysell, S., Stroup, S., Foongladda, S., & Houpt, E. (2011). Rapid First- and Second-Line Drug Susceptibility Assay for Mycobacterium Tuberculosis Isolates by Use of Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(1), 69-75.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01500-10>

Pfyffer, G.E. (2015) Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures, in *Manual of Clinical Microbiology*. *American Society of Microbiology*, *11*, 536-569.

Piersimoni, C., Lacchini, C., Penati, V., Iona, E., Fattorini, L., Nista, D., Zallocco D., Gesu G. P., Codecasa, L. (2007). Validation of the agar proportion and 2 liquid systems for testing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to moxifloxacin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *57*(3), 283-287.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.08.018>

- Poissy, J., Aubry, A., Fernandez, C., Lott, M. C., Chauffour, A., Jarlier, V., Farinotti, R., & Veziris, N. (2010). Should moxifloxacin be used for the treatment of extensively drug-resistant tuberculosis? An answer from a murine model. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*, 4765–477. DOI:10.1128/AAC.00968-10
- Quispe N., Leo E. y Salazar R. (2015). Susceptibilidad a drogas Antituberculosis de primera y segunda línea por el método de las Proporciones agar en Placa. Perú: Instituto Nacional de Salud. *MET-CNSP-011(34)*.
- Raviglione, M. C. (2003) The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb)*, *83* (1–3), 4– 14.
- Rinder, H., Mieskes K.T., & Loscher T. (2001) Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, *5(4)*, 339-45.
- Rustomjee, R., Lienhardt, C., Kanyok, T., Davies, G. R., Levin, J., Mthiyane, T., Reddy, C., Sturm, A. W., Sirgel, F. A., Allen, J., Coleman, D. J., Fourie, B., & Mitchison, D. A. (2008). A phase II study of the sterilising activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*, *12*, 128–138.
- Sanders, C. A., Nieda, R. R., & Desmond, E. P. (2004). Validation of the use of Middlebrook 7H10 agar, BACTEC MGIT 960, and BACTEC 460 12B media for testing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to levofloxacin. *Journal of clinical microbiology*, *42(11)*, 5225–5228. doi:10.1128/JCM.42.11.5225-5228.2004
- Somasundaram, S., & Paramasivan, N. C. (2006). Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis strains to gatifloxacin and moxifloxacin by different methods. *Chemotherapy*, *52(4)*, 190-195. <https://doi.org/10.1159/000093486>

- Sirgel, F. A., Warren, R. M., Streicher, E. M., Victor, T. C., Van Helden, P. D., & Böttger, E. C. (2012). gyrA mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(5), 1088-1093. <https://doi.org/10.1093/jac/dks033>
- Smith I. (2003). Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 463-96.
- Summers R. M., & Snyder J. W. (2006). Atlas: Handbook of media for clinical microbiology. Citado el 25 de setiembre del 2018 de CRC Press. ISBN 978-0-8493-3795-6.
- Tortoli, E., Benedetti, M., Fontanelli, A., & Simonetti, M. T. (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. *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 607–610. doi:10.1128/jcm.40.2.607-610.2002
- Van Ingen, J., Simons, S., de Zwaan, R., van der Laan, T., Kamst-van Agterveld, M., Boeree, M. J., & van Soolingen, D. (2010). Comparative study on genotypic and phenotypic second-line drug resistance testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2749-2753. <https://doi.org/10.1128/JCM.00652-10>
- Van Rie, A., Page-Shipp, L., Scott, L., Sanne, I., & Stevens, W. (2010). Xpert MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope?. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(7), 937–946. doi: 10.1586/erm.10.67.
- Wang, J.Y., Lee, L. N., Lai, H. C., Wang, S. K., Jan, I. S., Yu, C. J., Hsueh, P. R., & Yang, P. C. (2007). Resistencia a la fluoroquinolona en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*:

mutaciones genéticas asociadas y relación con la exposición a los antimicrobianos. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 860-865. doi: 10.1093 / jac / dkm061

Willby, M., Sikes, R. D., Malik, S., Metchock, B., & Posey, J. E. (2015). Correlation between GyrA substitutions and ofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5427-5434. <https://doi.org/10.1128/AAC.00662-15>

World Health Organization (1994). Tuberculosis Programme: Framework for effective tuberculosis control. Geneva, Switzerland. Citado el 27 de marzo de 2018 de <http://www.who.int/iris/handle/10665/58717>

World Health Organization, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, & Royal Netherlands Tuberculosis Association. (2001). Revised international definitions in tuberculosis control. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5(3), 213-5.

World Health Organization (2004). Laboratory Biosafety Manual. Third Edition. Geneva, Switzerland. Citado el 27 de marzo de 2018 de https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf?ua=1

World Health Organization (2008). Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: Emergency Update 2008. Geneva, Switzerland. Citado el 05 de abril de 2018 de

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43965/9789241547581_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (2008). Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Fourth Global Report. Geneva, Switzerland. Citado el 26 de junio de 2018 de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43889/WHO_HTM_TB_2008.394_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (2012). Tuberculosis Farmaco Resistente. Geneva, Switzerland. Citado el 15 de agosto de 2018 de <http://www.who.int/tb/challenges/mdr/tdrfaqs/es/>

World Health Organization. (2015). Global Tuberculosis Report 2015. 20th Edition. Geneva, Switzerland. Citado el 28 de marzo de 2018 de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059eng.pdf?ua_1

World Health Organization (2016). Global Tuberculosis Report 2016. Geneva, Switzerland. Citado el 15 de agosto de 2018 de <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>

World Health Organization. (2017). Global Tuberculosis Report 2017. Geneva, Switzerland. Citado el 28 de marzo de 2018 de <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/9789241565516-eng.pdf?sequence=1>

World Health Organization (2018). Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/TB/2018.5.

Yamane, N., Nakasone, I., Yamashita, K., Toyoda, K., & Okazawa, Y. (1998). Determination of pyrazinamide susceptibility for *Mycobacterium tuberculosis* by use of Middlebrook culture media and comparison with results of pyrazinamidase test. *Japanese Journal of Clinical Pathology*, 46(5), 479–85.

IX. Anexos

9.1 Anexo 1

$$\text{Potencia} = (\text{Pureza}) \times (\text{Fracción activa}) \times (1 - \text{Contenido de agua})$$

$$\text{Potencia} = (992) \times (1) \times (1 - 0)$$

$$\text{Potencia} = 992 \mu\text{g}/\text{mg}$$

$$\text{Peso} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{Potencia} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right)}$$

$$\text{Peso} = \frac{10 \text{ (mL)} \times 8000 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{992 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right)}$$

$$\text{Peso} = 80.65 \text{ mg} = 0.0806 \text{ g}$$

9.2 Anexo 2

Se utilizó la fórmula de concentraciones para los siguientes cálculos:

$$Ci(\mu\text{g}/\text{mL}) \times Vi \text{ (mL)} = Cf (\mu\text{g}/\text{mL}) \times Vf \text{ (mL)}$$

Dónde:

Ci: concentración inicial Vi: volumen inicial

Cf: concentración final Vf: volumen final

Calculando A a partir de C:

$$C(\mu g/mL) \times VC (mL) = A (\mu g/mL) \times VA(mL)$$

$$8000\mu g/mL \times VC mL = 800\mu g/mL \times 10mL$$

$$VC = 1 mL$$

Se añadió 1mL de C a 9mL de agua destilada estéril.

Calculando B a partir de A

$$A(\mu g/mL) \times VA (mL) = B (\mu g/mL) \times VB(mL)$$

$$800\mu g/mL \times VA mL = 400\mu g/mL \times 10mL$$

$$VA = 5 mL$$

Se añadió 5mL de A en 5mL de agua destilada estéril.

9.3 Anexo 3

Calculando las concentraciones de trabajo a partir de B

$$Ci(\mu g/mL) \times Vi (mL) = Cf (\mu g/mL) \times Vf(mL)$$

Para una concentración de 4.0 $\mu g/mL$

$$B(\mu g/mL) \times VB (mL) = 4 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$400(\mu g/mL) \times VB (mL) = 4 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$VB = 4 mL$$

Para una concentración de 2.0 µg/mL

$$B(\mu g/mL) \times VB (mL) = 2 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$400(\mu g/mL) \times VB (mL) = 2 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$VB = 2 mL$$

Para una concentración de 1.0 µg/mL

$$B(\mu g/mL) \times VB (mL) = 1 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$400(\mu g/mL) \times VB (mL) = 1 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$VB = 1 mL$$

Para una concentración de 0.5 µg/mL

$$B(\mu g/mL) \times VB (mL) = 0.5 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$400(\mu g/mL) \times VB (mL) = 0.5 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$VB = 0.5 mL$$

Para una concentración de 0.25 µg/mL

$$B(\mu g/mL) \times VB (mL) = 0.25 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$400(\mu g/mL) \times VB (mL) = 0.25 (\mu g/mL) \times 400(mL)$$

$$VB = 0.25 mL$$

9.4 Anexo 4

Tabla 8

Concentraciones de la droga Moxifloxacino utilizadas en el medio Middlebrook 7H10

Concentración C ($\mu\text{g/mL}$)	Solución A ($\mu\text{g/mL}$)	Solución B ($\mu\text{g/mL}$)	Soluciones de trabajo (WS)		
			Volumen de Sol. B (mL)	Volumen de 7H10 (mL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
8000	800	400	0.25	399.75	0.25
			0.5	399.5	0.5
			1	399	1.0
			2	398	2.0
			4	396	4.0

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)

9.5 Anexo 5

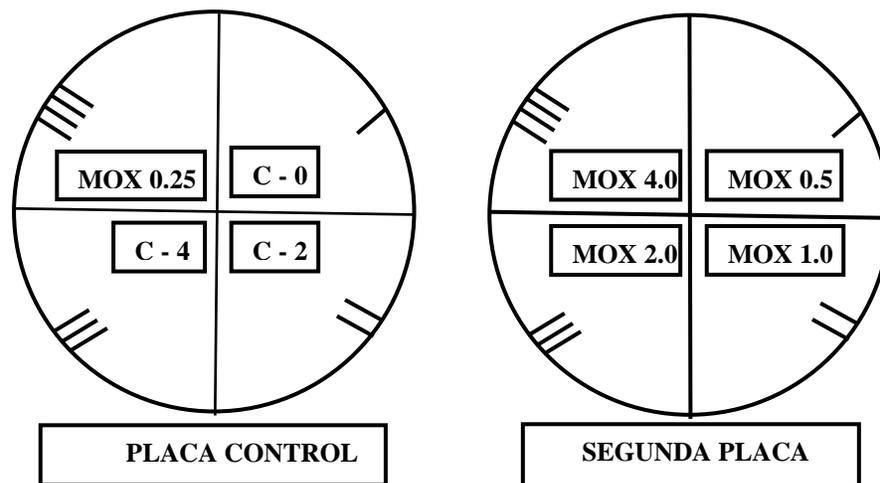


Ilustración 1. Placas rotuladas con las concentraciones de Moxifloxacino (Fuente: Elaboración propia)

9.6 Anexo 6

FORMULARIO										FOR-CN SP-OT-0012 Edición 01
VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE SUCEPTIBILIDAD A MOXIFLOXACINO EN CEPAS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> AISLADAS DE PACIENTES										Nº
INOCULADO POR:		PROCESADO POR:				LECTURA POR:				
LOWEINSTEN JENSEN LOTE:		FECHA DE VENCIMIENTO:				CALDO 7H9 LOTE Nº:		FECHA VENCIMIENTO:		
SOLUCIÓN SALINA-TWEEN LOTE Nº:		FECHA DE VENCIMIENTO:				FECHA INOCULADO M7H9:		FECHA SEMBRADO M7H10:		
PLACA DE CONTROL LOTE Nº:		FECHA DE VENCIMIENTO:				FECHA LECTURA PLACAS:				
PLACA DE DROGAS Nº 1:		FECHA DE VENCIMIENTO:								
PLACA DE DROGAS Nº 2:		FECHA DE VENCIMIENTO:								
CODIGO INS	CODIGO ORIGINAL	PLACA CONTROL				PLACA CON DROGA #1				OBSERVACIONES
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	
		0	-2	-4	MOX 0,25	MOX 0,5	MOX 1,0	MOX 2,0	MOX 4,0	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Ilustración 2. Hoja de Trabajo (Fuente: Elaboración propia)

9.7 Anexo 7

Tabla 9

Características y resultados de diferentes estudios de distribución de los valores de la MIC para Moxifloxacino en Mycobacterium tuberculosis

Fuente bibliográfica	N° de aislamientos o cepas utilizadas	Rango de la MIC (µg/mL)	Método microbiológico utilizado	ECOFF (µg/mL)	País/Región
Este estudio	120	0.25–4.0	Agar 7H10	0.5	Perú-Lima
Ängeby 2010	90	0.03-8.0	Agar 7H10	0.5	Sweden
Wang 2007	420	0.06-128.0	Agar 7H10	0.5	Taiwan, China
Van Ingen 2010	28	0.125-2.0	Agar7H10	0.5	Netherlands
Willby 2015	133	0.25-16.0	Agar 7H10	0.5	Estados Unidos de América
Malik 2012	14	0.25-16.0	Agar 7H10	0.5 bajo nivel 2.0 alto nivel	Estados Unidos de América
Farhat 2015	226	0.125-8.0	Agar 7H10	0.5	Perú-Lima
Farhat 2016	275	0.125-8.0	Agar 7H10	0.5	Perú-Lima
Piersimoni 2007	40	0.03-8.0	MGIT / Agar 7H11	0.5	Italia
Sirgel 2012	177	0.125-10.0	MGIT	0,25	Sur Africa
Barletta 2014	14	0.5-8.0	Löwenstein Jensen	0.25	Perú-Lima

Datos obtenidos en el laboratorio (Fuente: Elaboración propia)