

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



56

## Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias

### Editores

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

### Coordinador

Fernando Alcaide Fernández  
de Vega

### Autores

Fernando Alcaide Fernández de Vega  
Jaime Esteban Moreno  
Julià González Martín  
Juan José Palacios Gutiérrez



ISBN: 978-84-608-7326-6

**EDITORES:**

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

**SUGERENCIA DE CITACIÓN:**

Alcaide Fernández de Vega F, Esteban Moreno J, González Martín J, Palacios Gutiérrez JJ. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. 56. Alcaide Fernández de Vega F (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.

**AVISO:**

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web [www.seimc.org](http://www.seimc.org)”

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

## **56.** MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN MICOBACTERIAS. **2016**

Coordinador:

Fernando Alcaide Fernández de Vega<sup>1</sup>

Autores:

Fernando Alcaide Fernández de Vega<sup>1</sup>  
Jaime Esteban Moreno<sup>2</sup>  
Julià González Martín<sup>3</sup>  
Juan José Palacios Gutiérrez<sup>4</sup>



<sup>1</sup> Servicio de Microbiología. Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona (UB). Hospitalet de Llobregat (Barcelona). <sup>2</sup> Departamento de Microbiología Clínica. IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid. <sup>3</sup> Servicio de Microbiología, CDB, Hospital Clínic de Barcelona-ISGlobal, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona. <sup>4</sup> Unidad de Referencia Regional de Micobacterias. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

## ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	6
2.	Antimicrobianos.....	6
	2.1. Isoniazida .....	6
	2.2. Rifampicina.....	7
	2.3. Otras rifamicinas.....	7
	2.4. Pirazinamida.....	8
	2.5. Etambutol.....	8
	2.6. Etionamida .....	8
	2.7. Aminoglucósidos.....	8
	2.8. Capreomicina .....	9
	2.9. Fluoroquinolonas .....	9
	2.10. Linezolid.....	9
	2.11. Ácido para-aminosalicílico.....	9
	2.12. Tiacetazona .....	10
	2.13. Cycloserina .....	10
	2.14. Macrólidos .....	10
	2.15. Beta-lactámicos.....	10
	2.16. Cotrimoxazol.....	11
	2.17. Tetraciclinas y tigeciclina.....	11
	2.18. Clofazimina .....	11
	2.19. Dapsona .....	11
	2.20. Nuevos fármacos antituberculosos.....	11
3.	Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.....	12
	3.1. Bases microbiológicas del tratamiento de la tuberculosis.....	12
	3.1.1. Asociación de fármacos .....	12
	3.1.2. Tratamiento prolongado.....	12
	3.2. Concepto de resistencia a los fármacos .....	13
	3.2.1. Resistencia clínica .....	13
	3.2.2. Resistencia microbiológica .....	13
	3.2.3. Clasificación epidemiológica de las resistencias.....	13
	3.3. Indicaciones del estudio de sensibilidad en la tuberculosis.....	14
	3.4. Características generales de los estudios de sensibilidad en la tuberculosis.....	14
	3.5. Métodos basados en medios de cultivo sólidos.....	14
	3.5.1. Método de las concentraciones absolutas.....	14
	3.5.2. Método de la relación de resistencias .....	15
	3.5.3. Método de las proporciones múltiples .....	15
	3.5.4. Método del Epsilon test.....	16
	3.6. Métodos basados en medios de cultivo líquidos.....	16
	3.6.1. Método radiométrico BACTEC® 460TB .....	17
	3.6.2. Métodos no radiométricos en sistemas de cultivo automatizados.....	17
	3.6.3. Determinación de sensibilidad a la pirazinamida .....	17
	3.7. Métodos de sensibilidad alternativos .....	18
	3.7.1. Métodos basados en micobacteriófagos .....	18
	3.7.2. Citometría de flujo.....	18
	3.7.3. Microdilución .....	18
	3.7.4. Prueba de la nitrato reductasa ( <i>nitrate reductase assay</i> , NRA).....	18
	3.7.5. Observación microscópica de la sensibilidad a los fármacos ( <i>microscopic-observation drug-susceptibility</i> , MODS).....	19

3.7.6. Prueba de microtitulación con resazurina ( <i>resazurin microtiter assay</i> , REMA) .....	19
3.7.7. Prueba del aliento ( <i>breath test</i> ) .....	19
3.7.8. Prueba de la capa fina de agar ( <i>thin-layer agar assay</i> , TLA) .....	19
<b>4.</b> Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en las micobacterias no tuberculosas .....	20
4.1. Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento .....	20
4.1.1. Recomendaciones para <i>Mycobacterium avium</i> complex (MAC).....	20
4.1.2. Recomendaciones para <i>Mycobacterium kansasii</i> .....	22
4.1.3. Recomendaciones para <i>Mycobacterium marinum</i> .....	22
4.1.4. Otras micobacterias no tuberculosas.....	23
4.2. Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido .....	23
<b>5.</b> Mecanismos de resistencia y detección molecular de la resistencia.....	25
5.1. Mecanismos de resistencia.....	25
5.2. Detección molecular de la resistencia .....	29
<b>6.</b> Bibliografía.....	34

## DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-SBK-01. Pruebas de sensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante sistemas de cultivo automatizados basados en medios líquidos.
2. PNT-SBK-02. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante el método de las proporciones en agar.
3. PNT-SBK-03. Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo.
4. PNT-SBK-04. Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento mediante microdilución en caldo.
5. PNT-SBK-05. Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituberculosos en *Mycobacterium tuberculosis* complex.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han descrito más de 170 especies de micobacterias siendo muchas de ellas una causa importante de morbilidad y mortalidad en el ser humano. Entre las infecciones que producen destaca la tuberculosis (TB), causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Según el último informe de la OMS, cerca de 9,6 millones de personas enfermaron de TB en 2014 y 1,5 millones fallecieron por ella, siendo la primera causa de muerte por un agente infeccioso. Además, en los últimos años se ha asistido a la aparición y diseminación de cepas resistentes a múltiples fármacos. Así, se calcula que 480.000 personas desarrollaron una TB multirresistente (MDR-TB; resistencia al menos a la isoniacida y a la rifampicina) a nivel mundial en 2014, de los que alrededor del 9% tendrían una resistencia extendida (XDR-TB), al menos a uno de los fármacos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina o amikacina) y una fluoroquinolona, siendo notificado al menos un caso en 100 países. Por todo ello, la detección rápida de la resistencia a los antituberculosos es fundamental para lograr un tratamiento adecuado y prevenir la aparición y diseminación de la TB multirresistente.

Así mismo la lepra, causada por *Mycobacterium leprae*, también es un problema de primer orden, donde la mayoría de los pacientes se encuentran en Asia, África y Sudamérica. Por otro lado, las micobacterias no tuberculosas o ambientales (MNT) han ido tomando un mayor protagonismo y representan, en la actualidad, entre el 30% y el 50% del total de micobacterias aisladas en gran parte de los laboratorios de Microbiología Clínica. Un gran número de ellas son patógenas para el hombre (micobacteriosis) requiriendo un tratamiento específico y que, en muchos casos, deberá ser orientado por las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos.

## 2. ANTIMICROBIANOS

Aunque el arsenal terapéutico para las infecciones micobacterianas ha sido siempre muy limitado, en la actualidad se dispone de una mayor variedad de fármacos, si bien no todos tienen la misma actividad, ni sirven para todo tipo de infecciones y especies micobacterianas. El hecho de que no todos los aislamientos de MNT sean clínicamente significativos y que exista una escasa evidencia científica sobre la eficacia de los diversos antimicrobianos frente a estos microorganismos,

hace difícil la elección de cuándo y cómo tratar este tipo de infecciones.

### 2.1. ISONIACIDA

La isoniacida es la hidracida del ácido isonicotínico, un quimioterápico sintético soluble en agua. Introducida en el año 1952, ha sido la piedra angular para el tratamiento tanto de la enfermedad como de la infección tuberculosa.

El mecanismo de acción es complejo inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos, componente esencial de la pared bacteriana. La isoniacida es un profármaco que precisa ser activado *in vivo* por la enzima catalasa-peroxidasa de la micobacteria, codificada por el gen *katG*, y que reaccionará con la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>) formando aductos isoniacida-NAD/isoniacida-NADP que inhiben competitivamente las enzimas inhA y dihidrofolato reductasa (DHFR) dependiente de NADPH e involucrada en la síntesis del ADN.

El complejo *M. tuberculosis* suele ser muy sensible a la isoniacida, con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,025 a 0,05 mg/L. La tasa de mutantes resistentes espontáneos es de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-6</sup>. Este fármaco es inactivo frente al resto de micobacterias con las excepciones de *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium xenopi*, que se inhiben *in vitro* con concentraciones de 1 a 5 mg/L. La isoniacida tiene efecto bactericida durante la fase de replicación de la micobacteria a nivel extracelular, donde el pH suele ser neutro o ligeramente alcalino, y un efecto bacteriostático cuando la micobacteria se encuentra en fase de crecimiento lento, como ocurre en el espacio intracelular, donde el pH suele ser ácido. La isoniacida resulta ineficaz sobre los bacilos en fases no replicativas.

En cuanto a su farmacocinética, se absorbe por vía oral en 1-2 h y los alimentos reducen significativamente la absorción intestinal, por lo que debe administrarse en ayunas. A la dosis de 300 mg suelen alcanzarse concentraciones de 3-7 mg/L, con niveles de un 30-40% más bajos en acetiladores rápidos. La vida media es hasta 3 h en acetiladores lentos, y hasta 1 h en acetiladores rápidos. Penetra bien en el LCR (50-80% del nivel sérico), y en líquido pleural, peritoneal y sinovial (niveles equivalentes al suero). Se metaboliza en el hígado por acetilación e hidrólisis, aunque la proporción viene determinada genéticamente para cada persona, o incluso es dependiente de la raza. Todos los metabolitos producto de la acetilación son bacte-

riológicamente inactivos. La toxicidad es rara a las dosis habituales y se basan en alteraciones del sistema nervioso central y periférico, trastornos gastrointestinales, hepatitis, exantema, discrasias sanguíneas, hemorragias, déficit de piridoxina y síndrome lupus-like.

## 2.2. RIFAMPICINA

La rifampicina es una ansamicina semisintética, introducida en 1968 y es el fármaco más importante para el tratamiento de la TB. Es un inhibidor de la síntesis del ácido ribonucleico (ARN). Se une a la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa procariota ADN-dependiente y bloquea físicamente la elongación de la cadena de ARN, lo que impedirá la transcripción del ADN. Tiene un efecto bactericida tanto sobre bacilos intracelulares como extracelulares. La rifampicina es muy activa frente al complejo *M. tuberculosis* (CIM entre 0,005-0,2 mg/L), *M. kansasii*, *M. leprae* y *M. xenopi*. En el caso del complejo *Mycobacterium avium* las resistencias superan el 50%, y las micobacterias de crecimiento rápido suelen ser siempre resistentes. En el resto de especies la actividad es más variable como ocurre con *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans* y *Mycobacterium haemophilum*. En general, las cepas del complejo *M. tuberculosis* se consideran sensibles con CIM < 1 mg/L y la tasa de mutantes resistentes espontáneos es de  $10^{-8}$ . Por otro lado, este antimicrobiano también es activo frente a una amplia variedad de microorganismos no ácido-alcohol resistentes.

La rifampicina se absorbe bien por vía oral y en ayunas, alcanzando en 1-2 h concentraciones séricas de 5-10 mg/L tras una dosis de 600 mg. La vida media es de unas 3 h que se acorta con los tratamientos prolongados, en cambio se alarga en caso de fallo hepático pero no en caso de fallo renal. Este antibiótico es muy lipofílico, con un gran volumen de distribución, difundiendo rápidamente a pulmón, riñón, glándulas suprarrenales e hígado donde las concentraciones pueden superar a las séricas. Penetra poco en LCR (mejor en situación de meningitis inflamadas, 50% respecto al nivel sérico) y llega bien al líquido pleural, peritoneal y sinovial.

El metabolismo es hepático y se excreta por vía biliar (40%) y renal (30%). Sus efectos tóxicos incluyen hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales y reacciones de hipersensibilidad, entre otros. Este fármaco produce un color naranja en la orina, lágrimas y otros fluidos corporales. La rifampicina es un potente inductor de las enzimas microsomales hepáticas (citocromo P450-3A) lo que acelera el metabolismo de otros fármacos, en especial los inhibidores de la proteasa utili-

zados en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Por ello en estos casos se sustituye por la rifabutina que tiene un efecto menor sobre estos fármacos.

## 2.3. OTRAS RIFAMICINAS

El mecanismo de acción y los mecanismos de resistencia son idénticos a los de la rifampicina con la que existe, generalmente, resistencia cruzada. Así, las resistencias de alto nivel suelen afectar a todas las rifamicinas, mientras que las cepas con resistencias de bajo nivel a la rifampicina, pueden ser sensibles a la rifapentina y a la rifabutina.

Todas ellas poseen, en función de las CIM, una mayor actividad *in vitro* que la rifampicina frente a *M. tuberculosis*, y además su mayor vida media permite su dosificación una o 2 veces por semana con rentabilidades clínicas similares a las de la rifampicina.

### RIFABUTINA

La rifabutina es un derivado semisintético de la espiropiperidil rifamicina. Se absorbe bien por vía oral, y a dosis de 300 mg la rifabutina alcanza concentraciones séricas de hasta 0,5 mg/L después de 2-4 h, y con una vida media de 45 h, muy superior a la de la rifampicina. La CIM de la rifabutina en los aislamientos del complejo *M. tuberculosis* sensibles es < 0,06 mg/L. Los efectos adversos son similares a los de la rifampicina e incluyen las interacciones con fármacos antirretrovirales, aunque en menor medida con los inhibidores de las proteasas. Por ello en estos pacientes se recomienda la rifabutina (150 mg) en lugar de la rifampicina (600 mg), así como en los pacientes en tratamiento con ciclosporina o tacrolimus.

### RIFAPENTINA

La rifapentina es una rifamicina pentacíclica semisintética. Se absorbe bien por vía oral, sobre todo cuando se ingiere con alimentos. La rifapentina alcanza concentraciones séricas de 15 mg/L a las 5-6 h, tras una dosis de 600 mg y con una vida media de 13 h. Al ser un antimicrobiano muy lipofílico tiene un gran volumen de distribución. La CIM de esta rifamicina en los aislamientos del complejo *M. tuberculosis* sensibles es de 0,03-0,12 mg/L.

Cuando se ha comparado el tratamiento con rifapentina en 2 dosis (600 mg) semanales durante la fase intensiva (2 meses) y posteriormente 1 vez por semana, respecto al tratamiento diario con rifampicina, los resultados han sido similares, aunque el número de

recaídas en el grupo de la rifapentina es ligeramente superior.

## 2.4. PIRAZINAMIDA

La pirazinamida es un fármaco análogo de la nicotinamida, que es el más potente de los derivados sintéticos del ácido nicotínico. La pirazinamida es un profármaco, que se convierte en su forma activa (ácido pirazinoico o POA) por la acción de la enzima pirazinamidasa, que es codificada por el gen *pncA* del bacilo tuberculoso. Se desconoce el mecanismo de acción exacto, pero se sabe que su actividad es pH dependiente. Así, a pH neutro es prácticamente inactiva, mientras que a pH 5,5 la CIM frente a *M. tuberculosis* sensible es de 20 mg/L. La pirazinamida es bactericida en los microorganismos de metabolismo lento que se encuentran en el medio ácido de los macrófagos o de los granulomas caseosos. La tasa de mutantes resistentes espontáneos es de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ . La combinación con isoniacida resulta sinérgica.

La pirazinamida solamente es activa frente a determinadas especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*). Las cepas de *Mycobacterium bovis*, incluyendo el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), tienen resistencia natural a la pirazinamida porque carecen de la acción pirazinamidasa por una mutación puntual en el gen *pncA*.

La pirazinamida se absorbe bien por vía oral en ayunas, alcanzando concentraciones séricas de 40-50 mg/L en 1-4 h tras una dosis de 1 g. La vida media es de 9-11 h y tiene una excelente distribución corporal, incluido el LCR. El metabolismo es hepático y se excreta por vía renal.

La toxicidad es dosis dependiente (infrecuente a dosis de 1,5 g/día), pudiendo producir hepatotoxicidad y alteraciones gastrointestinales, y muy infrecuentemente fotosensibilidad, hiperuricemia (contraindicada en caso de gota), hiperglucemia, trombocitopenia y anemia sideroblástica.

## 2.5. ETAMBUTOL

El etambutol es un compuesto hidrosoluble (etilendiaminodibutanol) derivado de la etilendiamina que sólo tiene actividad frente a diversas especies de micobacterias en fase de crecimiento activo. El etambutol actúa inhibiendo la enzima arabinosil transferasa que es fundamental en la polimerización de la arabinosa para la formación del arabinogalactano y el lipoarabinomano

de la pared celular. Es un fármaco bacteriostático frente al complejo *M. tuberculosis* en bacilos extracelulares y menos activo sobre los intracelulares. La CIM es de 1-4 mg/L y la tasa de mutantes resistentes espontáneos de  $10^{-5}$ . El etambutol también es activo, aunque de manera muy variable, frente a otras micobacterias, entre ellas *M. kansasii*, complejo *M. avium*, *M. marinum*, *Mycobacterium szulgai* y *Mycobacterium scrofulaceum*. En general se consideran sensibles al etambutol las cepas del complejo *M. tuberculosis* con CIM  $\leq$  5 mg/L.

Se absorbe bien por vía oral en ayunas, alcanzando picos séricos de 5 mg/L tras dosis de 25 mg/kg. La vida media es de 4 h y se difunde bien por todo el organismo, incluso el LCR (50% respecto al nivel sérico sobre todo con meningitis inflamadas). Su metabolismo es hepático y la excreción renal. La toxicidad es dosis y tiempo dependiente, y destaca la neuritis óptica retrobulbar (impide su administración en niños), que puede llegar a ocasionar ceguera permanente.

## 2.6. ETIONAMIDA

Se trata de un derivado del ácido isonicotínico (etil-tio-isonicotinamida), con una buena actividad bacteriostática frente a *M. tuberculosis* complex y algunas MNT a concentraciones de 0,6-2,5 mg/L. La tasa de mutantes resistentes espontáneos en el complejo *M. tuberculosis* es de  $10^{-3}$ . La etionamida inhibe la síntesis de los ácidos micólicos y estimula las reacciones de oxidoreducción. Los aislamientos resistentes a altas concentraciones de isoniacida (mutaciones en el gen *katG*) suelen ser sensibles a la etionamida, mientras que las cepas con un nivel bajo de resistencia a la isoniacida, tienen mutaciones en la zona promotora del gen *inhA* (ver apartado 5) y son resistentes a la etionamida. Por otro lado, tiene resistencia cruzada con la tiacetazona. En general la etionamida se absorbe bien por vía oral y logra concentraciones en suero de 2 a 20 mg/L, a las 3-4 h tras una dosis de 0,5 a 1 g. Este fármaco atraviesa bien la barrera hemato-encefálica tanto con inflamación de las meningitis como sin ella, y se metaboliza en el hígado. Es un antimicobacteriano que suele reservarse para la TB resistente aunque de forma limitada por los efectos secundarios, sobre todo, de intolerancia digestiva.

## 2.7. AMINOGLUCÓSIDOS

Los antibióticos aminoglucósidos son una de las familias de antimicrobianos más antiguas, y la primera en tener actividad antimicobacteriana reconocida (estreptomycin). Los antibióticos más usados para tratar

las infecciones por micobacterias son: estreptomina (CIM en el complejo *M. tuberculosis* de 2-10 mg/L), amikacina (CIM en el complejo *M. tuberculosis* de 1 mg/L), kanamicina y tobramicina, ésta última activa solo frente a *Mycobacterium chelonae*. La tasa de mutantes resistentes espontáneos en el complejo *M. tuberculosis* es de  $10^{-3}$ .

Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión al ribosoma cerca del locus A. Esta unión cambia el estado de la unión del ARNt e interfiere con la decodificación del ARNm. Todo ello da lugar a un aumento en el número de proteínas mal traducidas, con el consiguiente efecto antibacteriano.

A pesar de una buena actividad antimicrobiana, los aminoglucósidos poseen dos inconvenientes. El primero es la necesidad de una administración parenteral, dado que no se absorben por vía digestiva. El segundo es una no despreciable toxicidad, esencialmente renal, aunque también puede afectar a la audición y al sistema del equilibrio.

## 2.8. CAPREOMICINA

La capreomicina es un polipéptido, de uso exclusivo como antimicobacteriano, conocido desde 1959. La capreomicina se obtiene a partir de *Streptomyces capreolus*. Aunque tiene una estructura química distinta, es similar a los aminoglucósidos en su actividad y efectos adversos. Incluso puede presentar resistencia cruzada con amikacina y tobramicina, aunque no siempre, ni tampoco frente a la estreptomina. Su mecanismo de acción no es del todo conocido, aunque inhibe la síntesis de proteínas actuando sobre la subunidad 30S del ribosoma. Es activa frente a *M. tuberculosis* con una CIM < 2,5 mg/L. Puede ser activa frente a otras especies, aunque no suele utilizarse. En los últimos años está adquiriendo interés su uso en forma nebulizada para localizaciones pulmonares. Tiene actividad bacteriostática, pero puede ser bactericida en medio extracelular neutro. Se administra por vía intramuscular y se elimina por vía renal. Puede presentar toxicidad ótica, sobre todo vestibular, y también renal, similares a las de los aminoglucósidos, aunque menos graves. La toxicidad se potencia si se administran de forma conjunta, por lo que no es recomendable. Puede causar abscesos en el punto de inyección.

## 2.9. FLUOROQUINOLONAS

Las quinolonas fluoradas (fluoroquinolonas) son antibióticos con una elevada actividad frente a diversas

especies de micobacterias, incluyendo *M. tuberculosis*. Las más usadas son ciprofloxacino, ofloxacino y, sobre todo a nivel clínico, levofloxacino (CIM en el complejo *M. tuberculosis* de 1 mg/L) y moxifloxacino (CIM en el complejo *M. tuberculosis*  $\leq 0,25$  mg/L). Todas ellas actúan uniéndose a la ADN girasa (subunidades A y B) e inhibiéndola, lo que impide la replicación del ADN al mantenerse éste en estado de superenrollamiento. Además, también actúa uniéndose a la topoisomerasa IV, cuyo papel es liberar las cadenas de ADN sintetizadas durante la división celular, así como a las proteínas de membrana que regulan la permeabilidad y la expulsión activa del fármaco. Sin embargo, algunas especies como *M. tuberculosis*, *M. abscessus* y *M. avium* carecen de topoisomerasa IV. Las fluoroquinolonas son antibióticos de una biodisponibilidad excelente por vía oral, alcanzando unas concentraciones elevadas en tejidos, y con un escaso número de efectos secundarios, fundamentalmente gastrointestinales.

## 2.10. LINEZOLID

Es una oxazolidona, indicada inicialmente para bacterias grampositivas. Su uso en TB se inició a partir del año 2000, en el tratamiento de la TB multirresistente. El linezolid tiene una actividad bactericida elevada frente a *M. tuberculosis*, con CIM entre 0,125 y 1 mg/L. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, uniéndose al centro peptidil transferasa, que está en medio de la subunidad 50S del ribosoma. Comparte parcialmente los sitios de unión con otros antibióticos como clindamicina, cloranfenicol o estreptogramina A. La administración puede ser oral o endovenosa y se elimina, fundamentalmente, por el riñón. La rifampicina puede disminuir su concentración sérica por interferencia con la acción de la glucoproteína P. Los efectos adversos más frecuentes son las alteraciones gastrointestinales con diarrea, náuseas y vómitos. Menos frecuentes son la neuropatía periférica y la óptica. Raramente y en tratamientos prolongados, se produce la supresión de la médula ósea, sobre todo con trombocitopenia y anemia.

## 2.11. ÁCIDO PARA-AMINOSALICÍLICO

Este antimicrobiano (PAS) es activo, casi exclusivamente, frente al complejo *M. tuberculosis* y en especial sobre la población bacilar extracelular. Aunque el mecanismo de acción no es del todo bien conocido, se sabe que inhibe la síntesis del folato y que puede afectar el transporte del hierro y el metabolismo del ácido salicílico. La CIM del PAS para *M. tuberculosis*

complex oscila entre 0,5 y 2 mg/L. La administración es fundamentalmente por vía oral y se logran picos séricos de 7-8 mg/L, en 1-2 h, tras una dosis de 4 g, siendo la vida media de sólo 1 h. Por ello, los pacientes adultos requieren dosis diarias elevadas de 10-15 g, lo que puede conllevar irritación gastrointestinal y reacciones de hipersensibilidad. En la actualidad tiene un uso limitado y está reservado para las TB resistentes como fármaco de segunda línea.

## 2.12. TIACETAZONA

Es una tiosemicarbazona, únicamente usada como antimicobacteriano. Fue introducida en el tratamiento de la TB a finales de la década de 1940, administrándose en combinación con isoniacida. Se administra por vía oral en forma de profármaco que es activado por la monooxigenasa EthA, que también activa a la etionamida. Inhibe la síntesis de ácidos micólicos, aunque no se conoce con exactitud su mecanismo de acción. Es bacteriostática frente a *M. tuberculosis*, con CIM de 0,1 a 0,5 mg/L, y también activa frente a otras especies como *M. bovis*, *M. marinum* y *M. kansasii*. Se absorbe bien por vía oral, alcanzando concentraciones máximas en el plasma a las 4-6 h y con una semivida de 12 h. Se elimina por vía renal. Entre los efectos adversos pueden existir reacciones de hipersensibilidad cutánea, intolerancia gástrica, depresión medular, ototoxicidad y, también hepatotoxicidad en pacientes tratados simultáneamente con isoniacida u otros potenciales hepatotóxicos. Además, se han descrito cuadros graves de necrólisis epidérmica tóxica y síndrome de Stevens-Johnson en pacientes infectados por el VIH. Por ello la OMS recomendó sustituirla por el etambutol y actualmente sólo se utiliza en situaciones de multirresistencia y sin infección por el VIH.

## 2.13. CICLOSERINA

La D-cicloserina se obtiene de *Streptomyces orchidaceus* y *Streptomyces garyphalus* y es activa frente a las micobacterias y otros microorganismos. Es un análogo de la D-alanina y actúa interfiriendo en las fases tempranas de la síntesis de la pared bacteriana. La tasa de mutantes resistentes espontáneos en el complejo *M. tuberculosis* es de  $10^{-3}$ . Se absorbe bien por vía oral, lográndose picos en el suero de 10 mg/L, en 3-4 h, tras una dosis de 250 mg. La distribución corporal del fármaco es buena, incluso en el LCR. Sin embargo, su utilización está muy restringida en la actualidad, debido a su gran toxicidad produciendo psicosis (incluso tendencias suicidas), convulsiones, vértigo, neuropatías periféricas y reacciones alérgicas.

En general, no se recomienda realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* por diversos problemas técnicos y su difícil interpretación.

## 2.14. MACRÓLIDOS

Los macrólidos y sus derivados keto, los ketólidos (telitromicina), actúan inhibiendo la síntesis proteica mediante la unión en el túnel de salida de los péptidos en el ribosoma a nivel de la subunidad 50S. Esta unión impide el crecimiento de la cadena peptídica desde el centro peptidiltransferasa del ribosoma. Aunque los distintos fármacos del grupo se unen en lugares ligeramente diferentes, el efecto final es el mismo.

Los agentes más importantes del grupo en el tratamiento de las infecciones por micobacterias son la claritromicina y la azitromicina. Ambos son estructuralmente similares a la eritromicina, con modificaciones que mejoran su estabilidad, vida media, biodisponibilidad y concentraciones en los tejidos. En este último sentido, la azitromicina alcanza en los neutrófilos concentraciones hasta 1.000 veces superiores a las obtenidas en suero, mientras que la claritromicina alcanza niveles 4-5 veces superiores en los tejidos y hasta 20-30 veces en los macrófagos.

Se trata de antibióticos bacteriostáticos, y aunque apenas tienen actividad frente al complejo *M. tuberculosis*, son muy eficaces frente al complejo *M. avium*, así como *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. haemophilum* y micobacterias de crecimiento rápido, excepto *M. fortuitum*. En general, tienen una buena biodisponibilidad por vía oral y su principal efecto secundario es la intolerancia digestiva.

## 2.15. BETA-LACTÁMICOS

Los antibióticos betalactámicos incluyen una amplia variedad de fármacos, de los cuales sólo unos pocos se usan en el tratamiento de las infecciones por micobacterias. Éstos se reducen, esencialmente, a la cefoxitina (una cefamicina) y a las carbapenemas (imipenem o meropenem), siendo menos frecuente el uso de otros agentes de este grupo, como la asociación amoxicilina-ácido clavulánico.

Todos estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana mediante la inhibición irreversible de las PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*), imprescindibles en la síntesis de puentes peptídicos intermoleculares, esenciales para el mantenimiento estructural del peptidoglicano. Esta inhibición tiene efecto bactericida, causando la lisis celular.

Los antibióticos incluidos en este grupo tienen actividades variables, así como propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas muy diversas. Los descritos como potenciales agentes antimicobacterianos requieren su administración por vía parenteral, y sus principales efectos secundarios son las reacciones alérgicas y los efectos gastrointestinales derivados de su efecto sobre la microbiota intestinal.

### 2.16. COTRIMOXAZOL

El cotrimoxazol es un fármaco resultado de la combinación del trimetoprim y el sulfametoxazol. El trimetoprim actúa sobre el metabolismo del ácido fólico inhibiendo la dihidrofolato-reductasa. El sulfametoxazol actúa por su parte inhibiendo la dihidropteroato-sintetasa en el metabolismo del ácido para-aminobenzoico.

Es un fármaco con buena biodisponibilidad por vía oral, con efectos secundarios que incluyen trastornos gastrointestinales, así como trastornos hematopoyéticos potencialmente graves.

### 2.17. TETRACICLINAS Y TIGECICLINA

Las tetraciclinas (doxiciclina y minociclina) y las glicilciclinas (tigeciclina) inhiben la síntesis proteica mediante la unión con la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo como efecto principal el acceso del ARNt al ribosoma. Son antibióticos bacteriostáticos que se han empleado en el tratamiento de algunas micobacteriosis, con muy buena biodisponibilidad oral para las tetraciclinas, si bien la tigeciclina debe administrarse por vía parenteral, concentrándose en diversos tejidos (incluyendo hueso). Los efectos secundarios principales son gastrointestinales.

### 2.18. CLOFAZIMINA

La clofazimina es un colorante fenaínico que tiene una actividad bactericida débil contra *M. leprae*, pero que junto a la rifampicina y la dapsona constituye el tratamiento actual de la lepra multibacilar. El mecanismo de acción se desconoce pero se sabe que se une al ADN y que podría actuar mediante la quelación del hierro. Se absorbe por vía oral de forma variable, obteniéndose picos séricos de 0,7 a 1 mg/L tras una dosis de 100-300 mg y con una vida media larga de 60-70 días. El fármaco se distribuye en los tejidos grasos y en el sistema reticuloendotelial, percibiéndose su acción bactericida a los 50 días de iniciar su administración. Sus efectos adversos son el cambio de color (rosa o rojo) de la piel y conjuntiva y, en ocasiones, cierta

intolerancia digestiva. Aunque tiene actividad *in vitro* frente al complejo *M. tuberculosis* y otras MNT como *M. avium* complex, no existe evidencia clínica de su utilidad en el tratamiento de estas infecciones.

### 2.19. DAPSONA

Se trata de un compuesto sintético (4,4'-diaminodifenilsulfona) que actúa inhibiendo la síntesis del ácido fólico. Tiene actividad frente a *M. leprae*, *Pneumocystis jirovecii* y *Plasmodium* spp. Se absorbe bien por vía oral con buena distribución corporal, alcanzando concentraciones tisulares de 2 mg/L tras la administración de 200 mg, y con una vida media sérica larga (21-44 h). Los efectos secundarios son poco frecuentes, sobre todo cierta intolerancia digestiva y hemólisis dependiente de la dosis. Por todo ello y por su bajo coste es, junto a la rifampicina, un antimicrobiano de elección en el tratamiento de la lepra pauci y multibacilar.

### 2.20. NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

#### BEDAQUILINA

Es un fármaco de reciente incorporación al arsenal terapéutico de la TB. Hasta hace poco conocida como TMC207 o R207910, fue aprobada por la FDA en diciembre de 2012. Actualmente, por razones estratégicas solo se permite su uso en el tratamiento de la TB multirresistente. Es una diarilquinolina, grupo de fármacos próximos a las quinolonas en su estructura. No obstante su mecanismo de acción no es sobre la ADN girasa, sino sobre la ATP sintasa. Esta enzima es esencial en la producción de energía para el metabolismo de la bacteria. La bedaquilina actuaría sobre la cadena de transferencia de protones, alterando la actividad metabólica de la enzima. La bedaquilina es específica de la ATP sintasa de las micobacterias, por lo que no es activa frente a otras bacterias. Incluso en especies del mismo género la ATP sintasa puede presentar variaciones causantes de diferencias en la sensibilidad. Las CIM más bajas se observan frente a *M. tuberculosis* (0,030-1,2 mg/L). Es poco activa frente a *M. abscessus* y la actividad ante *M. avium* complex sería bacteriostática. No obstante, la mayoría de las especies de crecimiento rápido y de crecimiento lento son sensibles.

Su administración es por vía oral, con eliminación hepática y fecal. Presenta interferencias con fármacos que inhiben o inducen la actividad de la citocromo oxidasa CYP 3A4. Es el caso de algunos antirretrovirales inhibidores de las proteasas, que aumentan la concentración de la bedaquilina, al contrario de las rifamicinas

y algunos análogos de nucleósidos, que la disminuyen. Los efectos adversos más frecuentes son náuseas, artralgias y cefalea. Con menor frecuencia puede prolongar el intervalo QT, por lo que no es recomendable administrarla con otros fármacos que pueden producir el mismo efecto como los macrólidos, las quinolonas (especialmente el moxifloxacino), la clofazimina y el delamanid. Tampoco se recomienda durante el embarazo, la lactancia o en la edad pediátrica.

### DELAMANID

Es un nitro-dihidro-imidazoxazol que, junto a la bedaquilina, son los dos últimos fármacos introducidos en la lista de antituberculosos. Al igual que ésta última sólo se ha autorizado su uso en la TB multirresistente. Se administra en forma de profármaco, que precisa ser activado por acción de una enzima nitroreductasa. Su mecanismo de acción es inhibiendo la síntesis de los ácidos micólicos. Es activo frente al complejo *M. tuberculosis* con CIM de 0,012 mg/L. Ha demostrado actividad tanto frente a las micobacterias en crecimiento activo como en estado latente. La administración es por vía oral. Se elimina por vía hepática y fecal. Los efectos adversos más comunes son las alteraciones gastrointestinales, cefalea e insomnio. Más raramente alargamiento del intervalo QT, por lo que debe evitarse su uso junto a otros fármacos con el mismo efecto, como antidepresivos, antiarrítmicos, y antimicrobianos como macrólidos, clofazimina, quinolonas y bedaquilina.

## 3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX

La historia de las pruebas de sensibilidad frente a *M. tuberculosis* complex surge paralela al desarrollo del tratamiento farmacológico específico de la tuberculosis, que se inicia con el descubrimiento de la estreptomina en 1944. La constatación del fracaso que suponían, a largo plazo, las monoterapias reveló la repercusión que, de cara al control de esta enfermedad, iba a tener: 1) el desarrollo de resistencias por parte de *M. tuberculosis*; 2) la necesidad de disponer de métodos para poder detectarlas lo más precozmente posible; y 3) la eficacia de las estrategias de tratamiento combinado para combatirlas.

### 3.1. BASES MICROBIOLÓGICAS DEL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

El tratamiento antituberculoso se basa en la asociación de diversos fármacos durante un tiempo prolongado.

#### 3.1.1. Asociación de fármacos

La etapa antibiótica de la tuberculosis se inició con la estreptomina y poco después el PAS y la isoniacida. Rápidamente se observó que el tratamiento en monoterapia con estos fármacos lograba una mejoría clínica inicial seguida de una recaída de la enfermedad. Este fenómeno denominado por Dancey como “*Fall and Rise*”, se explicó por la *selección de bacterias resistentes*, tras la eliminación inicial de las sensibles.

La resistencia del complejo *M. tuberculosis* a los fármacos es de origen cromosómico. Se acepta que pueden surgir mutaciones espontáneas que causen resistencia sin exposición previa al tratamiento. Por otra parte, las mutantes pueden aparecer por la presión antibiótica en el curso de tratamientos inadecuados. En estudios llevados a cabo durante los años 1960 por Canetti, Rist y Grosset, se estableció la frecuencia de mutaciones espontáneas asociadas a cada fármaco. Así, aparecía una mutante resistente entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  bacterias para la isoniacida el etambutol y la estreptomina; entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$  para la rifampicina y entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  para la pirazinamida. La frecuencia teórica de mutantes resistentes para más de un fármaco sería la suma exponencial de las individuales de cada fármaco. Del mismo modo, se establecieron las poblaciones bacterianas presentes en las lesiones, desde  $10^3$ - $10^5$  en infiltrados de poca extensión hasta  $10^7$ - $10^9$  en cavidades. Como consecuencia de ello, es extremadamente improbable generar de manera espontánea, una mutación simultánea a más de dos fármacos.

#### 3.1.2. Tratamiento prolongado

En 1979, Mitchison describió una teoría para definir las poblaciones bacterianas existentes en las lesiones tuberculosas. Una primera población, *extracelular*, activa y creciendo a pH neutro, que sería la mayoritaria y frente a la cual la isoniacida sería el fármaco más activo. Una segunda población formada por *bacilos intracelulares*, menos activos y en ambiente ácido, donde la pirazinamida sería el fármaco más útil. Una tercera población, de *bacilos latentes* poco activos, en el interior de las *lesiones caseosas*. Probablemente la rifampicina sería el fármaco más efectivo a este nivel. Por último, quedaría una población muy minoritaria, formada por *bacilos durmientes*, inactivos durante períodos prolongados, en el curso de los cuales no serían sensibles a los fármacos. Las dos últimas poblaciones justificarían la larga duración del tratamiento. Esta última población *durmiente* sería la más propia de la TB latente y responsable de las reactivaciones. Aunque experimentalmente es muy complejo probar esta teoría, se sigue considerando válida en lo esencial, es

decir, la coexistencia de poblaciones con 4 situaciones metabólicas. No obstante, no puede explicar algunos hechos ciertos, como la respuesta al tratamiento de la TB latente con isoniácida durante 6-9 meses, un fármaco sólo activo frente a la población en crecimiento. Ello sólo podría entenderse por la presencia de una pequeña población latente que se activa durante periodos de tiempo muy cortos, pero a intervalos frecuentes. Estos ciclos de actividad se autolimitarían, sin generar lesiones ni enfermedad en la mayoría de casos. En este sentido, P.J. Cardona y colaboradores han desarrollado la *teoría dinámica*, basada en ciclos continuos de reinfección endógena a partir de la liberación de bacilos fagocitados por macrófagos cuando éstos cumplen su ciclo vital.

La primera pauta combinada se utilizó en 1958. Pocos años después, con la introducción de la rifampicina, el etambutol y más tarde de la pirazinamida, comenzaron los tratamientos eficaces y más cortos. Las pautas actuales incluyen 3-4 fármacos en una primera fase de ataque (2 meses) en la que se eliminan la mayoría de las bacterias de las lesiones y una segunda fase (4 meses) con dos fármacos, eficaz frente a la población latente, menos activa metabólicamente.

## 3.2. CONCEPTO DE RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS

### 3.2.1. Resistencia clínica

En términos generales se habla de resistencia cuando el tratamiento pierde parcial o totalmente su eficacia. Desde un punto de vista clínico, el paciente no evoluciona hacia la curación con persistencia o reaparición de los síntomas. El hecho de tener una cepa resistente implica cambios en el tratamiento, tanto en el número y tipo de fármacos como en la duración del mismo. Además, la garantía de curación es menor y la posibilidad de efectos adversos y de secuelas funcionales aumenta. Para el diagnóstico de sospecha de un caso de tuberculosis con resistencia a los fármacos se tienen en cuenta los siguientes criterios: 1) persistencia de los síntomas clínicos a los dos meses de tratamiento seguido correctamente; 2) recaída de la enfermedad poco después de finalizar el tratamiento; 3) persistencia de cultivos positivos a los cuatro meses de tratamiento o baciloscopias positivas a los dos meses de tratamiento en los países de baja renta donde no se haga cultivo; y 4) historia previa de tuberculosis.

### 3.2.2. Resistencia microbiológica

La confirmación definitiva de la resistencia antimicrobiana debe realizarse siempre con métodos microbiológicos.

La definición puramente microbiológica de la resistencia se basa en la realizada por Mitchison en 1962: “*Resistencia se define como una disminución de la sensibilidad de tal grado, como para estar seguros de que la cepa es diferente de una muestra de cepas salvajes que nunca hayan estado en contacto con el fármaco*”. En la actualidad se habla de resistencia cuando el 1% o más de la población bacteriana del complejo *M. tuberculosis* es resistente a una *concentración crítica* de un determinado fármaco, y se ha demostrado que existe una buena correlación clínica con todos los fármacos antituberculosos de primera línea: isoniácida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. Sin embargo, en el caso de los fármacos de segunda línea, no se ha demostrado en todos los casos.

Las *concentraciones críticas* de los fármacos antituberculosos se adoptaron por acuerdo internacional y representan las concentraciones más bajas de los diferentes fármacos que inhiben el crecimiento de las “cepas salvajes” (sensibles) del complejo *M. tuberculosis*, que nunca han estado expuestas a los mismos, mientras que no inhiben a las cepas procedentes de pacientes que no responden al tratamiento, consideradas resistentes. Las concentraciones críticas recomendadas para los fármacos fueron fijadas para el medio de Löwenstein-Jensen. Posteriormente fueron establecidas las concentraciones equivalentes de fármacos para el método de las proporciones en agar, utilizando otros medios como el 7H10 y 7H11 de Middlebrook y también para los medios líquidos utilizados por los sistemas comerciales automatizados (ver apartado 3.6). Por tanto, la concentración crítica de los diferentes antimicrobianos es la referencia que permite interpretar los resultados de las pruebas de sensibilidad llevados a cabo por diferentes métodos.

### 3.2.3. Clasificación epidemiológica de las resistencias

Desde un punto de vista epidemiológico es fundamental cuantificar las resistencias e identificar el origen. Así, la OMS, en el año 2000, definió las siguientes categorías: a) *Resistencia en casos nuevos*: cepas aisladas en pacientes que nunca han recibido tratamiento antituberculoso durante más de 1 mes. b) *Resistencia en casos tratados*: cepas aisladas en pacientes que previamente han recibido tratamiento antituberculoso durante más de un mes. c) *Multiresistencia*: resistencia conjunta al menos a la isoniácida y a la rifampicina. d) *Poliresistencia*: resistencia a más de un fármaco sin que estén incluidos isoniácida y rifampicina simultáneamente. e) *Resistencia combinada*: suma de todas las resistencias en un área determinada. Indica la car-

ga de cepas resistentes presentes en una comunidad. La denominación actual de resistencia en casos nuevos y previamente tratados es más adecuada que la anterior, ya que se basa en un criterio objetivo y no en la génesis última de la resistencia en cada caso, que muchas veces es imposible demostrar. Posee implicaciones epidemiológicas importantes debido a que se considera que la resistencia en casos previamente tratados es debida a deficiencias corregibles en el control de la enfermedad en un área determinada. La resistencia en casos nuevos sería debida a mutaciones espontáneas en el mismo paciente o al contagio a partir de cepas resistentes.

### 3.3. INDICACIONES DEL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD EN LA TUBERCULOSIS

Las pruebas de sensibilidad deberían realizarse al primer aislamiento de *M. tuberculosis* complex que se obtenga de cada paciente recién diagnosticado, así como ante la sospecha de fracaso clínico del tratamiento y ante la recidiva de la enfermedad. Además, cuando la tuberculosis afecte simultáneamente a más de un órgano, los estudios de sensibilidad deberían individualizarse para cada localización sin presuponer que el resultado vaya a ser siempre coincidente. Las pruebas iniciales de sensibilidad para *M. tuberculosis* complex deberían incluir todos los fármacos de primera línea: isoniácida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina, ya que esta selección de fármacos proporciona al clínico información sobre el esquema terapéutico actualmente recomendado para la mayoría de los pacientes. Como la resistencia a estos fármacos no es predecible e implicará modificaciones en el tratamiento, es esencial poder disponer de los resultados de las pruebas de sensibilidad en el menor plazo de tiempo posible. Los fármacos de segunda línea tradicionales (amikacina, capreomicina, clofazimina, cicloserina, etionamida, kanamicina y PAS) y los nuevos fármacos como las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino), el linezolid y, en determinados casos, la rifabutina, deberían ser evaluados siempre que un aislamiento de *M. tuberculosis* complex sea resistente a la isoniácida, rifampicina o a cualquier otro fármaco de primera línea, o cuando mediante técnicas moleculares se detecten mutaciones en genes que codifican resistencia a la isoniácida y/o rifampicina, o cuando se disponga de información clínico-epidemiológica que así lo aconseje.

### 3.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN LA TUBERCULOSIS

Las pruebas de sensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis* plantean dos problemas técnicos inherentes a las propias características de este microorganismo: su lento crecimiento en los medios de cultivo y la distribución irregular de las colonias generadas. Inicialmente no existía consenso para la realización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a *M. tuberculosis*, cada laboratorio seguía sus propios criterios, a menudo se utilizaban distintas concentraciones de fármacos y diferentes puntos de corte.

En 1960, la OMS planteó la necesidad de establecer estándares internacionales para la definición y determinación de la resistencia a los fármacos que permitieran obtener resultados más fiables y reproducibles. Para ello, a lo largo de esa década organizó varias reuniones de expertos con el objetivo de definir la metodología más adecuada para la realización de dichos estudios. Como resultado, se publicaron una serie de conclusiones generales: 1) La resistencia a un fármaco puede definirse tanto en términos bacteriológicos como analizando la respuesta del paciente a la quimioterapia. 2) Una definición precisa de resistencia desde el punto de vista clínico es muy difícil establecer. 3) Para definir la resistencia bacteriológica se siguen los criterios establecidos por Mitchison. 4) Existe una buena correlación entre la detección en el laboratorio de resistencias a los fármacos antituberculosos de primera línea y la disminución de la respuesta clínica. 5) Se establecieron tres métodos válidos para el antibiograma en la tuberculosis: el método de las concentraciones absolutas, el método de la relación de resistencias y el método de las proporciones múltiples. Inicialmente, en los tres procedimientos se empleaba el mismo medio de cultivo, el medio de Löwenstein-Jensen sin fécula de patata al cual se le añadían las soluciones de fármacos (isoniácida, estreptomina y PAS) antes de proceder a la coagulación del mismo.

Los métodos actuales para evaluar la sensibilidad de *M. tuberculosis* complex en general se basan en el método de las proporciones y se consideran equivalentes al método de referencia establecido por Canetti, Rist y Grosset, que se sustenta en la definición bacteriológica de resistencia a los fármacos.

### 3.5. MÉTODOS BASADOS EN MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS

#### 3.5.1. Método de las concentraciones absolutas

El método de las concentraciones absolutas, descrito por Meissner, se basa en la comparación del número

de colonias que crecen en presencia del fármaco con el número de colonias que crecen en medio de cultivo sin el fármaco. Con este método solamente se obtiene un resultado satisfactorio cuando el tamaño del inóculo está bien establecido y siempre que la concentración crítica del fármaco haya sido bien determinada por el laboratorio con respecto a una muestra adecuada de cepas salvajes. El establecimiento de las concentraciones críticas, permite disponer de una referencia para considerar una cepa como sensible o resistente. En este procedimiento es necesaria una estandarización minuciosa de toda la metodología empleada y controles de calidad permanentes.

El método requiere la preparación de una concentración de fármacos uniforme en el medio de cultivo y una rigurosa comprobación de cada lote, establecer las concentraciones mínimas de cada fármaco, frente a las que la cepa de referencia H37Rv, e incluso las cepas salvajes, son capaces de multiplicarse. También se requiere un especial cuidado en la elección de un tamaño del inóculo adecuado. Con este método, el resultado dependerá del tamaño del inóculo. La composición de un cultivo del complejo *M. tuberculosis* no es uniforme en cuanto a la proporción de bacilos sensibles y resistentes, pero estadísticamente se corresponde con una curva de distribución normal, por lo que habrá unas concentraciones de fármaco para las cuales todos los microorganismos serán resistentes y otras concentraciones para las que sólo una proporción mayor o menor de bacilos serán resistentes. El inóculo debe por tanto ser seleccionado de forma que pueda contener suficientes bacilos como para poder evidenciar la presencia de un 1% de microorganismos resistentes.

### 3.5.2. Método de la relación de resistencias

El método de la ratio de resistencia, descrito por Mitchison, compara la CIM (concentración inhibitoria mínima) de una determinada cepa con la de una cepa de referencia. En el método de la relación de resistencias, la obtención de resultados satisfactorios también depende de la adecuada estandarización de los fármacos, del inóculo y de las cepas control, pero no es necesario definir las concentraciones críticas, ya que los resultados se comparan y validan en relación a los obtenidos con la cepa de control. La denominada "relación de resistencia" es el cociente entre la CIM de la cepa problema y la CIM de la cepa estándar H37Rv. Una relación de resistencia igual o inferior a 2 indica que la cepa es sensible a ese fármaco. Una relación de resistencia igual o superior a 8 indica que la cepa es resistente. Una relación de 4 señala que la cepa está

muy en el límite de la sensibilidad y debería repetirse la prueba; si en la repetición se vuelve a obtener una relación de 4 se considera definitivamente como resistente. Este método requiere el empleo de más medio de cultivo, los resultados son menos fiables, y a menudo son necesarias las repeticiones debido a que un buen número de cepas presentan resultados iniciales dudosos.

### 3.5.3. Método de las proporciones múltiples

Fue descrito por Canetti, Rist y Grosset, y está basado en la definición bacteriológica de resistencia a los fármacos. Todas las cepas del complejo *M. tuberculosis* contienen algunos bacilos que son resistentes a los fármacos antituberculosos. Sin embargo, en las cepas resistentes, la proporción de estos bacilos es considerablemente más alta que en las cepas sensibles. El método de las proporciones consiste en calcular la proporción de bacilos resistentes que están presentes en un cultivo. Utilizando dos diluciones de bacilos, una más alta y otra más baja, se inoculan en medios de cultivo con y sin antibiótico, con el fin de obtener colonias cuantificables. La relación entre el número de colonias obtenidas en el medio con antibiótico y el número de colonias obtenidas en el medio sin antibiótico, indica la proporción de bacilos resistentes (capaces de crecer bajo el efecto del fármaco) presentes en el cultivo. Por debajo del 1%, la cepa se clasifica como sensible y por encima, como resistente. La resistencia del microorganismo es clínicamente significativa cuando al menos un 1% del total de la población bacteriana es resistente a la concentración crítica, es decir, la concentración más baja a la que los bacilos sensibles son incapaces de crecer en presencia de ese fármaco. Cualquier proporción de resistencia menor no suele tener significación desde el punto de vista clínico. El método de las proporciones, con respecto a los métodos anteriores, es el más exacto y el que menos falsos resultados proporciona, por lo que es el más ampliamente utilizado en todo el mundo. Inicialmente la técnica se diseñó para su utilización en medio de Löwenstein-Jensen y para los fármacos de primera línea, exceptuando la pirazinamida. Posteriormente el método de las proporciones se ha sido adaptado a diferentes medios de cultivo y en EEUU se estandarizó para los medios de 7H10 y 7H11 de Middlebrook, suplementados con OADC y glicerol y dispensados en placas compartimentadas. Las concentraciones de antibióticos utilizadas varían en algunos casos dependiendo del medio de cultivo empleado; así el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomienda analizar las siguientes concentraciones críticas: isoniácida 0,2 mg/L; rifampicina 1 mg/L; estreptomina 2 mg/L; etambutol 5 mg/L (en

medio 7H10 de Middlebrook) o 7,5 mg/L (en medio 7H11 de Middlebrook). Se emplean dos diluciones del inóculo en cada sector y además un compartimento se utiliza como control sin fármaco. Los resultados se interpretan a los 21 días de incubación a 37°C.

Los factores limitantes más importantes son el largo período de incubación y la estandarización del inóculo, debido a la tendencia del complejo *M. tuberculosis* a formar agregados no homogéneos. En el caso de emplear el medio de Löwenstein-Jensen, como base para el método de las proporciones, el procedimiento resulta más laborioso; además este medio coagula a una temperatura más elevada (90°C) lo que puede alterar las propiedades de los antimicrobianos. La complejidad inherente a estos métodos, pero sobre todo los requerimientos de personal y las medidas de contención necesarios para llevarlos a cabo, los ha relegado históricamente a los centros de referencia.

#### 3.5.4. Método del Epsilon test

Las tiras en gradiente (Etest entre otros) se utilizan en el método de gradiente de difusión antimicrobiano, que combina los principios de la difusión en disco y la dilución en agar en el estudio de la sensibilidad *in vitro*. Es una técnica cuantitativa para determinar, mediante lectura directa, la concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos. El principio del test del épsilon, descrito en 1988, consiste en una tira de plástico no porosa de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora una escala de interpretación de las concentraciones utilizadas expresadas en mg/L e impresa en el anverso de la tira, y un gradiente continuo exponencial de agente antimicrobiano inmovilizado en el reverso. Cada tira cubre 29 concentraciones diferentes. Los intervalos de concentración están óptimamente diseñados para corresponder a niveles y límites de CIMs clínicamente relevantes. Cuando se aplica una tira de Etest en una superficie de agar inoculado, el gradiente antimicrobiano se transfiere inmediatamente a la matriz de agar, creando un gradiente continuo y exponencial de concentraciones de agente antimicrobiano debajo del eje lineal del material de soporte. Tras la correspondiente incubación, se forma un halo de inhibición con forma de elipse simétrica centrada a lo largo de la tira. El punto de intersección entre el borde de la zona de inhibición y la tira de soporte indica la concentración inhibitoria mínima en mg/L.

Desde octubre de 1991, cuando el Etest fue aprobado por la FDA para su uso en los EEUU ha sido evaluado en diferentes estudios clínicos. Se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la

sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM en muchos microorganismos, en especial los denominados “fastidiosos” o nutricionalmente exigentes, incluyendo *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos nutricionalmente deficientes, *Enterococcus* spp. con resistencia elevada a aminoglicósidos, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y bacterias anaerobias. Complementa al método de difusión en disco y a los sistemas automatizados en aquellas áreas de la microbiología en las cuales existe falta de consenso para la interpretación de los resultados, o cuando éstos son cuestionables o no reproducibles. Sin embargo, en el caso de *M. tuberculosis* complex los resultados de los escasísimos trabajos publicados no han sido concluyentes. Para las pruebas de sensibilidad en *M. tuberculosis* se precisa medio 7H11 de Middlebrook suplementado con 5% de glicerol y 10% de OADC. El tamaño del inóculo debe ser lo más amplio posible, idealmente superior al nº3 de la escala de McFarland (aunque en la práctica el impacto de las variaciones del tamaño del inóculo sobre este método es bajo). Una vez inoculadas las placas, se precisa una fase de preincubación de 24 h antes de colocar las tiras (una tira por cada placa de 90 mm, y además una placa sin tira como control). Las placas se depositan en bolsas permeables al CO<sub>2</sub> y se incuban 10 días antes de proceder a la lectura de resultados.

### 3.6. MÉTODOS BASADOS EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS

Uno de los objetivos más reiterados durante las dos últimas décadas es que los laboratorios de microbiología deberían de poder informar los resultados de sensibilidad a fármacos de primera línea para *M. tuberculosis* complex en un plazo no superior a los 30 días desde la recepción de la muestra. Idealmente, los resultados deberían estar disponibles de 7 a 14 días tras el aislamiento de *M. tuberculosis* complex. Por este motivo, en la mayoría de países industrializados, se recomiendan los métodos para la realización de pruebas de sensibilidad basados en medios de cultivo líquidos automatizados, por tener unos periodos de incubación mucho más cortos. Cualquier sistema comercial que se utilice debe haber demostrado previamente que los resultados obtenidos se correlacionan con los obtenidos utilizando el método de referencia de las proporciones en agar. Los medios líquidos presentan, frente a los cultivos sólidos, ventajas en aspectos clave como el tiempo de incubación, la estandarización del inóculo

y la lectura automatizada o semiautomatizada. Actualmente, se citan tres métodos basados en el cultivo de medios líquidos para la realización de las pruebas de sensibilidad indirectas de *M. tuberculosis* complex: el sistema radiométrico BACTEC® 460TB (Becton Dickinson); y dos sistemas no radiométricos BACTECT™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson) y VersaTREK® (Thermo Scientific). Los tres han sido avalados por el CLSI para las pruebas de sensibilidad en *M. tuberculosis* complex a los fármacos de primera línea.

### 3.6.1. Método radiométrico BACTEC® 460TB

El sistema radiométrico BACTEC® 460TB fue el método de referencia por excelencia durante las décadas de 1980 y 1990. Se basa en la utilización de viales BACTEC® 12B, que incorporan ácido palmítico marcado con C<sup>14</sup>, a los que se les añaden los diferentes fármacos en cantidades adecuadas que permiten analizar las concentraciones críticas a las que se va a enfrentar la cepa objeto de estudio en cada uno de los viales empleados. Este sistema detecta cuantitativamente la cantidad de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> producto del metabolismo bacteriano en términos de índice de crecimiento (*growth index*; GI), siendo la cantidad de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> proporcional al grado de crecimiento. Este sistema puede ser usado para todos los fármacos de primera línea y segunda línea. La estandarización del inóculo se logra utilizando el índice de crecimiento con una determinada lectura radiométrica indicada por el sistema detector. Como control se utiliza una dilución de 1:100 a partir del inóculo final (el inóculo sin diluir sirve para monitorizar la cinética de crecimiento). Los viales se leen diariamente, un mínimo de 4 días, hasta que el vial de control alcanza un GI > 30, interpretándose la sensibilidad y resistencia según la progresión de las lecturas de crecimiento (GI) respecto al control sin antibiótico. Con este sistema el tiempo de incubación se acortó, pudiendo obtener los resultados en 5-12 días. El mayor inconveniente es el empleo de isótopos radiactivos y ser un sistema semiautomático. Por estos motivos este método ha sido retirado, siendo sustituido por los sistemas no radiométricos.

### 3.6.2. Métodos no radiométricos en sistemas de cultivo automatizados

En las últimas dos décadas se han ido implantando diversos sistemas no radiométricos para la realización de las pruebas de sensibilidad. Los disponibles en la actualidad son el BACTECT™ MGIT™ 960 y el VersaTREK/ESP Culture System II®. Utilizan el medio de cultivo Middlebrook 7H9 modificado, y el crecimiento se evidencia mediante la detección del consumo de O<sub>2</sub> o la producción de CO<sub>2</sub>. El más utilizado es el sis-

tema MGIT™ 960, que ha demostrado un rendimiento similar al radiométrico, al igual que el VersaTREK/ESP Culture System II®. Cada fabricante suministra los fármacos para SIRE (estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol) y pirazinamida para realizar las pruebas de sensibilidad, que una vez reconstituidos son dispensados en los diferentes viales de cultivo destinados a cada fármaco. Además debe incluirse un vial sin fármaco como control de crecimiento diluido al 1:100. Las concentraciones críticas iniciales y secundarias que se analizan con estos sistemas, vienen predeterminados por el fabricante para los fármacos de primera línea. No obstante, también es posible analizar concentraciones críticas de otros fármacos de segunda línea si se dispone de sustancia valorada. Sin embargo conviene recordar que no siempre existe consenso para los puntos de corte de estos fármacos ni para la metodología empleada.

Estos sistemas incorporan un algoritmo de interpretación de los resultados que simplifica la emisión de los informes. Las ventajas principales de estos sistemas son la detección totalmente automatizada y la ausencia de radiactividad en el proceso. Como inconvenientes cabe señalar la escasa flexibilidad en la valoración de las lecturas de crecimiento.

### 3.6.3. Determinación de sensibilidad a la pirazinamida

Para que la determinación de la sensibilidad a la pirazinamida sea fiable, el pH del medio de cultivo debe adecuarse a las condiciones de pH 5,5 para permitir así la acción del fármaco. Sin embargo hasta un 10% de los aislamientos de *M. tuberculosis* son incapaces de crecer a este pH, lo cual hace difícil su interpretación. Este problema es más importante con el medio de Löwenstein-Jensen y por ello se realizó una adaptación en agar 7H10 de Middlebrook a pH 5,5, sin ácido oleico, ya que a este pH, este ácido tiene un efecto inhibitorio. Sin embargo, las dificultades de crecimiento en algunas cepas han persistido. En 1985, Heifets y cols, adaptaron las pruebas de sensibilidad a la pirazinamida al sistema radiométrico en BACTEC® 460TB, elevando la concentración crítica a 100 mg/L en medio de cultivo 7H12 de Middlebrook a pH 5,95, obteniendo resultados equivalentes. Con el método radiométrico se lograba un crecimiento de la práctica totalidad de las cepas y aunque durante mucho tiempo ha sido considerado el método de referencia para la detección de sensibilidad a este fármaco, en la actualidad se encuentra descatalogado. Existen sistemas alternativos automáticos y no radiométricos (sistema BACTECT™ MGIT™ 960 PZA y sistema VersaTREK® PZA) que rea-

lizan el estudio de la pirazinamida, aunque con resultados no tan óptimos como los obtenidos con el método radiométrico BACTEC® 460TB.

### 3.7. MÉTODOS DE SENSIBILIDAD ALTERNATIVOS

Se han diseñado diferentes procedimientos fenotípicos con la intención de determinar la resistencia a los fármacos de una forma más rápida y/o más sencilla que con los métodos convencionales, y sobre todo más económica.

#### 3.7.1. Métodos basados en micobacteriófagos

Hace unos años comenzaron a utilizarse los bacteriófagos en el terreno de las micobacterias, para la identificación de *M. tuberculosis* y pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos directamente de muestra. Desde 1947 se han descrito más de 250 micobacteriófagos. No obstante, sólo dos métodos, el LRP (*Luciferase Reporter Phage*) y el FASTPlaqueTB™ (BIOTEC) o PhageTeK MB® (Organon Teknika) han demostrado tener cierta utilidad clínica. Estos métodos se diferencian básicamente en la detección de las células micobacterianas infectadas por el fago. En el LRP se utiliza la emisión de luz que es codificada por el gen de la luciferasa, el cual se encuentra incorporado en el genoma del fago. Esta enzima es un indicador de la presencia de células micobacterianas viables. En el FASTPlaqueTB™ o PhageTeK MB®, la detección se basa, tan sólo, en la presencia de múltiples células micobacterianas infectadas viables tras una amplificación fágica (micobacteriofago D29) en *M. smegmatis*.

Cuando se añaden los fagos a un cultivo en presencia de antibiótico, estos infectarán únicamente a las micobacterias viables, que serán las resistentes a dicho antibiótico. Ambos métodos se han aplicado en las pruebas de sensibilidad a la isoniacida y, sobre todo a la rifampicina. Aunque en general, se trata de unas técnicas rápidas (48 h), sencillas (que requieren poco entrenamiento) y relativamente económicas, los diversos problemas de sensibilidad y especificidad, así como la alta tasa de contaminaciones (3-36% con promedio de 20%) observada en los estudios realizados, indican que aún es necesario perfeccionar este tipo de metodología.

#### 3.7.2. Citometría de flujo

Esta metodología utiliza colorantes de ácidos nucleicos permeables a nivel celular (por ejemplo, SYTO 16) que evidencian un incremento de la fluorescencia

cuando se unen a estos ácidos. Las micobacterias viables (los controles y las resistentes a los fármacos) presentarán una señal fluorescente en comparación con las sensibles a los fármacos (no viables). Por motivos de seguridad suelen inactivarse todas previamente por calor sin que la tinción de las diferentes poblaciones se vea afectada. Suelen emplearse simultáneamente colorantes que no tiñen las micobacterias para descartar posibles interferencias por contaminación bacteriana. Previa incubación de 10 días, de una suspensión de micobacterias equivalente al nº 1 de la escala de McFarland, se procede a inocular los viales de caldo 7H9 de Middlebrook con los diferentes fármacos y los controles correspondientes, que se incubarán 72 h más. Una vez completada la incubación se inactivan todos en autoclave y se centrifuga para obtener el sedimento que será utilizado en el procedimiento de tinción y lectura en el citómetro. Uno de los mayores inconvenientes de esta metodología es su elevado coste por el equipamiento requerido.

#### 3.7.3. Microdilución

Sin ser el método de referencia en el complejo *M. tuberculosis*, existe la posibilidad de realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* mediante microdilución en caldo. Además de poder hacerlo de forma “casera” (*home made*), existe en la actualidad un producto comercial (MYCOTB sensititre® plates; TREK Diagnostics), en el que se incluyen diversos fármacos liofilizados con unos intervalos de concentraciones para establecer la CIM de cada uno de ellos. Este sistema permite analizar fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin) y segunda línea (amikacina, kanamicina, rifabutina, ofloxacino, moxifloxacino, etionamida, cicloserina, PAS) de manera simultánea. La CIM se corresponde con la menor concentración de cada antimicrobiano en la que no se detecta crecimiento visible. Se trata de un método sencillo y económico, cuya mayor dificultad reside en la lectura e interpretación de las CIMs, derivada del crecimiento no homogéneo de estos microorganismos.

#### 3.7.4. Prueba de la nitrato reductasa (*nitrate reductase assay, NRA*)

Es una prueba no comercial que se basa en la capacidad del complejo *M. tuberculosis* para reducir los nitratos a nitritos. Para ello se emplean tubos de Löwenstein-Jensen (L-J) que incorporan KNO<sub>3</sub>. Se trabaja con dos tamaños de inóculo: uno será equivalente al nº1 de la escala de McFarland para los tubos de L-J que contienen los fármacos, y el otro está diluido al 1:10 para los tubos de control (sin fármaco). Tras una incubación de 7-14 días a 37°C, se estudia la posi-

ble reducción de los nitratos con reactivos específicos (diclorhidrato de n-1-naftil-etilendiamina y ácido sulfanílico) que indicaría, en caso positivo (color magenta), la presencia de micobacterias viables y, por tanto, resistencia al fármaco estudiado. Esta técnica se puede utilizar directamente en muestras respiratorias, con baciloscopia positiva, o como una prueba indirecta a partir de cultivos positivos, que no sería más rápida que las pruebas de sensibilidad clásicas en medios sólidos. En general, es una técnica con buena sensibilidad (95-98%) y especificidad (99-100%), sencilla y económica, y que está contemplada por la OMS para el cribado de la sensibilidad a la isoniacida y a la rifampicina en países de bajos recursos económicos. Estas se deberán realizar en laboratorios de referencia, con la bioseguridad, dotación y conocimientos adecuados para el manejo de este tipo de microorganismos.

### 3.7.5. Observación microscópica de la sensibilidad a los fármacos (*microscopic-observation drug-susceptibility*, MODS)

Es un método no comercial desarrollado en Perú y que se basa en la observación de la formación de cuerdas (*cord factor*), características del complejo *M. tuberculosis*, cuando crece en los medios líquidos, y que son visualizadas tempranamente mediante un microscopio de luz invertida. Esta técnica ha sido diseñada para la detección rápida y sencilla de la sensibilidad a la isoniacida y a la rifampicina. Se lleva a cabo en medio líquido (7H9 de Middlebrook suplementado con casitona, glicerol, OADC y PANTA) en placas de microdilución. Unos pocillos tendrán los fármacos en concentraciones críticas y otros de control sin fármacos. Tras la inoculación, la placa se tapa y se incuba con CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, con un microscopio invertido a 40x, se examinará a las 48 h la posibilidad de contaminaciones y, a partir del 5º día, en busca de la presencia de cuerdas (micobacterias viables). Una cepa se considerará resistente a los fármacos incluidos en los pocillos en los que se desarrollen cuerdas. Los resultados suelen estar disponibles entre 7 y 14 días. Debido a los buenos datos de sensibilidad (95-98%), especificidad (96-100%), así como simplicidad y bajo coste de la técnica, ha llevado a que la OMS la considere una prueba rápida de cribado para la isoniacida y rifampicina en países con bajos recursos. No obstante, por las peculiaridades del método, es preciso que se tengan y se sigan rigurosamente todas las medidas de bioseguridad adecuadas.

### 3.7.6. Prueba de microtitulación con resazurina (*resazurin microtiter assay*, REMA)

Se trata de un método indirecto y no comercial, que se fundamenta en la detección de cambios de color en

el medio de cultivo, condicionados por la oxidación-reducción de la resazurina. Para ello se utiliza el caldo 7H9 de Middlebrook (suplementado con casitona, glicerol, OADC y PANTA) en placas de microdilución, con unos pocillos con diversas concentraciones de antimicrobianos y otros de control sin ellos. Tras la inoculación de la placa y 7 días de incubación a 37°C, se añade una solución de resazurina a todos los pocillos, volviendo a incubar la placa 1 noche más. La presencia de un cambio de color de azul (estado oxidado) a rosa (estado reducido) es indicativo de crecimiento micobacteriano. La CIM corresponderá a la menor concentración de un fármaco determinado en la que no se produce cambio de color. Este método ha demostrado una buena sensibilidad (96-99%) y especificidad (97-99%), además de ser sencillo y económico. Por ello la OMS también lo considera una alternativa en países de baja renta *per capita*, para la detección de la resistencia a la isoniacida y rifampicina en el complejo *M. tuberculosis*, aunque no sea más rápido en la obtención de resultados que los métodos convencionales de sensibilidad en medio líquido, y que deba realizarse en laboratorios de referencia con las medidas de seguridad y experiencia necesarias.

### 3.7.7. Prueba del aliento (*breath test*)

Se han propuesto dos tipos de pruebas: 1) las fenotípicas que detectan transformaciones químicas de isótopos estables o la generación de productos únicos o cantidades alteradas de diferentes compuestos (antígenos y metabolitos) del microorganismo, del hospedador o de ambos. Se ha demostrado que la actividad ureasa del complejo *M. tuberculosis* podría ser explotada con fines diagnósticos, pero la especificidad se ve lastrada debido a que otros microorganismos comparten esa misma cualidad. Se ha intentado mejorar la especificidad mediante el uso concomitante de inhibidores no absorbibles de la ureasa, y también mediante el empleo, por vía inhalatoria, de urea marcada. Aunque todo ello sin olvidar que las pruebas del aliento fenotípicas no pueden discriminar el perfil de sensibilidad de la cepa infectante. 2) las pruebas genotípicas que detectan ADN del patógeno en el aliento exhalado no han tenido éxito hasta el presente en el caso del complejo *M. tuberculosis*. En general se trata de un método interesante pero que aún no se encuentra validado para su implementación en la rutina asistencial.

### 3.7.8. Prueba de la capa fina de agar (*thin-layer agar assay*, TLA)

Se basa en la detección microscópica de crecimiento micobacteriano temprano a partir de un medio sólido (7H11 de Middlebrook) con y sin fármacos. Se puede

detectar el crecimiento entre 9 y 14 días. La interpretación de los resultados se hace por comparación con los controles. Hasta la actualidad la evidencia científica es escasa y se circunscribe a la isoniazida y rifampicina. Así la OMS no la ha considerado, de momento, una alternativa a las pruebas de sensibilidad convencionales para la detección de la resistencia antimicrobiana en el complejo *M. tuberculosis*.

## 4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN LAS MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS

### 4.1. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO LENTO

Se han descrito aproximadamente 70 especies de micobacterias de crecimiento lento. La mayoría son de baja o escasa virulencia, y aunque muchas de ellas pueden aislarse en muestras clínicas, no siempre serán causantes de patología. El manejo clínico y el tratamiento únicamente serán necesarios cuando se trate de aislamientos clínicamente significativos. Sólo en esta situación estará indicada la realización de pruebas de sensibilidad. La significación se establece de acuerdo a criterios que tienen en cuenta la localización clínica, el estado inmunitario y la patología de base del paciente, datos epidemiológicos, así como el tipo de especie y en número de muestras en que se aísla. También hay que tener en cuenta los aspectos microbiológicos indicativos de la concentración bacteriana, como la baciloscopia, o el número de colonias aisladas y/o el tiempo de positividad de los cultivos. La decisión de realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos debe tomarse de forma conjunta entre los expertos del laboratorio de Microbiología y del servicio clínico responsable del cuidado y tratamiento del paciente.

Gran parte de las especies se han descrito a partir de 1990, por lo que la casuística de muchas de ellas no es lo suficientemente amplia como para establecer recomendaciones. Por este motivo las guías internacionales, sobre todo el CLSI únicamente establecen recomendaciones para el grupo *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii* y *M. marinum*, así como unas indicaciones generales para algunas de las restantes.

#### 4.1.1. Recomendaciones para *Mycobacterium avium* complex (MAC)

El complejo *M. avium* (MAC), inicialmente compuesto por dos especies, *M. avium* y *Mycobacterium intracellulare*,

tiene una taxonomía compleja y aún sujeta a modificaciones. *M. intracellulare* y *M. avium* continúan siendo las especies más importantes, aunque se considera que esta última está formada por cuatro subespecies, *M. avium* sub. *avium*, *M. avium* sub. *paratuberculosis*, *M. avium* sub. *silvaticum* y *M. avium* sub. *hominis*. La mayoría de los aislamientos en humanos corresponden a *M. avium* sub. *hominis*. La tecnología molecular ha evidenciado aproximadamente 30 grupos taxonómicos alrededor del complejo. Siete de estos grupos han sido aceptados como especies, *Mycobacterium colombiense*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium vulneris*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense*, *Mycobacterium arosiense* y *Mycobacterium bouchedurhonnense* y propuestos como integrantes de MAC. Diversos estudios que han comparado las especies *M. avium* y *M. intracellulare* sugieren que el primero se relacionaría más con infecciones diseminadas en pacientes VIH seropositivos y con pacientes jóvenes, mientras que *M. intracellulare* se observaría más en pacientes con edad superior a 50-60 años. Se ha sugerido que *M. chimaera* poseería una virulencia elevada. No obstante, la diferenciación de los integrantes del complejo es difícil debido a su elevada similitud. Así, por ejemplo, las subespecies de *M. avium* poseen idéntica secuencia del gen16S ARNr y únicamente 9 bases separan *M. avium* de *M. intracellulare*. Las especies *M. intracellulare* y *M. chimaera* solo se diferencian en una base.

El tratamiento de MAC se basa en el uso de la claritromicina como fármaco principal, y de etambutol y rifampicina (o rifabutina) como coadyuvantes. La amikacina puede usarse como cuarto fármaco. La resistencia a los macrólidos se desarrolla sobre todo con monoterapia o con biterapia. La mejor prevención para la resistencia es asociar macrólidos al etambutol y a la rifampicina. No está claro que las combinaciones que incluyan otros fármacos cumplan esa función. Otros fármacos que pueden tener algún uso en el tratamiento cuando se presentan resistencias son moxifloxacino, linezolid y aminoglucósidos. No hay suficiente información que vincule una respuesta específica al tratamiento de las diferentes especies y subespecies del complejo.

La realización de las pruebas de sensibilidad está indicada en aislamientos basales de pacientes con clínica significativa, así como en los que han recibido previamente tratamiento con macrólidos o que los están recibiendo y no presentan una buena respuesta clínica, o bien en los casos de recidiva.

**Tabla 1. Criterios de interpretación de las pruebas de sensibilidad del complejo *M. avium* mediante microdilución en caldo.**

Antimicrobiano	CIM (mg/L)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
<b>Amikacina<sup>1</sup></b>	≤ 32		≥ 64
<b>Claritromicina</b>			
- Microdilución (pH 7,3-7,4) <sup>2</sup>	≤ 8	16	≥ 32
- Radiométrico (pH 7,3-7,4) <sup>3</sup>	≤ 4	8-16	≥ 32
- Radiométrico (pH 6,8) <sup>3</sup>	≤ 16	32	≥ 64
<b>Moxifloxacino</b>	≤ 1	2	≥ 4
<b>Linezolid</b>	≤ 8	16	≥ 32

<sup>1</sup> La CIM para la amikacina no está definida. Por asimilación a otras especies podría considerarse resistente > 32 mg/L.

<sup>2</sup> Medio de Mueller-Hinton ajustado on cationes y suplementado con OADC o ADC.

<sup>3</sup> Medio 12B radiométrico (BACTEC 460TB). Algunos autores consideran las mismas CIM para los medios del BACTEC MGIT 960 y VersaTREK.

A pesar de que el tratamiento se basa en el uso de combinaciones antibióticas, únicamente se ha demostrado una correlación clínica con las pruebas *in vitro* para los macrólidos, por lo que el CLSI recomienda en sus guías de 2003 y 2011 que la determinación de la sensibilidad *in vitro* sólo debe realizarse para estos fármacos. La *American Thoracic Society* (ATS) y otros autores apoyan el mismo criterio. No obstante, cuando se presenta resistencia a la claritromicina es razonable analizar otros fármacos, básicamente moxifloxacino, linezolid y aminoglucósidos. No deben incluirse antituberculosos de primera línea como rifamicinas, etambutol, isoniacida y pirazinamida.

Si persisten los cultivos positivos, las pruebas de sensibilidad *in vitro* deben repetirse cada 3 meses en casos de infección diseminada y cada 6, en casos de infección pulmonar crónica.

Las recomendaciones actuales proponen la dilución en caldo de cultivo como método de referencia para las pruebas de sensibilidad, ya sea por macrodilución o microdilución. El método más extendido es la microdilución con el medio de cultivo Mueller-Hinton ajustado con cationes (MHCA) y suplementado con OADC o ADC, utilizando placas de microtitulación. La actividad de la claritromicina es muy sensible al medio de cultivo y a su pH, de forma que las CIMs generalmente utilizadas como puntos de corte, para interpretar sensibilidad o resistencia, corresponden a un medio MHCA a

pH ligeramente básico de 7,3-7,4, ya que la actividad del fármaco sería mayor (tabla 1).

Los cultivos de MAC en medio sólido presentan habitualmente colonias pleomorfas. Al realizar las pruebas de sensibilidad, si puede partirse de un medio de cultivo sólido es importante seleccionar las colonias transparentes, si están presentes, ya que éstas son las más resistentes y reflejaran con más exactitud la situación real.

Las cepas aisladas en pacientes no tratados previamente responden a la claritromicina si la CIM es igual o inferior a 8 mg/L. Muy raramente serán resistentes o de sensibilidad intermedia. Las cepas aisladas de recidivas son las que pueden exhibir resistencia. Si la CIM es superior o igual a 32 mg/L, es casi seguro que no responderán al tratamiento. Las cepas con CIM intermedia pueden indicar la presencia de poblaciones mixtas, por lo que deben ser objeto de seguimiento más estrecho ante el riesgo de desarrollar resistencia. El método de macrodilución se ha utilizado sobre todo con el sistema radiométrico BACTEC® 460TB. Pero al estar actualmente descatalogado, se han utilizado los mismos criterios para los sistemas BACTEC™ MGIT™ 960 y VersaTREK®. Estos medios de cultivo están ajustados a pH 6,8. Pueden utilizarse adaptando los puntos de corte a este pH o modificándolo a pH 7,3-7,4. Los puntos de corte para el moxifloxacino y el linezolid se exponen en la tabla 1. Sin embargo no existe

consenso para los puntos de corte de los aminoglucósidos. Por asimilación a la utilizada en otras especies, se consideraría resistencia a la amikacina si la CIM es igual o superior a 32 mg/L.

Actualmente existe una técnica comercial de microdilución en placas de microtitulación (SLOMYCO, SENSITITRE®, Thermo Scientific), que permite realizar la sensibilidad *in vitro* de una forma sencilla y reproducible con una incubación estándar de 7 días. Es importante seguir las instrucciones del fabricante respecto al inóculo y las condiciones y periodo de incubación. Aunque incluye 13 antimicrobianos con múltiples concentraciones, es importante mantener los criterios de interpretación e informar los resultados de acuerdo a las recomendaciones vigentes.

#### 4.1.2. Recomendaciones para *Mycobacterium kansasii*

Aunque en los últimos años se han descrito diversos subtipos de *M. kansasii*, la mayoría de los aislamientos en humanos y con significación clínica son del subtipo 1, al que hacen referencia la casi totalidad de estudios realizados y, por ende, las recomendaciones actualmente vigentes de tratamiento y realización de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en estos microorganismos.

En los tratamientos habituales de las infecciones por esta micobacteria se incluye la rifampicina (o rifabutina en pacientes infectados por el VIH y en tratamiento con inhibidores de la proteasa), la isoniacida y un tercer fármaco, que suele ser el etambutol o la estreptomina durante 18 meses, con al menos 12 meses de cultivos negativos. Aunque estos fármacos son, por lo general, clínicamente activos frente a las cepas no tratadas previamente, el desarrollo de resistencias a uno o más antimicrobianos es un hecho conocido. El fracaso del tratamiento o una escasa respuesta inicial con cultivos positivos tras 3 meses de un tratamiento correcto, se suele asociar fundamentalmente con resistencia a la rifampicina, aunque también se ha documentado con la isoniacida y el etambutol. Por ello, en estos casos se deberá realizar la sensibilidad *in vitro* a estos y otros antimicrobianos potencialmente activos y utilizables en las infecciones por *M. kansasii*. Entre ellos habría que analizar al menos la claritromicina, así como una fluoroquinolona (moxifloxacino o levofloxacino), algún aminoglucósido (amikacina), el linezolid y también la rifabutina, ya que en algunos casos de resistencia a la rifampicina esta puede ser activa. Un aspecto a destacar es que *M. kansasii* presenta, de forma natural, una sensibilidad algo disminuida a la isoniacida en com-

paración con *M. tuberculosis*, aunque tiene actividad clínica. Por consiguiente, es recomendable utilizar varias concentraciones de este fármaco en las pruebas *in vitro* para valorar su nivel de utilidad clínica en cada caso concreto.

A diferencia de otras MNT de crecimiento lento, en *M. kansasii* existe en general una buena estandarización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* y una adecuada correlación con los resultados *in vivo*. Los métodos que más se han utilizado son el de las proporciones en agar 7H10 de Middlebrook, la microdilución en caldo (7H9 de Middlebrook o Mueller-Hinton), el BACTEC 460TB® (descatalogado) y los sistemas automáticos no radiométricos, fundamentalmente el BACTEC™ MGIT™ 960. De ellos el más recomendado es el de la microdilución en caldo de Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con un 5% de OADC. Como se mencionó previamente en el MAC, en la actualidad existe una técnica comercial de microdilución (SLOMYCO, SENSITITRE®), que permite realizar la sensibilidad *in vitro* de una forma sencilla y reproducible con una incubación de 7 o 14 días a 35°C. Es importante seguir las instrucciones del fabricante respecto al inóculo y las condiciones y periodo de incubación. Aunque incluye múltiples antimicrobianos con diversas concentraciones, es importante seguir los criterios de interpretación vigentes. De esta forma, los antimicrobianos y los puntos de corte (en mg/L) a valorar son: rifampicina (> 1), rifabutina (> 2), etambutol (> 4), claritromicina (> 16), amikacina (> 32), levofloxacino (> 2), moxifloxacino (> 2) y cotrimoxazol (> 2/38). En el caso de la isoniacida, estreptomina y linezolid, no existen puntos de corte bien establecidos y por ello sólo se recomienda informar la CIM sin interpretación de sensibilidad o resistencia.

#### 4.1.3. Recomendaciones para *Mycobacterium marinum*

En la actualidad no se recomienda la realización inicial de estudios de sensibilidad a los antimicrobianos en esta especie micobacteriana ya que todos los aislamientos suelen ser sensibles a una gran variedad de antimicrobianos. Cuando exista un fracaso clínico y los cultivos continúen positivos tras varios meses de un tratamiento adecuado, se deberían realizar estudios de sensibilidad *in vitro* mediante el método de microdilución en caldo de Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con un 5% de OADC. En estos microorganismos se requiere una incubación a 28-30°C durante 7 días. Los fármacos y puntos de corte (en mg/L) a analizar son: rifampicina (> 1), rifabutina (> 2), claritromicina (> 16), amikacina (> 32), ciprofloxa-

cino o moxifloxacino (> 2), doxiciclina o minociclina (> 4), etambutol (> 4), y cotrimoxazol (> 2/38).

#### 4.1.4. Otras micobacterias no tuberculosas

En los últimos años se han descrito numerosas especies nuevas de MNT, en las que existe poca o nula evidencia sobre su significación clínica, sensibilidad antimicrobiana y tratamiento. Sin embargo, de forma genérica se recomienda llevar a cabo estudios de sensibilidad *in vitro* mediante microdilución en caldo, con los mismos fármacos y a las mismas concentraciones que en *M. kansasii*, para todas aquellas especies que tengan un buen crecimiento (no deficientes) y en los que se detecte un fracaso terapéutico y cultivos positivos persistentes. En algunos casos habrá que tener en cuenta las peculiaridades de determinadas especies como es, por ejemplo, *M. xenopi* que puede crecer mejor a temperaturas elevadas de 42-45°C pero que, por el contrario, se puede producir una evaporación del medio de cultivo líquido antes de su interpretación.

## 4.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Las micobacterias de crecimiento rápido (y más específicamente las especies no pigmentadas) constituyen un grupo de microorganismos con características únicas dentro del género *Mycobacterium*. Por un lado, estos organismos crecen bien en los medios habituales de bacteriología, y en tiempos de incubación que suelen oscilar, en general, entre los 3 y 5 días. Además, el tratamiento de estos microorganismos se realiza habitualmente con fármacos frente a los cuales el resto de especies son resistentes o, al menos, poseen una sensibilidad menor. Por todo ello, el estudio de sensibilidad *in vitro* presenta unas ciertas características diferenciales con el resto de micobacterias.

En primer lugar, y dadas las características de crecimiento de estas especies, podría plantearse la realización de estudios de sensibilidad mediante la técnica de difusión con discos, bien sobre un medio sólido de Mueller-Hinton, o sobre este medio suplementado con OADC o 5 % de sangre de carnero. Algunas referencias han demostrado una cierta correlación entre los resultados de la CIM y los obtenidos mediante esta técnica. Sin embargo, existen estudios que han demostrado que esta metodología presenta importantes problemas, en especial de correlación entre los diámetros observados y la CIM, sobre todo en la lectura de algunos antibióticos, tales como los macrólidos o

el cotrimoxazol, donde resulta difícil establecer el límite del halo de inhibición. Además, en el caso de la ceftioxitina, la carga habitual del disco (30 µg) está muy cerca del punto de corte para la resistencia (32 mg/L). Por todo ello, no debería emplearse esta técnica, salvo como potencial herramienta taxonómica.

Se han detectado problemas similares (aunque menos acusados) con la técnica de Etest. En estos casos, los resultados de CIM deberán tenerse en cuenta en términos de sensible-intermedio-resistente, y que en el caso de algunos antimicrobianos (especialmente los macrólidos, pero también otros como cotrimoxazol o doxiciclina) el halo de inhibición es difícil de leer, ya que no existe una clara inhibición del crecimiento, sino una disminución progresiva del mismo, que además se modifica con el tiempo de incubación. Un estudio multicéntrico realizado en el año 2000 evidenció importantes discrepancias entre los distintos laboratorios participantes, especialmente en aquellas cepas cuya CIM estaba cerca del punto de corte. Por todo ello, el CLSI no recomienda esta técnica. Sin embargo, y pese a este hecho, esta técnica podría emplearse si no se dispone de otra, teniendo en cuenta todos los aspectos anteriormente descritos.

La técnica de dilución de disco en caldo se ha utilizado en algunos estudios y en algunas especies (*M. fortuitum*) y ha demostrado una cierta correlación con los resultados de microdilución, pero esta técnica es difícil de realizar en la rutina asistencial habitual de la mayoría de laboratorios, donde estos organismos se aíslan sólo de forma ocasional. En el momento actual, no se recomienda esta técnica para la rutina asistencial.

Desde 2003, el CLSI recomienda como técnica de estudio de sensibilidad de estos microorganismos la microdilución en caldo. En estas recomendaciones se establece la indicación de estudiar la sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos que se consideren clínicamente significativos, esto es, aquellas cepas que se aíslan de muestras estériles o biopsias, así como muestras respiratorias de pacientes con sospecha de infección pulmonar por micobacterias donde se cumplan los criterios de la ATS para establecer su significado clínico (dado que muchos de los aislamientos de muestras respiratorias no son significativos y pueden considerarse colonizaciones o contaminaciones). Debido además a las diferencias en el significado clínico de las distintas especies (*M. abscessus* es significativo en la mayoría de los casos, mientras que lo contrario sucede con *M. peregrinum*, por ejemplo), se considera esencial la identificación de los aislados a nivel de

**Tabla 2. Criterios de interpretación de las pruebas de sensibilidad de las micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo.**

Antimicrobiano	CIM (mg/L)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
<b>Amikacina<sup>1</sup></b>	≤ 16	32	≥ 64
<b>Cefoxitina</b>	≤ 16	32-64	≥ 128
<b>Ciprofloxacino/Levofloxacino</b>	≤ 1	2	≥ 4
<b>Moxifloxacino</b>	≤ 1	2	≥ 4
<b>Claritromicina</b>	≤ 2	4	≥ 8
<b>Doxiciclina/Minociclina</b>	≤ 1	2-8	≥ 16
<b>Imipenem</b>	≤ 4	8	≥ 16
<b>Cotrimoxazol<sup>2</sup></b>	≤ 2/38	-	≥ 4/76
<b>Tobramicina<sup>3</sup></b>	≤ 4	8	≥ 16
<b>Linezolid</b>	≤ 8	16	≥ 32

<sup>1</sup> Si el aislado es una cepa de *M. abscessus* y la CIM es ≥ 64 mg/L, deberá repetirse para confirmar.

<sup>2</sup> CIM definida por una inhibición del 80% de crecimiento del control.

<sup>3</sup> Sólo informar en *M. chelonae*.

especie o, como mínimo, diferenciar entre el grupo *M. fortuitum* y el grupo *M. chelonae-M. abscessus*.

En aquellos casos en que se considere necesario, el estudio de sensibilidad deberá estudiar los siguientes agentes antimicrobianos: amikacina, tobramicina, cefoxitina, ciprofloxacino, moxifloxacino, claritromicina, doxiciclina o minociclina, imipenem, linezolid y cotrimoxazol. El estudio de otros antibióticos (tales como tigeciclina u otros betalactámicos) resulta difícil de interpretar, ya que no existe experiencia en cuanto a la correlación *in vivo* e *in vitro* de los resultados obtenidos, si bien los resultados de CIM pueden ser orientativos cuando se consideren puntos de corte de otros microorganismos.

La metodología recomendada de microdilución en caldo presenta su propia problemática a la hora de su realización. La descripción detallada de la misma se describe en el PNT-SBK-03 de este procedimiento, siendo esencial para la lectura la inclusión de un pocillo de control sin antibiótico, ya que en numerosas ocasiones el crecimiento no se va a manifestar como un botón en el fondo del pocillo o una turbidez uniforme claramente visible en el mismo. La realización de un inóculo correcto (0,5 de la escala de turbidez de McFarland) es esencial, ya que un inóculo demasiado alto puede dar lugar a falsas lecturas de resistencia, mientras que si es excesivamente bajo podría dar lu-

gar a una falsa lectura de sensibilidad. La incubación deberá realizarse durante 3-4 días a 30°C (hay cepas, sobre todo de *M. chelonae*, que no crecen bien a 37°C). En todo caso, si no se detectara crecimiento en el pocillo control a los 5 días no se deberá seguir con la incubación, debiendo por el contrario repetirse la prueba desde el principio. Otro aspecto importante es el efecto del pH. Las recomendaciones del CLSI establecen el uso del caldo de Mueller-Hinton con ajuste de cationes, a un pH de 7,3-7,4. En este pH la CIM de la claritromicina suele ser una dilución inferior a la obtenida a pH de 6,8, ya que la actividad del fármaco disminuye en medio ácido. Este efecto se ha descrito también para el ciprofloxacino. Por ello, cuando se interpreten los resultados deberá hacerse teniendo en cuenta este hecho, eligiendo aquellas tablas ajustadas para el pH empleado en el estudio.

Los datos de CIM se valorarán como sensibles, intermedios o resistentes de acuerdo con los criterios aceptados (tabla 2). Sin embargo, hay que tener en cuenta la posible presencia de metilasas inducibles *erm*, por lo que para detectar este fenómeno se recomienda reincubar las placas hasta 14 días. Sin embargo, no está claro cuál es la implicación clínica de este fenómeno, y la recomendación existente es usar este fármaco (especialmente si no hay otros fármacos orales disponibles) salvo que se detecte resistencia fenotípica en la incubación convencional.

A la hora de informar los resultados, hay que tener en cuenta las características peculiares de algunas especies. No se recomienda informar los resultados de imipenem en los aislados de *M. abscessus* o *M. chelonae*, ya que se ha determinado que los resultados no son reproducibles entre los diferentes laboratorios. En segundo lugar, los resultados de la tobramicina sólo se informarán para *M. chelonae*, ya que este aminoglucósido es el más activo en esta especie, y sólo se informará el resultado de la amikacina si la tobramicina aparece como resistente. Por otra parte, dado que la resistencia a la amikacina es una rareza que presenta importantes implicaciones terapéuticas, este resultado deberá comprobarse repitiéndolo antes de informarlo. En el momento actual existe una técnica comercial de microdilución diseñada específicamente para micobacterias de crecimiento rápido y actinomicetales aerobios (sistema RAPMYCO® SENSITITRE) basada en la microdilución en caldo mediante el empleo de placas con antibióticos liofilizados, y que incluye los antibióticos recomendados, e incluso alguno más (tigeciclina y betalactámicos) a las concentraciones que permiten establecer adecuadamente una interpretación de los resultados, así como un pocillo de crecimiento. Aunque esta técnica es de gran utilidad en la rutina asistencial (es equiparable a la microdilución realizada de forma tradicional), los criterios de información de resultados no varían, por lo que no deberán informarse los resultados de fármacos no estandarizados distintos a los descritos en la **tabla 2**.

## 5. MECANISMOS DE RESISTENCIA Y DETECCIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA

### 5.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Para el tratamiento de la TB en los pacientes con factores de riesgo para la resistencia, es fundamental disponer con rapidez de los datos de sensibilidad, ya sea para validar el tratamiento empírico inicial o para orientar el esquema terapéutico en función del patrón de resistencia detectado. Desafortunadamente, los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* fenotípicas o convencionales suelen tardar varias semanas lo que supone un retraso crucial desde el punto de vista asistencial en diversas situaciones. En nuestros días existe un gran interés en el desarrollo y aplicación de estrategias moleculares para la detección rápida de la resistencia.

Es bien conocido que las micobacterias presentan una resistencia natural a diversos antimicrobianos, en parte por

la baja permeabilidad de su pared que es muy hidrofóbica, así como por la producción de enzimas degradantes ( $\beta$ -lactamasas) o modificantes (acetiltransferasas), y también por bombas de expulsión activa. Desde hace unos años se sabe que la resistencia adquirida a los agentes habitualmente utilizados en el tratamiento de la TB, se debe fundamentalmente a *mutaciones cromosómicas espontáneas* en los genes que codifican la diana del fármaco o enzimas implicadas en su activación. Estas mutaciones pueden surgir sin exposición previa al tratamiento o tras una presión antibiótica en el curso de tratamientos inadecuados. Las cepas que presentan resistencia a múltiples fármacos se deben a una acumulación secuencial de mutaciones en diferentes genes. Muchas de estas mutaciones y su correlación con la resistencia a los diversos fármacos en el complejo *M. tuberculosis* están bien establecidas y explicarían una gran parte del conjunto de resistencias fenotípicas observadas. No así en las MNT donde los mecanismos de resistencia han sido menos estudiados. En estas, además de mutaciones cromosómicas, también se han descrito en micobacterias de crecimiento rápido (por ejemplo, *M. fortuitum*) la existencia de elementos móviles (plásmidos o transposones) que pueden transmitir horizontalmente la resistencia, lo que no ha sido descrito hasta ahora en el complejo *M. tuberculosis*.

#### Isoniacida

La resistencia fenotípica a la isoniacida está asociada a una variedad de mutaciones en uno o varios genes, si bien son dos los que justifican el 68-90% de las resistencias observadas: el gen *katG* y el gen *inhA* y/o su zona promotora. El primero codifica la enzima catalasa-peroxidasa, implicada en la transformación de la isoniacida en su compuesto activo. Determinadas alteraciones del gen provocan resistencia al impedir la activación del fármaco. Las mutaciones en este gen *katG* son responsables del 60-70% de las resistencias a la isoniacida, y se correlacionan con resistencia de alto nivel (CIM >1 mg/L). La mutación más frecuente es la que afecta al codón 315 provocando un cambio de aminoácido (S315T, serina-treonina). También se han descrito otras mutaciones en el gen, algunas de ellas silentes y otras de significado desconocido. El gen *inhA* codifica la enzima enoil-ACP reductasa que participa en la síntesis de la pared bacteriana. En la zona reguladora de este gen (*mabA-inhA*) se han descrito mutaciones que provocan un aumento de la enzima, compensando la acción inhibitoria del antibiótico. También se han descrito, aunque menos frecuentes, mutaciones en la zona estructural del gen, que modificarían la enzima impidiendo su reconocimiento por parte del antibiótico. Las mutaciones que afectan al

*inhA* (8-20%) se correlacionan con resistencias de bajo nivel a la isoniacida, son más frecuentes en los casos de monorresistencia y tienen resistencia cruzada con la etionamida. Un aspecto relevante es que la presencia y frecuencia de estos mecanismos de resistencia (*katG* e *inhA*) tienen una distribución geográfica diversa.

Un porcentaje menor de las resistencias a la isoniacida se han relacionado, en mayor o menor medida, con: a) mutaciones en la región promotora del *ahpC*, que codifica una alquil hidropéroxido reductasa; b) mutaciones en el gen *kasA* que codifica la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa. (la mayoría de las cepas con mutaciones en este gen también tienen mutaciones en *katG* o *inhA*); y c) con mutaciones en el gen *mshA*, que codifica la enzima glicosil transferasa, involucrada en la biosíntesis del micotiol. Además de estos se han mencionado otros como *ndh*, *glf* o *nat*, sin conocerse bien su implicación.

Los mecanismos moleculares de resistencia a la isoniacida en las MNT son muy similares a los encontrados para *M. tuberculosis*, ya que aunque la isoniacida es un fármaco esencialmente antituberculoso, tiene un cierto grado de actividad frente a algunas otras especies, como *M. kansasii*. En el resto de micobacterias, la resistencia intrínseca parece deberse a una falta de activación intracelular del profármaco.

### Rifampicina

La resistencia a la rifampicina está relacionada con alteraciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa, causando interferencias en la transcripción. Más del 95% de las cepas resistentes tienen mutaciones en una zona de 81 pb (27 codones: 507-533) de la región central del gen. Las mutaciones en los codones 526 o 531, las más frecuentes, se asocian a un elevado nivel de resistencia (> 32 mg/L), mientras que alteraciones en los codones 511, 516, 518 y 522 suelen conferir una resistencia de bajo nivel a la rifampicina y a la rifapentina, y una sensibilidad conservada a la rifabutina y al rifalazil. Un aspecto relevante de la resistencia a la rifampicina es que suele asociarse con resistencia a la isoniacida en más del 95% de los casos, por lo que su detección constituye un marcador de multirresistencia en *M. tuberculosis* complex.

En las MNT se han descrito mutaciones similares en el *rpoB* en *M. kansasii*, *M. leprae*, complejo *M. avium* y *M. ulcerans*. Sin embargo en muchas especies no se han encontrado mutaciones y en estas, la resistencia

parece guardar relación con la permeabilidad al fármaco como en el caso de múltiples MAC, o bien con un mecanismo degradativo de ribosilación mediante ADP-ribosilasas, codificadas por el gen *arr*, y que se ha observado en *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. flavescens* y *M. vaccae*.

### Aminoglucósidos y polipéptidos

El mecanismo de resistencia adquirida a aminoglucósidos en micobacterias está basado en la modificación de la subunidad 30S del ribosoma, que es la diana del fármaco. Las mutaciones asociadas con la resistencia a la estreptomina en *M. tuberculosis* se han identificado en los genes *rpsL* y *rrs*, que codifican las proteínas ribosomales 12S y 16S ARNr, respectivamente. Más de la mitad de los aislamientos resistentes a la estreptomina se han asociado con mutaciones en estos genes aunque con una importante variabilidad geográfica. Las mutaciones más comunes en el gen *rpsL* se han detectado en los codones 43 y 48, así como en las regiones 530 y 912 del gen *rrs*. Las mutaciones en el *rpsL* se asocian a resistencia de alto nivel (CIM > 1000 mg/L), mientras que en el *rrs* están relacionados con niveles de resistencia intermedios (CIM: 64-512 mg/L).

Aunque en *M. tuberculosis* complex existe resistencia cruzada entre la estreptomina y la kanamicina, amikacina y capreomicina, no siempre es completa o recíproca. En general, la amikacina suele ser sensible en los resistentes a la estreptomina, mientras que los resistentes a la amikacina lo son también a la estreptomina. La capreomicina normalmente es activa en los aislamientos de *M. tuberculosis* complex resistentes a la estreptomina, pero los resistentes a la capreomicina suelen ser sensibles a la amikacina. Las resistencias a estos fármacos se han asociado con mutaciones en el gen *rrs*, especialmente en la región entre los nucleótidos 1.400 y 1.500, y cada uno de ellos es responsable de un patrón de resistencia específica. Así las mutaciones G1484T y A1401G están relacionadas con la resistencia de alto nivel a todos estos fármacos, mientras que la mutación C1402T causa sólo resistencia a la kanamicina y a la capreomicina. Además, las mutaciones en cualquier lugar del gen *tlyA*, que codifica una 2'-O-metiltransferasa, están también asociadas con la resistencia a la capreomicina.

Por otro lado, el gen *eis* codifica una aminoglucósido acetil-transferasa específica de la kanamicina. Mutaciones a este nivel causarían una hiperproducción de la enzima que inactiva el fármaco. Estas mutaciones podrían ser responsables de hasta el 80% de las re-

sistencias de bajo nivel a la kanamicina en el complejo *M. tuberculosis*.

Además de la modificación de la subunidad 30S ribosomal, se ha descrito en algunas MNT la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (acetiltransferasas), especialmente en micobacterias de crecimiento rápido (*aac2'-Id* en *M. smegmatis*), si bien la presencia de estas enzimas no se correlaciona siempre con resistencia fenotípica. Se sabe también que algunas especies poseen fosfotransferasas constitutivas (*M. abscessus* y *M. avium* entre otras), si bien, al igual que las anteriores, no siempre se ha podido correlacionar su presencia con resistencia frente a esta familia de antibióticos.

Finalmente, existen una serie de bombas de expulsión activas con actividad múltiple que incluyen los aminoglucósidos, como son *tap*, *tetV* o *lfrA*.

### Etambutol

La resistencia al etambutol está causada fundamentalmente por alteraciones de la enzima arabinosil transferasa, que interviene en la síntesis de la pared celular, en concreto en el arabinogalactano y en menor medida el lipoarabinomano. Esa enzima está codificada por el gen *embB* perteneciente al operón *emb* (*emb-CAB*). Aunque se han descrito diversas mutaciones en el operón *emb* en relación a la resistencia adquirida al etambutol en *M. tuberculosis* complex, la mayoría se localizan en el gen *embB*, sobre todo en el codón 306, seguido del 406, que explicarían ambos el 60-80% de todas las resistencias fenotípicas a este antimicobacteriano. La resistencia resultaría de una acumulación de fenómenos genéticos, que comienzan con una sobreexpresión de proteínas Emb. Un elevado nivel de resistencia (> 10 mg/L) requiere una mutación estructural en la región conservada de EmbB o un incremento adicional de la sobreexpresión proteica. Algunas especies como *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. leprae*, presentan una resistencia natural al etambutol mediante alteraciones genéticas en el gen *embB*.

Además de este mecanismo de resistencia posiblemente existan otros aún poco conocidos. De hecho hay cierta evidencia de que la bomba de expulsión activa LfrA podría afectar a la sensibilidad de diversas especies de micobacterias al etambutol, aunque el nivel de resistencia al que daría lugar sería bajo.

### Pirazinamida

La resistencia a este fármaco se ha asociado, sobre todo (72-97% de las cepas de *M. tuberculosis* resis-

tentes), con mutaciones a lo largo del gen *pncA* y en la región reguladora del mismo, que codifica la pirazinamida y ésta pierde su actividad. Existen tres zonas donde las mutaciones se concentran en mayor o menor medida y que corresponden a los aminoácidos 3-17, 61-85 y 132-142. Estas mutaciones se correlacionan con CIMs elevadas a la pirazinamida. También se han descrito cepas que presentan un bajo nivel de resistencia a la pirazinamida y con actividad de la pirazinamida sin mutaciones en el gen *pncA* y que podría deberse a mecanismos relacionados con la permeabilidad o con bombas de expulsión activa. Es relevante el hecho de que *M. bovis* y su variante, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), presentan resistencia natural a la pirazinamida con una mutación puntual en el codón 169 en el gen *pncA*.

### Fluoroquinolonas

Esta familia de agentes actúa inhibiendo la ADN girasa, enzima codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*. El mecanismo de resistencia más frecuente es la aparición de mutaciones en el gen *gyrA* (alrededor del 85%) que da lugar a una resistencia fenotípica de alto nivel, y el gen *gyrB* (alrededor del 10%). La mayoría de las mutaciones se encuentran en una región concreta denominada RDRQ (región determinante de resistencia a las quinolonas) y confiere resistencia cruzada entre las diversas fluoroquinolonas. En conjunto, el mecanismo de resistencia es un proceso complejo de acumulación de alteraciones genéticas, de tal forma que se han observado ciertos aislamientos micobacterianos con una mezcla de bacterias sensibles y con mutaciones en el gen *gyrA*, constituyendo esta heteroresistencia un estadio previo a una resistencia completa.

Además, se ha descrito otro posible mecanismo de resistencia como es la presencia de bombas de expulsión activa, en concreto la bomba LfrA. Aunque este mecanismo no confiere resistencia de alto nivel, podría tener implicaciones en la aparición escalonada de resistencia frente a estos agentes. Además, la expresión de esta bomba está controlada por el gen *lfrR*, por lo que la mera presencia del gen *lfrA* no permitiría determinar el grado de resistencia conferido. Otra bomba de expulsión activa de interés es el transportador de fosfato codificado por el gen *pstB*, cuya sobreexpresión confiere resistencia a las fluoroquinolonas.

### Macrólidos y ketólidos

La importancia de este grupo de fármacos en el tratamiento de las micobacteriosis ha hecho que, posiblemente, los mecanismos de resistencia a los mismos sean de los mejor estudiados. Inicialmente, se detec-

tó la adquisición de resistencia durante el tratamiento mediante mutaciones del gen 23S ARNr, en aquellos residuos esenciales para la unión de los macrólidos a los ribosomas. Estas mutaciones han sido descritas en diversas especies, tanto de crecimiento lento (complejo *M. avium* y *M. kansasii*) como de crecimiento rápido (*M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*) y confieren resistencia a los macrólidos, ketólidos, lincosamidas y estreptogramina B (los 2 primeros de especial importancia en micobacterias).

Sin embargo, el mecanismo más importante de resistencia a los macrólidos en las micobacterias es la presencia de metilasas inducibles (*erm*). Estas enzimas se han descrito en diversas especies de micobacterias de crecimiento rápido, como son *erm(39)* en *M. fortuitum* y *erm(41)* en *M. abscessus* subsp. *abscessus* y subsp. *bolletii*, entre otras, así como el *erm(37)* en *M. tuberculosis*. Estos genes representan 4 clases y 2 grupos evolutivos. Estos genes codifican ARNr metilasas, que realizan la metilación de una adenina en la región peptidiltransferasa del 23S ARNr. Esto da lugar a una disminución de la unión de los macrólidos (y agentes similares) al ribosoma. Estos genes son inducibles, lo que puede dar lugar a una sensibilidad fenotípica a estos fármacos si el periodo de incubación es suficientemente corto. No obstante, los fenotipos detectados de resistencia o sensibilidad a los macrólidos sugieren que la existencia de genes *erm* podría dar lugar a fracasos terapéuticos relacionados con estos fármacos. Las implicaciones de estos genes pueden ser aún mayores en el caso de los ketólidos, que han demostrado ser excelentes inductores de las metilasas, dando lugar a niveles de resistencia especialmente elevados.

Sin embargo, y a pesar de estos datos, no toda la resistencia a los macrólidos se puede explicar por estos mecanismos, por lo que se supone que existen otros mecanismos de resistencia, entre los que podrían encontrarse problemas de permeabilidad, presencia de bombas de expulsión activa u otros.

### Beta-lactámicos

La resistencia intrínseca a los betalactámicos en el género *Mycobacterium* se debe probablemente al efecto combinado de los problemas de permeabilidad debidos a la peculiar estructura de la pared de las micobacterias, una disminución en la afinidad de las PBPs frente a estos agentes, y a la presencia de  $\beta$ -lactamasas. Probablemente, el mecanismo más importante es éste último. De hecho, la presencia de actividad hidrolítica frente a las penicilinas en las micobacterias es conocida desde mediados de los años 40

del pasado siglo (para *M. tuberculosis*). Posteriormente se ha determinado la presencia de esta actividad en diversas especies del género, considerándose en la actualidad que la presencia de proteínas con actividad  $\beta$ -lactamasa es constitutiva de todo el género. De hecho se considera que posiblemente existan varias de estas enzimas en cada especie. Sin embargo, a pesar de este hecho, no está clara su relación con la presencia de resistencia fenotípica frente al imipenem o la cefoxitina, que son los betalactámicos más usados en el tratamiento de las micobacteriosis, ya que muchas de las especies son sensibles, y todavía no se conoce cuáles son los mecanismos de resistencia en aquellas cepas resistentes a ambos fármacos.

### Tetraciclinas y glicilciclinas

La adquisición de resistencia a las tetraciclinas se debe fundamentalmente a la protección del ribosoma o a la presencia de bombas de expulsión activa. La presencia de proteínas de protección del ribosoma (*ribosomal protection proteins*, RPP) parece conferir resistencia mediante el desplazamiento de la tetraciclina de los ribosomas, mientras que no tendrían actividad frente a la tigeciclina. Sin embargo, el papel de la resistencia a las tetraciclinas de los genes *otr(A)* y *tet(M)* que codifican las 2 proteínas conocidas de este tipo, no está todavía claramente elucidado.

En relación con la resistencia mediada por bombas de expulsión activa, se han descrito diversas proteínas en micobacterias, cuyos genes son homólogos con otros presentes en otros géneros; de hecho, esta similitud sugiere la posibilidad de que estos genes se pueden transferir horizontalmente, siendo un potencial mecanismo de resistencia adquirida. Un caso particular dentro de este mecanismo es la bomba de expulsión Tap, que es género-específica. Aunque experimentalmente se ha demostrado que la expresión de ésta aumenta de 8-16 veces la CIM frente a las tetraciclinas, no se ha demostrado que su presencia en micobacterias de crecimiento rápido se correlacione con la resistencia fenotípica a la doxiciclina o a la tigeciclina.

En el momento actual no se ha demostrado la presencia de resistencia a la tigeciclina en ninguna micobacteria. Sin embargo, la enzima Tet(X) es capaz de inactivarla, y dado que el gen que la codifica es extremadamente móvil, podría ser una potencial fuente de adquisición de resistencia frente a este fármaco.

### Oxazolidinonas

La resistencia micobacteriana al linezolid se asocia a mutaciones en el ribosoma que disminuyen la afinidad

del antibiótico al mismo, y que habitualmente están localizadas en el dominio V del gen 23S ARNr. Además de este mecanismo, se supone que deben existir otros no conocidos en las micobacterias. Así se han notificado mutaciones en los genes *rpIC* y *rpID* codificantes de las proteínas ribosomales L3 y L4, o la presencia de la ARN metilasa Cfr, asociada a elementos móviles, y que dan lugar a resistencia fenotípica al linezolid en múltiples microorganismos. Sin embargo, estos no se han descrito en las micobacterias.

### Cotrimoxazol

Aunque los dos fármacos (trimetoprim y sulfametoxazol) que componen el cotrimoxazol inhiben el metabolismo del folato, las dianas moleculares donde actúan son diferentes, y por tanto el mecanismo de resistencia podría ser también diferente. Actualmente no está claro el mecanismo de resistencia al cotrimoxazol cuando éste aparece. Se cree que el complejo *M. avium* presentaría una resistencia intrínseca debida a una resistencia de la dihidrofolato-reductasa de esta micobacteria a su inhibición por el trimetoprim.

### Bedaquilina y delamanid

Recientemente se ha descrito la resistencia adquirida a estos dos nuevos fármacos en un caso de XDR-TB. Tras la secuenciación del genoma completo de los aislamientos clínicos, la resistencia a la bedaquilina se ha asociado a una mutación en el gen *mmpR*, y en el caso del delamanid a dos mutaciones en los genes *fbIA* y *fgd1*. Además se ha observado que en mutantes resistentes *in vitro* a la clofazimina presentan también resistencia cruzada con la bedaquilina, detectándose mutaciones en el gen *rv0678* sin conocer exactamente su significado e impacto.

## 5.2. DETECCIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA

El método de referencia para determinar la resistencia a los fármacos antituberculosos es la prueba de sensibilidad fenotípica, basada en el método de las proporciones y las concentraciones críticas. Su interpretación y correlación clínica está claramente establecida para fármacos de primera línea, sobre todo isoniacida y rifampicina. La determinación de sensibilidad a los fármacos de segunda línea se realiza frecuentemente en laboratorios de referencia y de centros hospitalarios grandes cuando hay resistencia a uno o más fármacos de primera línea. Aunque no está tan consolidado, sus resultados son ampliamente aceptados en la clínica. Sin embargo, las pruebas de sensibilidad *in vitro* pueden tardar varias semanas en proporcionar resultados

concluyentes. Es frecuente además que los aislamientos con resistencia requieran comprobaciones o repeticiones que demoran aún más los resultados, a veces varios meses, restando una parte importante de su utilidad práctica.

La detección molecular de la resistencia evita en gran medida este problema, ofreciendo resultados rápidos y útiles para el manejo de los pacientes. Estos métodos se basan en detectar alteraciones en genes relacionados con la resistencia a los fármacos y que como se ha comentado, la mayoría de las veces son mutaciones cromosómicas puntuales. En algunos casos la resistencia puede estar causada por dificultades de penetración, inactivación del fármaco o bombas de expulsión activa. No obstante, hay que tener en cuenta que en un porcentaje variable según el fármaco, la causa de la resistencia se desconoce.

Desde un punto de vista práctico pueden establecerse dos tipos de métodos, los basados en técnicas caseras (*home made*) y los desarrollados comercialmente. Los métodos caseros se han usado ampliamente en los últimos 15-20 años, diseñados directamente por los investigadores y con una menor o mayor implantación posterior. Se han utilizado técnicas diversas, desde PCR con digestión enzimática y electroforesis, hasta PCR a tiempo real o *microarrays*. Las ventajas de estos métodos son un coste de implementación más económico y un diseño adaptado a las condiciones requeridas en el lugar de origen. Actualmente aún se utilizan en algunos países de renta limitada, aunque existe un consenso en la priorización de métodos comerciales, debido a las dificultades de estandarización y control de calidad, además de que son difícilmente comparables entre ellos.

Existen numerosas técnicas comercializadas dirigidas a la detección de mutaciones de resistencia. En la **tabla 3** se exponen algunos ejemplos. De todas ellas, únicamente el sistema iC2.0-MYCO® assay (iKubate) y el Xpert® MTB/RIF assay (Cepheid) se presentan como un kit integrado. Muchas de estas técnicas han sido comercializadas en los últimos 3-4 años por lo que su implantación es aún reducida. Las más conocidas y utilizadas son Xpert® MTB/RIF Assay y GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> (Hain Lifescience). Ambas han sido aprobadas por la OMS para el diagnóstico rápido de la MDR-TB.

### Xpert® MTB/RIF

Es una técnica automatizada que permite el diagnóstico del complejo *M. tuberculosis* y la detección de las

**Tabla 3. Métodos comercializados para la detección molecular de mutaciones de resistencia a los fármacos antituberculosos (Modificado de Tuberculosis Diagnostics Technology and Market Landscape, UNITAID WHO 2015).**

Prueba	Marca	Método <sup>1</sup>	Detección <sup>2</sup>	Año
TB Resistance INH/RIF	AID	PCR, LPA	H, R	2013
TB Resistance FLQ	AID	PCR, LPA	FQ	2014
TB Resistance AMG	AID	PCR, LPA	AG	2015
BioFilmChip MDR TB	Autogenomics	PCR, microarray	H, R	2011
Drug Resistance Detection Kit	CapitalBio Co	PCR, microarray	MDR	2009
Xpert MTB/RIF assay	Cepheid	RT-PCR	R	2009
NTM/MDR TB	NIPRO Co	PCR, LPA	H, R	2012
INH	NIPRO Co	PCR, LPA	H	2012
PZA	NIPRO Co	PCR, LPA	PZ	2012
FLQ	NIPRO Co	PCR, LPA	FQ	2012
Anyplex II MTB/MDR/XDR	Seegene	RT-PCR	H, R, FQ, AG	2012
Anyplex MTB/MDR/XDR	Seegene	RT-PCR	H, R	2012
VereMTB Detection	Veredus Labs	PCR, microarray	H, R	2012
MeltPro RIF	Zeesan Biotech	RT-PCR	R	2014
MeltPro INH	Zeesan Biotech	RT-PCR	H	2014
MeltPro FLQ	Zeesan Biotech	RT-PCR	FQ	2014
MeltPro AMG	Zeesan Biotech	RT-PCR	AG	2014
Genedrive Mycobact iD	Epistem	RT-PCR	R	2013
INNO-LiPA Rif.TB	INNO Genetics	PCR, LPA	R	N/D <sup>3</sup>
GenoType MTBDR <sub>plus</sub> v2.0	Hain Lifescience	PCR, LPA	H, R	2012
GenoType MTBDR <sub>s</sub> / v1.0	Hain Lifescience	PCR, LPA	AG, FQ, E	2009
GenoType MTBDR <sub>s</sub> / v2.0	Hain Lifescience	PCR, LPA	AG, FQ	2013
iC2.0-MYC assay	iCubate	PCR, microarray	H, R, E, FQ, AG, BD	2012
HYDRA	Insilixa Inc	PCR, microarray	H, R, PZ, E, FQ, AG	2015

<sup>1</sup> PCR: Polymerase chain reaction; LPA: Line probe assay; RT-PCR: Real-Time PCR. <sup>2</sup> H: isoniacida; R: rifampicina; PZ: pirazinamida; E: etambutol; AG: aminoglucósidos; FQ: fluoroquinolonas; BD: bedaquilina.  
<sup>3</sup> N/D: no disponible. Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF

mutaciones relacionadas con la resistencia a la rifampicina más frecuentes, en una hora y 45 minutos con una manipulación mínima. Se basa en el uso de un recipiente singular en el que se introduce la muestra y de un equipo que realiza el procesamiento y análisis de la muestra de forma integrada. La extracción del ADN, la amplificación y la detección se producen en el interior del recipiente denominado cartucho, que está dividido en diferentes cámaras que contienen liofilizados todos los reactivos necesarios para el proceso.

Un eje central accionado desde el interior del equipo permite hacer viajar la muestra por las diferentes cámaras según se van sucediendo los pasos de la técnica, sin mediar ninguna manipulación del operador. La preparación previa de la muestra es mínima, partiendo de una muestra directa o bien descontaminada para el cultivo. También pueden utilizarse muestras congeladas. Se ha observado una disminución de sensibilidad, aproximadamente del 1% cuando la microscopía es positiva, y del 6% cuando es negativa, que podría

ser atribuida a un efecto de dilución durante la descongelación.

La amplificación se fundamenta en una PCR a tiempo real, y como sistema de detección utiliza sondas *molecular beacon*. En concreto tiene cinco sondas diseñadas para cubrir la secuencia natural de la región determinante de alta resistencia a la rifampicina (RRDR) del gen *rpoB*, que comprende 81 bp, desde los codones 507 a 533. Las sondas están superpuestas en sus extremos de forma que cubren totalmente el fragmento diana. Cada sonda está unida a un fluoróforo distinto. Cuando hibrida con su secuencia homóloga emite fluorescencia que es detectada por el equipo. La técnica posee un control interno que monitoriza su correcta ejecución. Cuando la muestra a estudiar contiene ADN del complejo *M. tuberculosis* sin mutaciones en esta zona, las cinco sondas hibridan. Si una mutación está presente en la secuencia correspondiente a una de las sondas, ésta no hibridará. Es un signo indirecto de resistencia ya que no reconoce con exactitud qué nucleótido ha mutado ni cuál ha sido el cambio.

Desde su comercialización han aparecido diversas generaciones que han introducido sucesivamente modificaciones y mejoras, para eliminar algunos falsos positivos de resistencia que habían sido notificados, aumentando en un 1% la especificidad global. Desde un punto de vista teórico, el límite de detección del ADN es equivalente a 5 genomas o a 131 UFC/ml. Un estudio Cochrane reciente establece, para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, una sensibilidad del 98% en muestras con microscopía positiva y del 67% con microscopía negativa, tomando como referencia el cultivo. En ambos casos la especificidad fue del 99%. Al tratarse de un método integrado no puede desglosarse la utilidad diagnóstica de la enfermedad de la utilidad diagnóstica para la detección de resistencia a la rifampicina. Respecto a las muestras extrarrespiratorias, un meta-análisis que agrupó 6.026 muestras de 27 trabajos, estableció una sensibilidad global del 83% y una especificidad del 98%. De acuerdo al resultado de la microscopía, la sensibilidad es del 95% cuando es positiva y del 69% en las muestras negativas. No obstante, la sensibilidad global es muy variable según el tipo de muestra, desde el 96% y 88% en ganglios y tejidos, hasta el 24-34% en líquido pleural, que ha demostrado ser la muestra con una menor rentabilidad. En el LCR, el rendimiento sería del 85% y para otros líquidos biológicos del 67%. Como síntesis general, el Xpert MTB/RIF® aporta un 23% más de casos positivos que la microscopía, tomando el cultivo como referencia.

La principal ventaja del Xpert MTB/RIF® se basa en ser un método integral, rápido y con una manipulación mínima. Este hecho ha permitido su difusión y su realización en múltiples laboratorios en los que la única prueba diagnóstica disponible era la microscopía. Datos recientes demuestran resultados superponibles al comparar el rendimiento de esta prueba en laboratorios de nivel periférico con laboratorios de referencia. Este hecho es de gran importancia, sobre todo en zonas de alta incidencia y prevalencia de MDR-TB. La resistencia a la rifampicina se considera un excelente marcador de multiresistencia ya que, como se ha comentado, la monoresistencia a este fármaco es rara (inferior a 3%). Por este motivo permite instaurar un tratamiento alternativo en 5-6 días, en lugar de los 55-60 días necesarios para obtener conclusiones de las pruebas de sensibilidad fenotípicas. Por otra parte, es un método con un porcentaje muy bajo de resultados no interpretables. De hecho, la mayoría de los estudios apenas notifican alguno.

El gen *rpoB* está presente en la mayoría de las bacterias, por tanto también en las restantes del género *Mycobacterium*. Ocasionalmente puede observarse hibridación de alguna de las 5 sondas en muestras con micobacterias no tuberculosas (MNT). No obstante, la especificidad es muy elevada. En un análisis Cochrane, diversos estudios habían incluido un total 180 muestras en las que en el cultivo crecieron MNT. Únicamente en un caso se detectó un falso positivo (0,6%).

Los inconvenientes más importantes de Xpert MTB/RIF® son: a) que únicamente detecta la resistencia a la rifampicina que, a pesar de ser un buen marcador de MDR-TB, no es la resistencia más frecuente; y b) el elevado coste económico. Actualmente, hasta el año 2022 se mantiene un precio de 10 USD por cartucho para los países de bajos recursos económicos y con alta incidencia de tuberculosis. En los países de renta elevada el coste es 6-7 veces superior.

### GenoType® MTBDRplus

Existen dos modalidades del kit GenoType MTBDR para la detección de resistencias. Una dirigida a la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la isoniacida y a la rifampicina, y la otra a mutaciones relacionadas con resistencia a determinados fármacos de segunda línea.

La primera, GenoType® MTBDRplus está recomendada por la OMS como un método rápido de detección de resistencias desde 2009. Se basa en una amplifi-

cación seguida de hibridación reversa sobre tiras de nitrocelulosa que contienen sondas inmovilizadas correspondientes a secuencias naturales o “salvajes” y secuencias que reproducen los codones con las mutaciones descritas con mayor frecuencia. La hibridación es revelada de forma enzimática, evidenciándose en forma de bandas distribuidas a lo largo de la tira. La prueba detecta mutaciones de resistencia a la rifampicina en el gen *rpoB* y para la isoniacida en el gen *katG* y en la región promotora del gen *inhA*. Dispone de 6 mutaciones de control: de la amplificación, del conjugado, de la identificación de complejo *M. tuberculosis* y de los tres genes implicados. Además, tiene 21 sondas distribuidas de la forma siguiente: 8 para secuencias naturales del *rpoB* entre los codones 505 y 533, 4 para mutaciones del gen *rpoB*, 1 secuencia natural para el codón 315 del gen *katG* y 2 mutadas, 2 sondas naturales de las posiciones -15 y -16 del promotor *inhA* y 4 mutaciones de este promotor, -15, -16 y dos en -8. La prueba se considera inválida cuando una o más de las bandas control no aparece. Se valora como no interpretable si simultáneamente están ausentes bandas naturales y mutadas en alguno de los loci. Inicialmente el kit fue diseñado para utilizarse en aislamientos de cultivos o muestras biológicas con microscopía intensamente positiva (3+ o 4+). Actualmente existe una versión 2.0, que hace también posible su aplicación sobre muestras con microscopía negativa. Dependiendo de la sospecha en cada caso o en cada área, se establecerá una estrategia de uso sobre cultivos o muestras con microscopía positiva o negativa. Los estudios de meta-análisis sobre este producto, establecen una sensibilidad global del 98% para detectar resistencia a la rifampicina y del 84,3% para la isoniacida, ambas con una especificidad del 98-99,5%. Las diferencias de sensibilidad para los dos fármacos son debidas a las mutaciones que puede detectar la prueba. Como se comentó en el apartado anterior (5.1.), más del 95% de las resistencias a la rifampicina están causadas por mutaciones en el gen *rpoB*, la mayoría en el fragmento de 81 pb incluido en el kit, mientras que para la isoniacida existiría un 20-35% de casos en que la resistencia no podría ser detectada ya que el kit incluye las mutaciones más importantes en el gen *katG* y zona promotora del gen *inhA*. Esta proporción puede presentar variaciones geográficas.

Por otro lado, la diferencia más importante en la aplicación de esta prueba molecular en los aislamientos de cultivo y muestras con microscopía positiva con respecto a las muestras con microscopía negativa, es el porcentaje de *resultados inválidos o no interpretables*. En términos generales las muestras con micros-

copía negativa y microscopía positiva de bajo grado (1+) pueden tener un 5-12% de resultados inválidos (ausencia de bandas de control) y entre 1-19% de resultados no interpretables por ausencia simultánea de bandas naturales (salvajes o no mutadas) y mutadas en el mismo locus. Al menos dos tercios de estos casos son debidos a mutaciones distintas a las contenidas en el kit, pero que se producen en los mismos codones o en los adyacentes, por lo que se expresaran con un fenotipo resistente. No obstante, una tercera parte podrían corresponder a un fenotipo sensible y ausencia de mutación, en las que se ha especulado que la formación de estructuras de ADN secundarias, durante la amplificación, impediría el acceso a la hibridación de la sonda natural o no mutada.

Los *resultados discrepantes* pueden ser de dos tipos, genotipo sensible/fenotipo resistente (GS/FR) y genotipo resistente/fenotipo sensible (GR/FS). La incidencia de estas discrepancias es mayor en áreas donde la proporción de casos resistentes y la de MDR-TB es mayor. En países de alta incidencia de MDR-TB, como los países bálticos, se han descrito entre el 4% y el 13%. La eventualidad GS/FR sería debida, sobre todo, a los casos en que la causa de resistencia no está incluida en las posibilidades del kit. La opción GR/FS estaría causada por la coexistencia de poblaciones mixtas, sensible y resistente, o heterorresistentes, detectadas por el GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> pero no por las pruebas de sensibilidad fenotípicas. Una posible razón podría ser que la mayor *fitness* de la cepa sensible ocultase la presencia de la resistente. La secuenciación podría resolver estas discrepancias.

### GenoType® MTBDRs/

La resistencia XDR-TB supone alrededor del 9% de los casos con MDR-TB. Sin embargo, al menos, el 50% de los pacientes con MDR-TB son resistentes a otros fármacos, además de isoniacida y rifampicina, sin que cumplan criterios de XDR-TB. Las implicaciones pronósticas en el tratamiento son distintas en función del número de fármacos afectado. Desde este punto de vista, la aparición en los últimos años de pruebas de detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a diversos fármacos de segunda línea es un avance importante. El kit GenoType® MTBDRs/ es el más conocido de los pocos que existen. La base del diseño es la misma que en su homólogo para la isoniacida y la rifampicina. Existen dos versiones de esta prueba y que coexisten, actualmente, en el mercado. Son las versiones v1.0 y v2.0. La v1.0, que fue la primera en aparecer, detecta mutaciones de resistencia a los aminoglicósidos en el gen *rrs*, a las fluoroquinolonas en

el gen *gyrA*, y al etambutol en el gen *embB*. Las mutaciones de resistencia en el gen *rrs* son comunes a los aminoglucósidos y la capreomicina (polipéptido). El kit incluye dos sondas naturales sin mutar y dos sondas mutadas que cubren las mutaciones más frecuentes, en los codones 1401 y 1484, relacionadas con la resistencia a la amikacina, kanamicina y capreomicina. El kit dispone de tres sondas naturales que cubren los codones 85 a 96 y seis sondas mutadas para los codones 90, 91 (4 sondas) y 94. Por lo tanto como las mutaciones en *gyrA* en los codones 90 y 94 son responsables de más del 70% de las resistencias a las fluoroquinolonas, estas estarían cubiertas por esta prueba de detección molecular. En general, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos serían los principales objetivos de este producto, mientras que el etambutol tendría un papel secundario, y del que sólo detecta la mutación en el codón 306 del gen *embB*.

En un análisis Cochrane reciente y que incluyó 21 estudios, se observó una aceptable sensibilidad para las fluoroquinolonas, del 83-85%, con una especificidad del 97,7%. Los casos no interpretables fueron sólo un 0,2% cuando se realizaron sobre cultivos positivos y del 1,9% sobre muestra directa. Para los fármacos inyectables (incluyendo amikacina, kanamicina y capreomicina), la sensibilidad global fue del 77%, con una especificidad del 99%, y un 0,4% y 6% de resultados indeterminados para a partir de cultivos y muestras directas, respectivamente. No obstante, al analizar el rendimiento de cada fármaco, se observó una sensibilidad claramente inferior para la kanamicina (69,9%) respecto a la capreomicina (79,5%) y la amikacina (87,9%). La especificidad para la capreomicina fue del 95,8%, mientras que para los otros dos inyectables ascendió al 99,5%. Estos datos implican que una de cada cinco casos de resistencia a las fluoroquinolonas y uno de cada cuatro con resistencia a los inyectables, no se detectan. Estos resultados explicarían también que 1 de cada 4 casos de XDR-TB no serían diagnosticados con esta prueba. Por este motivo, en 2013 la OMS decidió que no podía recomendar esta prueba para la detección de mutaciones de resistencia a los fármacos de segunda línea. La menor sensibilidad para la kanamicina sería debida a la presencia de mutaciones en otras localizaciones, como son los genes *eis*, *tlyA* y *gidB*.

El fabricante ha desarrollado una segunda versión del kit, v2.0, en la que se han introducido diversas modificaciones. La detección de mutaciones de resistencia al etambutol ha sido retirada. Respecto a los inyectables, junto al gen *rrs* se ha incluido el gen *eis*, para

detectar mutaciones responsables de muchos casos (casi 80%) de bajo nivel de resistencia a la kanamicina. Por otra parte, el kit también ha incluido la detección de los codones 536 a 541 del gen *gyrB* para la detección de mutaciones de resistencia a las fluoroquinolonas. Esta nueva versión, que incluye 27 sondas en total, ha sido evaluada recientemente detectando el 83,6% de las resistencias a las fluoroquinolonas. Sin embargo, las mutaciones en *gyrB* únicamente se han observado en el 1,4% de las cepas resistentes. Un aspecto interesante son las ligeras diferencias observadas en la traducción fenotípica de la resistencia respecto al tipo de fluoroquinolona, siendo del 84,7% para ofloxacino y del 90% para moxifloxacino. Respecto a los fármacos inyectables, la v2.0 del kit ha mejorado en su rendimiento global hasta el 86,4%, casi un 10% más que la v1.0. En concreto para la kanamicina, la sensibilidad actual sería del 96%. Las mutaciones más frecuentes se producen en el codón 1401 del gen *rrs* y en las posiciones -10 y -14 del gen *eis*. En el 13% de las cepas no se detectan mutaciones en ninguno de estos dos genes. Este hecho se relaciona con más frecuencia a la capreomicina, lo cual podría ser debido a que la resistencia a este fármaco está regulada también por otros u otros genes. La inclusión del estudio del gen *eis*, ha supuesto también una disminución de la especificidad del 98% al 91% debido a que se han observado mutaciones en este gen, sobre todo en la posición -12, en algunas cepas fenotípicamente sensibles. No obstante, algunos autores han sugerido que podría tratarse de falsos negativos de las pruebas de sensibilidad fenotípicas. Son necesarios más estudios para dilucidar el significado de estos supuestos. La identificación de los casos XDR-TB ha mejorado con la versión 2.0, logrando una sensibilidad del 80%.

### Otras pruebas moleculares comerciales

Además de los sistemas GenoType® y Xpert® también tienen cierta difusión los kits de INNO-LiPA® RifTB (INNO Genetics), el Anyplex II™ MTB/MDR/XDR (Seegene) y el TB Resistance® Assay (AID; Autoimmun Diagnostika). El INNO-LiPA® es uno de los primeros métodos diseñados para detectar mutaciones de resistencia a la rifampicina. Los otros pueden detectar mutaciones de resistencia a los fármacos de primera y segunda línea. El Anyplex II™ MTB/MDR/XDR detectaría mutaciones en los genes *rpoB*, *KatG*, promotor del *inhA*, *gyrA*, *rrs*, y promotor del *eis*. El TB Resistance® Assay se ha comercializado más recientemente y su diseño es similar al GenoType. Las diferencias más importantes entre ambos se basan en la detección de mutaciones en el gen *rpsL*, entre los codones 43 y 88,

así como los codones 513 a 517 del gen *rrs*, ambos dirigidos a la detección de resistencia a la estreptomina.

Globalmente, aunque no obvian la realización de las pruebas de sensibilidad fenotípicas, la principal utilidad de los métodos de detección molecular de resistencia en el complejo *M. tuberculosis*, es la rapidez en ofrecer resultados de resistencia a los fármacos que permite aumentar el diagnóstico de nuevos casos de resistencia y de MDR-TB, en entornos de alta incidencia.

En el caso de las MNT, la falta de conocimiento de las implicaciones fenotípicas de los posibles mecanismos de resistencia ha dado lugar a que hasta hace muy poco no se dispusiera de un sistema comercial que permitiera la detección de alguno de ellos. Sin embargo, este mismo año ha aparecido un sistema (GenoType® NTM-DR, Hain Lifescience) que, además de identificar a nivel de especie o subespecie algunos aislados de MNT de interés médico, permite la detección de algunos de estos mecanismos, concretamente el gen *erm(41)* de *M. abscessus*, así como la detección de mutaciones en los genes *rrs* (aminoglucósidos) y/o *rrl* (macrólidos) mediante una técnica de PCR e hibridación reversa en fase sólida, similar a la tecnología desarrollada por esta casa comercial para el complejo *M. tuberculosis*.

No obstante, queda pendiente de determinar la relevancia clínica de estos hallazgos, así como la implicación real de algunos de los mecanismos moleculares en la resistencia fenotípica de estas micobacterias. Otros posibles mecanismos de resistencia (como el desarrollo de biopelículas) podrían tener también una gran relevancia en determinados cuadros clínicos y en un futuro deberían ser estudiados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaide F (Coordinador). Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. Procedimientos en microbiología clínica 9a. SEIMC 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>.
- Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29 (Suppl 1):34-40.
- Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:545-582.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania USA, 2011.
- Dominguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach K, Gagneux S, et al. for the TBNET and RESIST-TB network. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016; 20:24-42.
- Global Alliance for TB Drug Development (TB Alliance). Handbook of Anti-tuberculosis Agents. Tuberculosis 2008; 88: 85-170.
- González J, García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, Moreno S, Ruiz J. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 2010; 28:297.e1-297.e20.
- Inderlied CB, Pfyffer GE. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003, pp. 1149-1177.
- Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing and mechanisms of action and resistance. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, p. 155-226.
- Master RN. Mycobacteriology. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995, pp. 3.0.1-3.16.4.
- Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2014; 1:CD009593. doi: 10.1002/15651858.
- Tagliani E, Cabbibe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjo M, et al. Diagnostic performance of the new version (v2.0) of GenoType MTBDRsl assay for detection of resistance to fluoroquinolones and second line injectable drugs: a multicenter study. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 2961-2969.
- Theron P, Richardson M, Barnard M, Donegan S, Warren R, Steingart KR, et al. The diagnostic accuracy of the GenoType® MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2014; 10: CD010705. doi: 10.1002/14651858.
- UNITAID. World Health Organization. Tuberculosis Diagnostics Technology and Market Landscape. 4th edition. Geneva: UNITAID; 2015. Disponible en [http://unitaid.org/images/marketdynamics/publications/Tuberculosis\\_diagnostics\\_technology\\_and\\_market\\_landscape\\_4th\\_edition\\_Oct\\_2015.pdf](http://unitaid.org/images/marketdynamics/publications/Tuberculosis_diagnostics_technology_and_market_landscape_4th_edition_Oct_2015.pdf)
- van Ingen J, van der Laan T, Dekhuijzen R, Boeree M, van Soolingen D. *In vitro* drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous Mycobacterium isolates of 49 species in

- 
- The Netherlands. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35:169-173.
16. van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, Mouton JW. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resistance Updates*. 2012; 15:149-161.
  17. World Health Organization. Non-commercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis. Policy statement. Geneva: WHO Press; 2011. WHO/HTM/TB/2011.9. Disponible en [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44601/1/9789241501620\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44601/1/9789241501620_eng.pdf)
  18. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva: WHO Press; 2015. Disponible en [www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
  19. Woods GL, Lin SYG, Desmond EP. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, Nocardia, and other Actinomycetes. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry M L, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. Washington DC: ASM Press; 2011, vol.I, pp. 1215-1238.
  20. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009; 13:1320–1330.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante sistemas de cultivo automatizados basados en medios líquidos	PNT-SBK-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe la metodología para la realización de las pruebas de sensibilidad en el complejo *M. tuberculosis* frente a los fármacos de primera y segunda línea mediante los sistemas de cultivo automatizados no radiométricos basados en medios líquidos: Bactec MGIT 960 y VersaTREK/ESP Culture System II.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica de referencia que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y las técnicas de sensibilidad *in vitro* de los mismos.

## 2. FUNDAMENTO

Las pruebas de sensibilidad en el complejo *M. tuberculosis* deben realizarse en todos los aislamientos primarios de cada nuevo paciente, cuando se indiquen retratamientos, ante fracasos clínicos y cuando se sospeche resistencia. Existen distintos métodos de realización e interpretación del estudio de sensibilidad, aunque el más utilizado es el de las proporciones descrito por Canetti, Rist y Grosset, en el que se estudian determinadas concentraciones de antibióticos frente a dos diluciones distintas del inóculo bacteriano. Las pruebas iniciales de sensibilidad para *M. tuberculosis* complex deben incluir todos los fármacos de primera línea: isoniacida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB) y estreptomycin (SM), ya que esta selección de fármacos proporciona al clínico información sobre el esquema terapéutico actualmente recomendado para la mayoría de los pacientes. Como la resistencia a estos fármacos no es predecible e implicará modificaciones en el tratamiento, es esencial poder disponer de los resultados de las pruebas de sensibilidad en el menor plazo de tiempo posible. En el caso de resistencia a la RMP y/o dos fármacos de primera línea, deberían realizarse las pruebas de sensibilidad a los fármacos de segunda línea: amikacina (AK), capreomicina (CAP), kanamicina (KAN), etionamida (ETH), ácido para-aminosalicílico (PAS), levofloxacino (LEV), moxifloxacino (MXF), rifabutin (RFB) y linezolid (LZD), fundamentalmente.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Alcaide F (Coordinador). Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. Procedimientos en microbiología clínica 9a. SEIMC 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania USA, 2011.
3. Manual de instrucciones de los kits comerciales: BACTEC MGIT 960 SIRE, BACTEC MGIT 960 PZA, VersaTREK Myco susceptibility kit, VersaTREK Myco Streptomycin y VersaTREK Myco PZA kit.
4. Pérez Sáenz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>
5. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>

## 4. MUESTRAS

Aislamientos recientes de *M. tuberculosis* complex obtenidos a partir de los medios de cultivo para micobacterias, tanto líquidos como sólidos, e identificados a nivel de especie de acuerdo a los manuales de procedimiento y a la normativa existente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante sistemas de cultivo automatizados basados en medios líquidos	PNT-SBK-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Viales de cultivo de micobacterias, suplementos nutricionales, y dispositivos habitualmente empleados con los sistemas MGIT y VersaTREK.

### MGIT:

- Tubos de cultivo MGIT.
- BACTEC MGIT 960 SIRE kit.
- BACTEC MGIT SIRE supplement.
- BACTEC MGIT 960 PZA kit.
- BACTEC MGIT 960 PZA médium.
- BACTEC MGIT PZA supplement.

### VersaTREK:

- VersaTREK Myco susceptibility kit.
  - VersaTREK Myco Streptomycin.
  - VersaTREK Myco PZA kit.
  - VersaTREK Myco GS.
  - VersaTREK Connectors.
- Las concentraciones críticas que se analizan con estos sistemas vienen predeterminadas por el fabricante.
    - **MGIT 960:** INH 0,1 y 0,4 mg/L; RIF 1 mg/L; EMB 5 y 7,5 mg/L; SM 1 y 4 mg/L y PZA 100 mg/L.
    - **VersaTREK:** INH 0,1 y 0,4 mg/L; RIF 1 mg/L, EMB 5 y 8 mg/L; SM 2 y 8 mg/L; y PZA 300 mg/L.
  - En el caso de resistencia a la rifampicina y/o dos fármacos de primera línea deberían realizarse pruebas de sensibilidad a los fármacos de segunda línea. Estos se pueden obtener directamente del fabricante o vía comercial. No sirven los preparados para uso clínico y debe tratarse de sustancia valorada, donde aparezca reflejada la potencia (expresada en mg/L), la fecha de caducidad, el número de lote, las condiciones de almacenamiento, estabilidad y solubilidad. Las concentraciones críticas de estos fármacos son:
    - Amikacina (AK; 1 mg/L), capreomicina (CAP; 2,5 mg/L), etionamida (ETH; 5 mg/L), kanamicina (KAN; 2,5 mg/L), levofloxacin (LEV; 1,5 mg/L), linezolid (LZD; 1 mg/L), moxifloxacin (MX; 1,5 mg/L), ácido paraminosalicílico (PAS; 4 mg/L), rifabutina (RFB; 0,5 mg/L).
    - Para la clofazimina (CFZ) y la cicloserina (CS) no están establecidas las concentraciones críticas y se suele aplicar su equivalencia con el método de las proporciones, que sería de 30 mg/L para la CFZ y 5 mg/L para CS. Los nuevos fármacos como bedaquilina y delamanid tampoco tienen puntos de corte establecidos, aunque mediante criterios epidemiológicos se han barajado diferentes concentraciones críticas en el MGIT 960: 1-1,6 mg/L para la bedaquilina y 0,04 mg/L para el delamanid.
  - Medio de cultivo agar sangre.
  - Agua destilada estéril.
  - Dimetil-sulfóxido (DMSO).
  - Metanol y etanol absoluto.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante sistemas de cultivo automatizados basados en medios líquidos	PNT-SBK-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica IIA o superior.
- Sistemas automáticos de incubación y detección BACTEC MGIT960 o VersaTREK/ESP Culture System II.
- Bata impermeable y guantes de protección.
- Mascarillas FFP2.
- Micropipetas de volumen variable.
- Puntas de micropipeta.
- Gradillas para tubos y viales.
- Pipetas Pasteur desechables (1 y 3 ml).
- Agitador tipo vórtex.
- Contenedor de residuos.
- Soluciones desinfectantes.

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

#### 7.1.1. Preparación de los viales y de las soluciones de antibióticos

- Se seguirán las indicaciones de cada fabricante. Se deben reconstituir los viales de los fármacos de primera línea (SM, INH, RMP, EMB y PZA) de acuerdo al manual de procedimiento propio de cada sistema. En el caso concreto de la PZA existe un protocolo específico e individualizado para este fármaco.
- En el caso de los fármacos de segunda línea se deberán preparar las soluciones de stock de 1000 mg/L o superiores de cada fármaco (estables durante 6 meses a -20°C o durante 1 año a -70°C) y empleando el solvente adecuado, que para la mayoría de los fármacos será agua destilada estéril, excepto para la clofazimina que precisa etanol absoluto, la etionamida que se disuelve en dimetil-sulfóxido (DMSO) y la rifabutina en metanol o en DMSO.
- A continuación se preparan y etiquetan todos los viales de cultivo necesarios para completar el antibiograma y se precisará un vial para cada concentración crítica de los diferentes fármacos de primera línea que se va a analizar y además dos viales extra como control de crecimiento a los que no se les añadirán antibiótico: uno para la PZA y otro vial de control para el resto de fármacos.
- Posteriormente se reconstituyen todos los viales de cultivo con la cantidad recomendada de suplemento nutricional específico propio de cada sistema comercial, y en un segundo momento se añaden los fármacos a sus correspondientes viales en la cantidad indicada para alcanzar la concentración crítica de referencia.

#### 7.1.2. Preparación del inóculo

- Se realizará a partir del vial de cultivo positivo propio de cada sistema. En el caso del sistema MGIT para realizar el estudio pueden utilizarse alícuotas de este vial primario, directamente, dependiendo de los días transcurridos desde la positividad. Pero en el caso del sistema VersaTREK no se utiliza nunca el vial positivo directamente, sino que primero siempre debe ajustarse la densidad del inóculo que posteriormente va a emplearse.
- Sistema MGIT:
  - El primer día que el instrumento registra un resultado positivo se considerará el día 0. Este vial puede utilizarse directamente para preparar el inóculo desde el día siguiente en que el instrumento registra el positivo (día 1) hasta el quinto día inclusive desde la fecha de positividad (día 5). Excedido este plazo de tiempo habrá que realizar un subcultivo en un nuevo vial suplementado y repetir la incubación y esperar a que vuelva a mostrar positividad.
  - Aquellos inóculos que se realicen los días 1 o 2 desde la positividad no requerirán dilución previa del tubo primario, mientras que los realizados los días 3, 4 ó 5 después de la positividad deberán diluirse 1:5 con una solución salina estéril.
  - A cada vial con fármaco se le añaden 0,5 ml de la suspensión de microorganismos del tubo primario. Sin embargo, el vial que se usará como control de crecimiento se inocula con una dilución 1:100 del

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante sistemas de cultivo automatizados basados en medios líquidos	PNT-SBK-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

tubo primario (0,1 ml del tubo primario en 10 ml de solución salina estéril).

- Los tubos se cierran para evitar la pérdida de oxígeno y su contenido se mezcla bien, invirtiéndolos varias veces. Los viales se introducen en el instrumento (MGIT 960) de acuerdo a un orden preestablecido y que los identifica como una batería de pruebas de sensibilidad. Para ello se utiliza una gradilla o soporte de plástico denominado AST, que permite introducir tubos identificados en las celdas correspondientes.
  - El código de barras del soporte AST sirve para que el analizador identifique el tipo de protocolo (SIRE o PZA u otras combinaciones) y como registro del inicio del periodo de incubación de una batería de tubos de estudio de sensibilidad.
- Sistema VersaTREK:
    - A partir del vial primario positivo se prepara una suspensión de microorganismos ajustando la turbidez al nº 1 de la escala de McFarland.
    - Después en otro tubo se diluye 1:10 y ésta será la suspensión que se utilizará para añadir 0,5 ml a cada vial previamente suplementado con 1 ml de VersaTREK Myco GS y conteniendo el fármaco correspondiente.
    - Posteriormente se acopla el conector al frasco y se introduce en el analizador.

### 7.1.3. Control de calidad

- Es recomendable utilizar la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) con cada nuevo lote de fármacos.
- Para descartar una potencial contaminación bacteriana o fúngica, en la fase de inoculación de los viales o tubos es recomendable incluir además una placa de agar sangre o agar chocolate que se incubará 72 h a 35-37°C. Asimismo se realizará una tinción de Ziehl-Neelsen de comprobación en todos los viales en los que se detecte crecimiento.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Sistema MGIT:
  - La prueba se debe completar en un plazo de 4 a 13 días.
  - La detección del crecimiento se determina por el propio analizador que controla los conjuntos de AST y tiene en cuenta la fecha de positividad del control de crecimiento diluido 1:100.
  - Una vez completado el procedimiento, y de acuerdo al algoritmo de interpretación propio de este sistema, emite un informe de resistencia o sensibilidad a las concentraciones críticas de los fármacos analizados.
- Sistema VersaTREK:
  - La detección del crecimiento se determina por el instrumento, y la prueba se debe completar en 13 días o menos.
  - De acuerdo con el algoritmo de detección propio de este sistema, una vez que el vial con el control de crecimiento (sin fármaco) es detectado como positivo, la incubación se pospone tres días más. Aquellos viales que no hayan dado positivo en ese plazo se consideran que contienen una cepa *sensible* a la concentración crítica analizada (no se valorarán positividad a partir de cuarto día). Cuando la positividad se detecte a la vez o en el plazo de los tres días siguientes se considerará que contienen una cepa *resistente*.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante sistemas de cultivo automatizados basados en medios líquidos	PNT-SBK-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Éstas deberán estar recogidas en un documento establecido por el Servicio de Microbiología.

En el caso del complejo *M. tuberculosis* deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por este motivo, se aconseja realizar todos los pasos de manipulación de cultivos, preparación del inóculo e inoculación de los viales en cabinas de seguridad biológica clase IIA o superior, utilizando bata, guantes y mascarillas desechables de uso exclusivo.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las pruebas de sensibilidad deben llevarse a cabo a partir de cultivos puros de micobacterias, por lo que siempre se deberá comprobar la pureza del cultivo y la ausencia de contaminantes que podrían inducir a la obtención de resultados erróneos, de manera especial en aquellos viales en los que se detecte resistencia.

Asimismo, como en este tipo de pruebas el tamaño del inóculo es crítico, deberán seguirse de manera rigurosa las indicaciones del fabricante referentes a la necesidad de diluir en mayor o menor grado el cultivo primario antes de inocular los viales de la prueba de sensibilidad.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-2nd ed. CLSI document M24-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
2. Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing and mechanisms of action and resistance. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2005, pp. 155–226.
3. Master RN. Mycobacteriology. In: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995, pp. 3.0.1-3.16.4.
4. Woods GL, Lin SYG, Desmond EP. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, Nocardia, and other Actinomycetes. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry M L, Warnock DW, editors Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. Washington DC: ASM Press; 2011, vol.I, pp. 1215-1238.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante el método de las proporciones en agar	PNT-SBK-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es definir la metodología para la realización de las pruebas de sensibilidad en *M. tuberculosis* frente a antibióticos de primera y segunda línea en medio de cultivo sólido con agar.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de hospitales y centros de salud con capacidad para realizar las técnicas de cultivo de micobacterias, que posean las instalaciones adecuadas y la experiencia y entrenamiento suficiente para garantizar la validez de los resultados. Cada laboratorio debe establecer la conveniencia de su realización atendiendo a sus dotaciones y a su estrategia de gestión.

## 2. FUNDAMENTO

Las pruebas de sensibilidad en el complejo *M. tuberculosis* deben realizarse en todos los aislamientos primarios de cada nuevo paciente, cuando se indiquen retratamientos, ante fracasos clínicos y cuando se sospeche resistencia. Además, cuando la tuberculosis afecte simultáneamente a más de un órgano, los estudios de sensibilidad deberían individualizarse para cada localización sin presuponer que el resultado vaya a ser siempre coincidente. Existen tres métodos distintos de interpretación y realización del estudio de sensibilidad, aunque el más utilizado es el de las proporciones descrito por Canetti, Rist y Grosset, en el que se estudian determinadas concentraciones de antibióticos frente a dos diluciones distintas del inóculo bacteriano. Los antibióticos frente a los que se considera que su utilidad está probada son: isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomina, kanamicina, etionamida y capreomicina. Los resultados son inconsistentes para cicloserina y presentan algunas dificultades para pirazinamida. Puede realizarse directamente a partir de muestras con baciloscopia positiva o a partir de aislamientos crecidos en cultivo. Los antibióticos pueden diluirse en el agar durante la preparación del medio o pueden utilizarse discos de forma similar al método disco/placa de Kirby-Bauer utilizado frente a otras bacterias.

El protocolo que se describe en este documento se basa en la utilización del método de las proporciones, con el medio de agar 7H10 de Middlebrook frente a concentraciones críticas de los antibióticos mencionados, excepto pirazinamida y cicloserina, incluidos en el agar por dilución, utilizando placas de Petri sectorizadas y a partir de aislamientos de cultivo.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alcaide F (Coordinador). Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. Procedimientos en microbiología clínica 9a. SEIMC 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania USA, 2011.
- Pérez Sáenz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>
- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>

## 4. MUESTRAS

Aislamientos de cultivo de las primeras muestras obtenidas antes de iniciar el tratamiento o el retratamiento.

Deben utilizarse resiembras en cultivo puro y de no más de un mes de crecimiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante el método de las proporciones en agar	PNT-SBK-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medios de cultivo de Middlebrook 7H10 y 7H9.
- Medio de cultivo agar sangre.
- Suplemento OADC.
- Glicerol.
- Dimetil-sulfóxido (DMSO).
- Metanol y etanol absoluto.
- Agua destilada estéril.
- Soluciones de stock de los antibióticos obtenidos de presentaciones comerciales o de los laboratorios farmacéuticos fabricantes. No sirven los preparados para uso clínico, debe tratarse de sustancia valorada, donde aparezca reflejada la potencia (expresada en mg/L), fecha de caducidad, número de lote, condiciones de almacenamiento, estabilidad y solubilidad.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica IIA o superior.
- Centrífuga con sistema de cierre de seguridad.
- Agitador tipo vórtex
- Hornillo o agitador magnético con bloque térmico.
- Barras magnéticas.
- Placas de Petri estériles sectorizadas.
- Estándar de densidad McFarland n° 1 o nefelómetro.
- Perlas de vidrio estériles.
- Pipetas Pasteur estériles, de cristal o de plástico.
- Pipetas calibradas estériles, de 1, 5 y 10 ml.
- Puntas de pipeta semiautomática estériles.
- Filtros antibacterianos desechables, estériles y con poro de 0,22 µm
- Gradillas para tubos y viales.
- Contenedor de residuos.
- Soluciones desinfectantes.

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

#### 7.1.1. Preparación de las soluciones de antibióticos

- Preparar una solución de stock de 2.000 mg/L de cada uno de los antibióticos que permanecerán estables durante 6 meses a -20°C y un año a -70°C.
- Para preparar las soluciones de stock se utilizará agua destilada en la mayoría de antibióticos. La rifampicina y etionamida se diluyen con DMSO, agregando la mínima cantidad posible hasta conseguir la disolución. Para el resto del volumen diluyente se utiliza agua destilada. En la preparación de la rifabutina se utiliza el metanol (alternativamente DMSO) y para la clofazimina el etanol absoluto.
- Después de filtrar las soluciones de stock, preparar alícuotas estériles de 1 ml. Pueden conservarse hasta 12 meses a -20°C o más tiempo a -80°C.
- Las alícuotas deben estar convenientemente rotuladas indicando el nombre del antibiótico, la concentración de stock y la fecha de preparación.
- Una vez descongeladas no deben reutilizarse.
- Las concentraciones finales (críticas) a estudiar se indican en la **tabla 1** (anexo I).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante el método de las proporciones en agar	PNT-SBK-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

### 7.1.2. Preparación del medio de cultivo

- Pesar medio 7H10 de Middlebrook deshidratado en suficiente cantidad para 1.700 ml de agua destilada, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
- Mezclar cuando el agua esté a 50-60°C utilizando un agitador magnético o un hornillo.
- Continuar calentando hasta que la mezcla sea homogénea y el medio de cultivo adquiera un color más transparente (aproximadamente 20 min).
- Añadir 8,5 ml de glicerol (0,5 ml/100 ml), mezclar y calentar 3 min más.
- Repartir 180 ml de medio en 8 matraces de 500 ml y añadir una barra magnética a cada uno de ellos.
- Cubrir los matraces con un tapón a rosca o con papel de aluminio y autoclavar durante 15 min a 121°C.
- Dejar enfriar el medio a 50-56°C y añadir 20 ml de OADC a cada matraz.
- Añadir las soluciones de antibiótico a cada matraz según lo especificado en la tabla y mezclar.
- Rotular las placas con las iniciales y concentraciones de los antibióticos, así como la fecha de preparación. Llenar las dos mitades con el contenido del mismo matraz. Dejar enfriar.
- El medio de cultivo preparado será adecuado para 9-10 placas de cada concentración y del medio de cultivo sin antibiótico.
- Incubar las placas durante una noche para descartar contaminación durante la preparación.
- Almacenar las placas preparadas a 4°C, en bolsas de plástico separadas por antibióticos. Utilizar en el plazo de un mes.

### 7.1.3. Preparación del inóculo

- Preparar una suspensión equivalente al n° 1 de McFarland, utilizando caldo de 7H9 de Middlebrook, perlas de cristal y tubos con tapón a rosca. Deben tomarse colonias representando todos los posibles tipos presentes en el cultivo.
- Alternativamente puede prepararse una suspensión menos densa e incubarla durante 3-5 días hasta alcanzar la densidad 1 de McFarland.
- Diluir la suspensión a  $10^{-2}$  y a  $10^{-4}$  utilizando 7H9 o agua destilada.

### 7.1.4. Inoculación e incubación

- Para cada cepa a estudiar preparar las placas de los antibióticos de interés, añadiendo una sin antibiótico que se usará como control.
- Se inoculará cada concentración de antibiótico con las dos diluciones de inóculo, de manera que en una misma placa estarán ambas diluciones de inóculo y la misma concentración de antibiótico.
- Inocular una gota con una pipeta Pasteur de plástico de 1 ml (50 µl) de cada suspensión en el sector correspondiente de las placas. Extender con la ayuda de la pipeta Pasteur estéril o utilizar asas de tipo Digrafsky. Dejar secar el inóculo, sin extraer las placas de la cabina de seguridad (aproximadamente una hora).
- Inocular placas de agar sangre con ambas diluciones del inóculo para comprobar la esterilidad.
- Empaquetar en bolsas de polietileno, permeables a CO<sup>2</sup> e incubar a 37°C en atmósfera de CO<sup>2</sup>, durante 21 días.

### 7.1.3. Control de calidad

- Es recomendable utilizar la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) con cada nuevo lote de fármacos.
- La cepa de control debe ser sensible a todos los antibióticos de primera y segunda línea, siguiendo los mismos criterios de interpretación aplicados a las cepas problema.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Examinar las placas de agar sangre de control de esterilidad durante el primer y segundo día de incubación. Si se detecta crecimiento de bacterias contaminantes, desechar la prueba de sensibilidad.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en <i>M. tuberculosis</i> complex mediante el método de las proporciones en agar	PNT-SBK-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

- Examinar las placas de 7H10 de Middlebrook sin antibiótico semanalmente. Cuando se observe crecimiento en la dilución  $10^{-4}$  pueden leerse las placas con antibiótico.
- Si no se observa crecimiento adecuado en 21 días de incubación, debe repetirse la prueba de sensibilidad.
- Interpretar el resultado final a las 3 semanas de incubación. Para ello debe efectuarse un recuento de las colonias crecidas en las dos diluciones del control sin antibiótico y en las diluciones con antibiótico.
- Las colonias deben ser contables en una de ambas diluciones de la placa control. Idealmente en la dilución  $10^{-4}$  deberá haber entre 50 y 200 colonias.
- Si en la dilución  $10^{-4}$  hay 50 colonias o más, el resultado debe interpretarse con este recuento.
- Si en la dilución  $10^{-4}$  hay menos de 50 colonias, el resultado puede interpretarse con la dilución  $10^{-2}$  siempre que en ésta haya más de 50 colonias.
- Si en ambas diluciones hay incontables colonias y en las placas con antibiótico no se observa crecimiento, puede interpretarse que la cepa es sensible. Si se observa crecimiento en alguna de ellas, debe repetirse toda la prueba.
- Cuando se observe crecimiento en las placas con antibiótico, se determinará el porcentaje de colonias en relación al control. Cuando se observe crecimiento igual o superior al 1% se considerará la cepa resistente a la concentración estudiada.
- Si se observa crecimiento de microcolonias en una placa con antibiótico, también deben contabilizarse (posiblemente indican resistencia de menor nivel).
- Los resultados deben exponerse con las concentraciones estudiadas y la interpretación categorizada de sensible o resistente para cada una de ellas. Cuando se utilicen dos concentraciones del mismo antibiótico y únicamente sea resistente a la inferior, sería aconsejable añadir un comentario parecido al siguiente: “Los resultados señalan resistencia de bajo nivel a.....Indica que el paciente puede seguir beneficiándose de la utilización de este fármaco en su tratamiento”

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el *personal* del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Éstas deberán estar recogidas en un documento establecido por el Servicio de Microbiología.

En el caso del complejo *M. tuberculosis* deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por este motivo, se aconseja realizar todos los pasos de manipulación de cultivos, preparación del inóculo e inoculación de los viales en cabinas de seguridad biológica clase IIA o superior, utilizando bata, guantes y mascarillas desechables de uso exclusivo.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El método descrito no es totalmente adecuado para determinar la sensibilidad a la pirazinamida, para la que se recomienda utilizar el método radiométrico como técnica de referencia. Así mismo, en los últimos años se han incorporado nuevos fármacos al tratamiento de la tuberculosis multirresistente, como el linezolid, la bedaquilina y el delamanid frente a las cuales no se ha validado esta técnica. Si bien, mediante criterios epidemiológicos se ha barajado el punto de corte de 0,25 mg/L para la bedaquilina en medio de agar 7H11 de Middlebrook.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en <i>M. tuberculosis</i> complejo mediante el método de las proporciones en agar	PNT-SBK-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard-2nd ed. CLSI document M24-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
2. Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing and mechanisms of action and resistance. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2005, pp. 155–226.
3. Master RN. Mycobacteriology. In: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995, pp. 3.0.1-3.16.4.
4. Woods GL, Lin SYG, Desmond EP. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, Nocardia, and other Actinomycetes. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry M L, Warnock DW, editors Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. Washington DC: ASM Press; 2011, vol.I, pp. 1215-1238.

## 13. ANEXO

**Tabla 1. Concentraciones finales de trabajo (críticas) y preparación de los diferentes antimicrobianos para las pruebas de sensibilidad en el complejo *M. tuberculosis* mediante el método de las proporciones en agar.**

Antibiótico	Conc. Final* (mg/L)	Vol. sol. stock* (µl)	H <sub>2</sub> O diluyente de sol. stock (µl)	Vol. medio cultivo (ml)*
Amikacina	4	400	600	200
Capreomicina	10	1000	0	200
Clofazimina	5	500	500	200
Estreptomina	2	200	800	200
Etambutol	5	500	500	200
Etionamida	5	500	500	200
Isoniacida	0,2	20	980	200
	1	100	900	200
Kanamicina	5	500	500	200
Levofloxacino	1	100	900	200
Moxifloxacino	0,5	50	950	200
PAS	2	200	800	200
Rifabutina	0,5	50	950	200
Rifampicina	1	100	900	200

\* Conc. Final: concentración final; Vol. sol. stock: Volumen de la solución de stock del antimicrobiano; Vol. medio cultivo: volumen del medio de cultivo; PAS: ácido para-amino salicílico.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

## PNT-SBK-03

# Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización de la prueba de sensibilidad *in vitro* de las micobacterias de crecimiento rápido (MCR) a distintos antimicrobianos, mediante la técnica de microdilución en caldo.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica de referencia que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y las técnicas de sensibilidad *in vitro* de los mismos.

## 2. FUNDAMENTO

Aunque existen múltiples técnicas que se pueden utilizar, tan sólo la técnica de microdilución en caldo ha sido aprobada por el CLSI y es, en la actualidad, el método de referencia. En esta prueba de sensibilidad se determina la CIM (concentración inhibitoria mínima) de distintos antimicrobianos y, se basa en el método de microdilución en caldo estándar, recomendado para las bacterias aerobias convencionales. El caldo base es Mueller-Hinton, al que se le añaden los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de estos microorganismos. Por ello, debe contener cationes como  $\text{Ca}^{2+}$  (20-25 mg/L) y  $\text{Mg}^{2+}$  (10-12,5 mg/L), así como un pH de 7,2-7,4. El procedimiento debería realizarse en los aislamientos clínicos de *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* y cualquier micobacteria no pigmentada de crecimiento rápido con significación clínica.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alcaide F (Coordinador). Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. Procedimientos en microbiología clínica 9a. SEIMC 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania USA, 2011.
- Pérez Sáenz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>
- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>

## 4. MUESTRAS

Cualquier cultivo micobacteriano en medio sólido (Löwenstein-Jensen, 7H10 o 7H11 de Middlebrook) con un crecimiento puro de MCR no pigmentada de no más de 7-10 días.

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Caldo de Mueller-Hinton suplementado con cationes y 0,02% de Tween 80.
- Medio líquido de TSB (alternativo).
- Solución salina (0,85% de NaCl) estéril (alternativo).
- Agua estéril.
- Sustancia valorada de los siguientes antimicrobianos: amikacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, sulfametoxazol y tobramicina.
- Placas de agar con sangre de carnero.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

## 6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3.
- Incubador de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  con  $\text{CO}_2$ .
- Incubador de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Placas de microtitulación o microtiter de 96 pocillos con fondo redondeado en "U".
- Agitador rotatorio Vórtex.
- Nefelómetro.
- Tubos de con bolitas de cristal estériles.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Tubos de plástico de 50 ml tipo Falcon.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escobillones o torundas estériles.
- Micropipetas de volumen variable uni y multicanal.
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.

## 7. PROCESAMIENTO

### 7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

#### 7.1.1. Preparación de las soluciones de antibióticos

- A partir de la sustancia valorada de cada antimicrobiano, se preparará una *solución stock o madre* con los solventes y diluyentes recomendados por los fabricantes a una concentración elevada (1.000-10.000 mg/L) para una adecuada conservación. Se realizarán alícuotas en viales de polipropileno o polietileno. De esta manera, la *solución madre* podrá permanecer estable a  $-70^\circ\text{C}$  durante al menos 6-12 meses.
- A partir de la *solución stock o madre* se realizarán diluciones con agua estéril para obtener las *concentraciones de trabajo* deseadas: amikacina (1 a 128 mg/L), cefoxitina (2 a 256 mg/L), ciprofloxacino (0,12 a 16 mg/L), claritromicina (0,06 a 64 mg/L), doxiciclina (0,25 a 32 mg/L), imipenem (1 a 64 mg/L), sulfametoxazol (1 a 64 mg/ml) y tobramicina (1 a 32 mg/L, sólo valorable para *M. chelonae*).
- Una vez que se preparan las *concentraciones de trabajo*, se deberán utilizar en las primeras 24 horas y se mantendrá el antibiótico en el frigorífico ( $2-8^\circ\text{C}$ ) si no se van a usar inmediatamente.

#### 7.1.2. Preparación de las placas de microdilución

- En cada placa de microtitulación hay 96 pocillos (12x8) y, por tanto, para cada aislamiento micobacteriano se pueden estudiar hasta 12 diluciones de cada uno los 8 antimicrobianos mencionados. No obstante, no suelen hacer falta tantas diluciones y algunos de los pocillos pueden reservarse para el control positivo de crecimiento (sin antibiótico) y negativo de esterilidad (sin inóculo).
- Añadir con una pipeta multicanal 100  $\mu\text{l}$  de caldo de Mueller-Hinton ajustado con cationes en cada pocillo, salvo la primera columna de pocillos correspondiente a la concentración más elevada de cada antimicrobiano.
- Dispensar en cada pocillo vacío 200  $\mu\text{l}$  de la dilución más elevada de cada antimicrobiano. A partir de éste se realizarán diluciones a la mitad, traspasando 100  $\mu\text{l}$  al siguiente pocillo en la fila perteneciente al mismo antimicrobiano.
- En el pocillo de control de crecimiento y en el de control de esterilidad no se añadirá antibiótico alguno.
- Es recomendable utilizar (inocular) las placas lo antes posible.

#### 7.1.3. Preparación del inóculo

- Sembrar el aislamiento micobacteriano en una placa de agar sangre e incubar a  $30^\circ\text{C}$  durante 3-5 días en atmósfera aerobia normal.
- A partir del crecimiento en agar sangre y con un escobillón, se preparará una suspensión en agua destilada de una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland usando un nefelómetro ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). Alternativamente, se pueden transferir 3-5 colonias de la placa de agar sangre a un tubo con caldo de Mueller-Hinton (con Tween

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

80) o TSB y bolitas; incubar a 30°C durante 1-3 días hasta conseguir una turbidez correspondiente al 0,5 de McFarland.

- Agitar la suspensión con vórtex durante 15-20 s. Si persisten los grumos, esperar a que descendan al fondo del tubo y transferir 0,5 ml del sobrenadante a un tubo con 4,5 ml de agua destilada (dilución 1:10 =  $1,5 \times 10^7$  UFC/ml).
- Agitar la dilución con vortex durante 15-20 s y añadir 4 ml de la misma a 36 ml de agua destilada (dilución 1:10 =  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml).

#### 7.1.4. Inoculación e incubación

- Inocular la placa de microdilución mediante una pipeta multicanal. Se transferirán 10 µl (0,01 ml) de la dilución bacteriana final en cada pocillo, que contiene 100 µl (0,1 ml) del caldo de cultivo con la concentración del antimicrobiano correspondiente. Por tanto, se añade una nueva dilución 1:10, consiguiendo una concentración bacteriana de  $1,5 \times 10^5$  UFC/ml o  $1,5 \times 10^4$  UFC por pocillo.
- El pocillo de control negativo o esterilidad no se inoculará.
- Las placas se deberán sellar mediante un plástico adhesivo e incubar a 30°C en atmósfera aerobia normal entre 3 y 5 días.

#### 7.1.5. Control de calidad

- Para descartar una posible *contaminación* bacteriana o fúngica, a parte del pocillo de control, es recomendable transferir del inóculo bacteriano 0,1 ml a una placa de agar sangre e incubar a 35-37°C durante 72 h.
- Es aconsejable utilizar una cepa de control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar. La cepa de referencia recomendada es *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686 que se incubará a 30°C durante 3 días. Alternativamente se puede utilizar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Los criterios interpretativos de los resultados obtenidos con las cepas de control aparecen en la **tabla 1** (ver anexo).

## 8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Comprobar diariamente que no existe una contaminación bacteriana o fúngica.
- No se debe prolongar la incubación más allá de 5 días, por la posible alteración (inestabilidad) de los agentes antimicrobianos. En cualquier caso, los resultados tras 5 días de incubación suelen ser poco fiables.
- Los resultados se deberán leer e interpretar tras 3 días de incubación.
- En general, con un crecimiento adecuado, las pruebas de sensibilidad de *M. fortuitum* y *M. peregrinum* se pueden leer al tercer día de incubación. Si no fuera así se debería incubar 1 ó 2 días más.
- La CIM se define como la concentración más baja de un antimicrobiano en la que no hay un crecimiento bacteriano visible. En el caso del sulfametoxazol, la CIM sería la correspondiente al pocillo donde se observa una inhibición del crecimiento del 80% (aproximadamente) en comparación con el pocillo de control.
- Los criterios de interpretación (puntos de corte) aparecen en la **tabla 2** (ver anexo).

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento debería llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Aunque se trate de micobacterias, en el caso de las especies de crecimiento rápido no son necesarias las medidas de protección de nivel 3, dado que se trata de organismos de nivel 2. Sí que podría ser deseable la preparación de las placas y la inoculación de las mismas en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger la muestra, para evitar en lo posible las contaminaciones fúngicas.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El método de microdilución en caldo queda casi limitado a aquellos laboratorios que, además de la experiencia suficiente, tengan un número elevado de aislamientos de micobacterias de crecimiento rápido. De no ser así, pueden utilizarse técnicas alternativas para un estudio provisional (E-test, difusión con disco en placa) y enviar las bacterias a un centro de referencia para confirmar los resultados.

Aunque existen placas de microdilución comerciales, la mayoría contienen antimicrobianos y concentraciones de los mismos que no se adecuan a las recomendaciones realizadas para estas bacterias y, por tanto, deberán prepararse en el laboratorio.

Para una correcta valoración de los resultados es preciso llegar a una identificación de especie a la que no todos los laboratorios pueden acceder.

La claritromicina y el sulfametoxazol pueden presentar puntos de corte de difícil lectura. La recomendación actual es interpretar únicamente los pocillos con una clara inhibición del crecimiento en el caso de la claritromicina. Sin embargo, para el sulfametoxazol, como se mencionó en el apartado 8, el punto de corte se establece con el 80% de inhibición del crecimiento.

Cuando se observen patrones de resistencia inhabituales (cepas de *M. abscessus* resistentes a la amikacina o *M. fortuitum* resistentes al imipenem, por ejemplo) deberían ser estudiados de nuevo y, eventualmente, enviados a centros de referencia especializados en este tipo de estudios.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:545-582.
2. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, Wallace RJ Jr. In: Weissfeld AS, coordinating ed. *Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes*; Approved Standard-2nd ed. CLSI document M24-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
4. Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing and mechanisms of action and resistance. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, pp. 155-226. Philadelphia, PA.
5. Master RN. *Mycobacteriology*. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995, pp. 3.0.1-3.16.4.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-03	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

### 13. ANEXO

**Tabla 1. Propuesta de control de calidad de las CIMs en las cepas de referencia para las pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido.**

Antimicrobiano	<i>M. peregrinum</i> (mg/L)	<i>S. aureus</i> (mg/L)
Amikacina	≤ 1 - 4	1 - 4
Cefoxitina	16 - 32	1 - 4
Ciprofloxacino	≤ 0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Claritromicina	≤ 0,06 - 0,5	0,12 - 0,5
Doxiciclina	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Imipenem	2 - 16	ND <sup>a</sup>
Cotrimoxazol	≤ 1 - 4	32 - 128
Tobramicina	4 - 8	0,12 - 1

a ND: No disponible.

**Tabla 2. Criterios de interpretación de las pruebas de sensibilidad de las micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo.**

Antimicrobiano	CIM (mg/L)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Amikacina <sup>1</sup>	≤ 16	32	≥ 64
Cefoxitina	≤ 16	32-64	≥ 128
Ciprofloxacino/Levofloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Moxifloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Doxiciclina/Minociclina	≤ 1	2-8	≥ 16
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Cotrimoxazol <sup>2</sup>	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Tobramicina <sup>3</sup>	≤ 4	8	≥ 16
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32

<sup>1</sup> Si el aislado es una cepa de *M. abscessus* y la CIM es ≥ 64 mg/L, deberá repetirse para confirmar.  
<sup>2</sup> CIM definida por una inhibición del 80% de crecimiento del control.  
<sup>3</sup> Sólo informar en *M. chelonae*.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a distintos antimicrobianos en las micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento (MCL), mediante la técnica de microdilución en caldo.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica de referencia que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y las técnicas de sensibilidad *in vitro* de los mismos.

## 2. FUNDAMENTO

Aunque existen múltiples técnicas que pueden ser utilizadas, la microdilución en caldo ha sido aprobada por el CLSI y es, en la actualidad, un método de referencia. En esta prueba de sensibilidad se determina la CIM (concentración inhibitoria mínima) de distintos antimicrobianos y, se basa en el método de microdilución en caldo estándar, recomendado para las bacterias aerobias convencionales.

El caldo base es Mueller-Hinton, al que se le añaden los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de estos microorganismos. Por ello, debe contener cationes como  $\text{Ca}^{2+}$  (20-25 mg/L) y  $\text{Mg}^{2+}$  (10-12,5 mg/L), así como un pH de 7,2-7,4. El procedimiento debería realizarse en los aislamientos clínicos de *Mycobacterium kansasii*, complejo *M. avium*, *M. marinum*, y cualquier micobacteria no tuberculosa de crecimiento lento con significación clínica y que sus condiciones de crecimiento lo permitan.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Alcaide F (Coordinador). Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. Procedimientos en microbiología clínica 9a. SEIMC 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania USA, 2011.
3. Pérez Sáenz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>
4. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>

## 4. MUESTRAS

Cualquier cultivo micobacteriano en medio sólido (Löwenstein-Jensen, 7H10 o 7H11 de Middlebrook) con un crecimiento puro y joven (10-28 días, dependiendo de la especie) de MCL.

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Caldo de Mueller-Hinton ajustado de cationes y suplementado con OADC.
- Medio líquido de TSB (alternativo).
- Solución salina (0,85% de NaCl) estéril (alternativo).
- Agua estéril.
- Sustancia valorada de los siguientes antimicrobianos: amikacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, sulfametoxazol y tobramicina.
- Placas de agar con sangre de carnero al 5%.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

## 6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3.
- Incubador de  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Placas de microtitulación o microtiter de 96 pocillos con fondo redondeado en "U".
- Agitador rotatorio Vórtex.
- Nefelómetro.
- Tubos de con bolitas de cristal estériles.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Tubos de plástico de 50 ml tipo Falcon.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escobillones o torundas estériles.
- Micropipetas de volumen variable uni y multicanal.
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.

## 7. PROCESAMIENTO

### 7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

#### 7.1.1. Preparación de las soluciones de antibióticos

- A partir de la sustancia valorada de cada antimicrobiano, se preparará una *solución stock o madre* con los solventes y diluyentes recomendados por los fabricantes a una concentración elevada (1.000-10.000 mg/L) para una adecuada conservación. Se realizarán alícuotas en viales de polipropileno o polietileno. De esta manera, la *solución madre* podrá permanecer estable a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante al menos 6-12 meses.
- A partir de la *solución stock o madre* se realizarán diluciones con el medio de cultivo a utilizar en la prueba de sensibilidad para obtener las *concentraciones de trabajo* deseadas. Los antimicrobianos pueden variar según la especie a estudiar. En general en las MCL se deberían estudiar: amikacina (1 a 64 mg/L), ciprofloxacino (0,12 a 16 mg/L), claritromicina (0,06 a 64 mg/L), cotrimoxazol (0,12/2,38 a 8/152 mg/L); doxiciclina (0,15 a 16 mg/L), etambutol (0,5 a 16 mg/ml); estreptomycin (0,5 a 64 mg/L), isoniacida (0,25 a 8 mg/L; cierta utilidad en *M. kansasii*); linezolid (1 a 64 mg/L), moxifloxacino (0,12 a 8 mg/L), rifampicina (0,12 a 8 mg/L) y rifabutina (0,25 a 8 mg/L).
- Una vez que se preparan las *concentraciones de trabajo*, se deberán utilizar en las primeras 24 horas y se mantendrá el antibiótico en el frigorífico ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ) si no se van a usar inmediatamente.

#### 7.1.2. Preparación de las placas de microdilución

- En cada placa de microtitulación hay 96 pocillos (12x8) y, por tanto, para cada aislamiento micobacteriano se pueden estudiar hasta 12 diluciones de cada uno los 8 antimicrobianos mencionados. No obstante, no suelen hacer falta tantas diluciones y algunos de los pocillos pueden reservarse para el control positivo de crecimiento (sin antibiótico) y negativo de esterilidad (sin inóculo).
- Añadir con una pipeta multicanal 100  $\mu\text{l}$  de caldo de Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con un 5% de OADC en cada pocillo, salvo la primera columna de pocillos correspondiente a la concentración más elevada de cada antimicrobiano.
- Dispensar en cada pocillo vacío 200  $\mu\text{l}$  de la dilución más elevada de cada antimicrobiano. A partir de éste se realizarán diluciones a la mitad, traspasando 100  $\mu\text{l}$  al siguiente pocillo en la fila perteneciente al mismo antimicrobiano.
- En el pocillo de control de crecimiento y en el de control de esterilidad no se añadirá antibiótico alguno.
- Es recomendable utilizar (inocular) las placas lo antes posible.
- **NOTA:** en caso de utilizar placas de microdilución comerciales con los antimicrobianos liofilizados, se deberán seguir las recomendaciones del fabricante.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-04	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

### 7.1.3. Preparación del inóculo

- Sembrar el aislamiento micobacteriano en un medio sólido (agar 7H10 o 7H11 de Middlebrook o bien Löwenstein-Jensen) e incubar a 35-37°C con un 5-10% de CO<sub>2</sub> hasta observar un buen crecimiento puro.
- A partir del crecimiento en el medio sólido y con un escobillón, se preparará una suspensión en agua destilada o suero fisiológico de una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland usando un nefelómetro (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml).
- Agitar la suspensión con vórtex durante 15-20 s. Si no se logra una suspensión homogénea y persisten las partículas o pequeños grumos, se deberá mezclar bien utilizando microesferas o bolitas de vidrio. Si persisten los grumos, esperar a que desciendan al fondo del tubo y transferir 0,5 ml del sobrenadante a un tubo con 4,5 ml de agua destilada (dilución 1:10 = 1,5 x 10<sup>7</sup> UFC/ml).
- Agitar la dilución con vortex durante 15-20 s y añadir 4 ml de la misma a 36 ml de agua destilada (dilución 1:10 = 1,5 x 10<sup>6</sup> UFC/ml).

### 7.1.4. Inoculación e incubación

- Inocular la placa de microdilución mediante una pipeta multicanal. Se transferirán 10 µl (0,01 ml) de la dilución bacteriana final en cada pocillo, que contiene 100 µl (0,1 ml) del caldo de cultivo con la concentración del antimicrobiano correspondiente. Por tanto, se añade una nueva dilución 1:10, consiguiendo una concentración bacteriana de 1,5 x 10<sup>5</sup> UFC/ml o 1,5 x 10<sup>4</sup> UFC por pocillo.
- El pocillo de control negativo o esterilidad no se inoculará.
- Las placas se deberán sellar mediante un plástico adhesivo e incubar a 35-37°C en atmósfera aerobia normal 7-14 días.

### 7.1.5. Control de calidad

- Para descartar una posible contaminación bacteriana o fúngica, a parte del pocillo de control; es recomendable transferir del inóculo bacteriano 0,1 ml a una placa de agar sangre e incubar a 35-37°C durante 72 h. Es aconsejable utilizar una cepa de control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar. La cepa de referencia recomendada, que dependerá del antimicrobiano y el microorganismo a estudiar, es *M. avium* ATCC 700898 (y muy especialmente para los macrólidos). Alternativamente se puede utilizar *M. marinum* ATCC 927, *M. kansasii* ATCC 12478, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y/o *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La incubación de estas cepas deberá ser a 35-37°C sin CO<sub>2</sub> y con una duración de 7 días para las micobacterias, y de 18-24 horas para las bacterias convencionales.

## 8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Comprobar diariamente que no existe una contaminación bacteriana o fúngica.
- Los resultados se deberán leer e interpretar a los 7 días de incubación si el crecimiento en el pocillo del control positivo es bueno. Si no es así, se deberá reincubar hasta un máximo de 14 días.
- No se debe prolongar la incubación más allá de 14 días, por la posible alteración (inestabilidad) de los agentes antimicrobianos. En cualquier caso, los resultados tras 14 días de incubación suelen ser poco fiables.
- En el caso de incubación prolongada pueden ser necesarias medidas de prevención contra la pérdida del contenido del pocillo debido a la evaporación.
- La CIM se define como la concentración más baja de un antimicrobiano en la que no hay un crecimiento bacteriano visible. El crecimiento aparece como una turbidez o como un depósito de células en el fondo del pocillo.
- Inicialmente se deberán leer los pocillos de control positivo y negativo. Posteriormente se irán leyendo los pocillos pertenecientes a cada antimicrobiano.
- En el caso de las sulfamidas, la CIM sería la correspondiente al pocillo donde se observa una inhibición del crecimiento del 80% (aproximadamente) en comparación con el pocillo de control.
- Los criterios de interpretación (puntos de corte) para el complejo *M. avium*, *M. kansasii* y *M. marinum* aparecen en la **tabla 1** (ver anexo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-04	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento debería llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Aunque se trate de micobacterias, en el caso de las especies no tuberculosas de crecimiento lento no son necesarias las medidas de protección de nivel 3, dado que se trata de organismos de nivel 2. No obstante sería muy aconsejable la preparación de las placas y la inoculación de las mismas se realizase en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger la muestra, para evitar en lo posible las contaminaciones fúngicas o bacterianas.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El método de microdilución en caldo queda casi limitado a aquellos laboratorios que, además de la experiencia suficiente, tengan un número elevado de aislamientos de micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento. De no ser así se pueden enviar las bacterias a un centro de referencia para la realización de la pruebas.

En el caso de no utilizar placas de microdilución comerciales, se deberán preparar en el laboratorio todos los antimicrobianos y sus diversas concentraciones, lo que requiere rigurosos y adecuados controles de calidad.

Para una correcta valoración de los resultados es preciso llegar a una identificación de especie a la que no todos los laboratorios pueden acceder.

La claritromicina y las sulfamidas pueden presentar puntos de corte de difícil lectura. La recomendación actual es interpretar únicamente los pocillos con una clara inhibición del crecimiento en el caso de la claritromicina. Sin embargo, para las sulfamidas, como se mencionó en el apartado 8, el punto de corte se establece con el 80% de inhibición del crecimiento.

Cuando se observen patrones de resistencia poco habituales se deberán estudiar de nuevo y, eventualmente, enviarlos a centros de referencia especializados en este tipo de estudios.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:545-582.
2. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, Wallace RJ Jr. In: Weissfeld AS, coordinating ed. *Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard-2nd ed.* CLSI document M24-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
4. Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing and mechanisms of action and resistance. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, pp. 155-226.
5. Master RN. *Mycobacteriology*. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995, pp. 3.0.1-3.16.4.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento mediante microdilución en caldo	PNT-SBK-04	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

6. Woods GL, Lin SYG, Desmond EP. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, Nocardia, and other Actinomycetes. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry M L, Warnock DW, editors Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. Washington DC: ASM Press; 2011, vol.I, pp. 1215-1238.

### 13. ANEXO

**Tabla 1. Criterios de interpretación de las pruebas de sensibilidad del complejo *M. avium*, *M. kansasii* y *M. marinum* mediante microdilución en caldo (CIM: concentraciones inhibitorias mínimas en mg/L).**

Antimicrobiano	<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>
	S <sup>1</sup>	R <sup>1</sup>	R <sup>1</sup>	R1
<b>Amikacina<sup>2</sup></b>	≤ 32	≥ 64	> 32	> 32
<b>Cipro/Levofloxacino<sup>3</sup></b>		> 2	> 2	> 2
<b>Claritromicina</b>	≤ 8	≥ 32	>16	> 16
<b>Cotrimoxazol</b>			> 2/38	> 2/38
<b>Doxiciclina</b>				> 4
<b>Etambutol<sup>4</sup></b>		> 4	> 4	> 4
<b>Isoniacida<sup>5</sup></b>			> 1	
<b>Linezolid</b>	≤ 8	≥ 32	>16	
<b>Moxifloxacino</b>	≤ 1	≥ 4	> 2	> 2
<b>Rifabutina</b>			> 2	> 2
<b>Rifampicina</b>			> 1	> 1

<sup>1</sup> S: sensible; R: resistente.

<sup>2</sup> La CIM para la amikacina en el complejo *M. avium* no está definida. Por asimilación a otras especies podría considerarse resistente > 32 mg/L.

<sup>3</sup> La CIM para el ciproflaxacino/levofloxacino en el complejo *M. avium* no está definida. Por asimilación a otras especies micobacterianas podría considerarse resistente > 2 mg/L.

<sup>4</sup> La CIM para el etambutol en el complejo *M. avium* no está definida. Por asimilación a otras especies podría considerarse resistente > 4 mg/L.

<sup>5</sup> La CIM para la isoniacida en *M. kansasii* no está definida. Aunque la CIM generalmente es superior respecto al complejo *M. tuberculosis*, CIM > 1 mg/L se deben considerar resistentes.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 12

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe el método a seguir para detectar mutaciones relacionadas con la resistencia a fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en *Mycobacterium tuberculosis* complex, a partir de muestras clínicas o de aislamientos clínicos de cultivo.

## 2. FUNDAMENTO

El tratamiento eficaz de la tuberculosis se basa en la utilización de una combinación de 4 fármacos durante un periodo de 6 meses. Más del 85% de los pacientes con aislamientos del complejo *M. tuberculosis* sensibles a estos fármacos se curan durante este periodo. Sin embargo, cuando aparece resistencia, sobre todo la multiresistencia (resistencia combinada, al menos, a la isoniacida y a la rifampicina), el tratamiento adquiere gran complejidad y puede suponer una duración de 12, 18 o 24 meses y la exposición a fármacos con una toxicidad superior a los del esquema estándar. En estos casos la instauración de un tratamiento adecuado precoz es fundamental para conseguir la curación del paciente y disminuir el riesgo epidemiológico de transmisión.

Debido a que el principal mecanismo de resistencia en *M. tuberculosis* complex a los fármacos, es el desarrollo de mutaciones cromosómicas irreversibles, la detección de éstas mediante métodos moleculares permite predecir la resistencia con una sensibilidad cercana al 60-70% en muestras clínicas y alrededor del 85% en cultivos positivos. La determinación de sensibilidad in vitro a los antimicrobianos, es el método de referencia para conocer la eficacia de todos los fármacos. Sin embargo requiere un mínimo de 3-4 semanas para tener resultados definitivos. Los métodos moleculares de detección de mutaciones obtienen resultados con mucha mayor rapidez, en 2-4 días, permitiendo instaurar el tratamiento adecuado de forma precoz. Estudios de campo recientes han demostrado que su utilización aumenta el porcentaje de diagnósticos de tuberculosis multiresistente, así como la negativización de la microscopía positiva en un periodo de tiempo menor.

Existen numerosos métodos comercializados, la mayoría basados en PCR e hibridación reversa con sondas en línea (LPA). También existen kits basados en microarrays o en PCR a tiempo real (RT-PCR). Este documento se apoya fundamentalmente en el kit Xpert® MTB/RIF, un método que se desarrolla en un equipo integral basado en RT-PCR y en tres kits de PCR-LPA.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Alcaide F (Coordinador). Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. Procedimientos en microbiología clínica 9a. SEIMC 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
2. Pérez Sáenz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10a.pdf>
3. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
4. Manual de instrucciones del kit Xpert® MTB/RIF (Cepheid).
5. Manual de instrucciones del kit GenoType® MTBDRplus v 2.0 (Hain Lifescience).
6. Manual de instrucciones del kit GenoType® MTBDRsl v 1.0 (Hain Lifescience).
7. Manual de instrucciones del kit AID TB Resistance® Assays (Autoimmun Diagnostika). Module Isoniazid/Rifampicin; Module Streptomycin/ Kanamycin/ Amikacin/ Capreomycin; Module Fluoroquinolones/ Ethambutol.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 12

## 4. MUESTRAS

### 4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Los diferentes métodos recomiendan procesar el descontaminado preparado para el cultivo a partir de muestras clínicas. Están validados únicamente para muestras de origen respiratorio, incluido el aspirado gástrico y aunque estrictamente no es de este origen, también para el líquido pleural. En la práctica se utilizan de igual forma las muestras extra-respiratorias. Las heces a menudo no se usan ya que hasta un tercio de los casos pueden dar resultados inválidos.

El kit Xpert® permite también utilizar muestra directa sin descontaminar, para ser utilizado en condiciones de campo en áreas periféricas. Este también está sólo validado para muestras respiratorias, aunque es común incluir las de origen extra-respiratorio.

El volumen de muestra debe ser el requerido por cada kit, en general entre 500 y 1.500 µl. Así mismo, puede partirse de cultivos positivos, tanto líquidos como sólidos. En ambos casos las instrucciones de los fabricantes proporcionan los detalles de preparación. Por otro lado también pueden usarse muestras que han sido congeladas.

Las muestras incluidas en parafina conservan la estructura del ADN, pero no la viabilidad de los microorganismos. Pueden utilizarse, cuidando mucho el proceso de desparafinización, ya que los restos de parafina pueden actuar como inhibidor de la amplificación. En general el rendimiento es algo menor que el de las muestras frescas o congeladas, pero en ausencia de estas es una alternativa a tener en cuenta. También es aconsejable procesar varias alícuotas por separado.

### 4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras descontaminadas para el cultivo pueden mantenerse durante unos días refrigeradas a 4°C, (máximo de una semana). Después pueden congelarse directamente.

Las muestras congeladas se descongelaran lentamente a temperatura ambiente antes de ser procesadas.

### 4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se rechazarán las muestras conservadas de forma inadecuada y las que presenten un volumen inferior al mínimo necesario.

Sin embargo, en las muestras en las que el grado de sospecha sea muy elevado y difícilmente repetibles, podría aceptarse su mala conservación, ya que los kits propuestos disponen de controles internos que garantizan la realización correcta de la prueba. En cuanto al volumen insuficiente, en los mismos casos puede completarse al mínimo con agua destilada, aunque el rendimiento será menor. Ambas eventualidades deben hacerse constar en el informe de resultados y tenerse en cuenta en la interpretación de los mismos.

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los propios de cada kit. En las siguientes **tablas** se exponen las áreas amplificadas y mutaciones detectadas por cada uno de los tests comerciales propuestos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 12

**Tabla 1. Áreas amplificadas y mutaciones del Test GenoType® MTBDRplus (v2.0)**

Codones	Sonda natural	Mutaciones descritas <sup>1</sup>	MDT <sup>2</sup>
<i>rpoB</i> 505-509	WT1	F505L, T508A, S509T	
<i>rpoB</i> 510-513	WT2	E510H, L511P	
<i>rpoB</i> 510-517	WT2/WT3	Q513L, Q513P, del 514-516	
<i>rpoB</i> 513-519	WT3/WT4	D516V D516Y, Del 515	(D516V) MUT1
<i>rpoB</i> 516-522	WT4/WT5	Del 518, N518I	
<i>rpoB</i> 518-525	WT5/WT6	S522L, S522Q	
<i>rpoB</i> 526-529	WT7	H526Y H526D H526r, H526R, H526P, H526Q, H526N, H526L, H526C	(H526Y) MUT2A (H526D) MUT2B
<i>rpoB</i> 530-533	WT8	S531L S531Q, S531W, L533P	(S531L) MUT3
<i>katG</i> 315	WT <i>katG</i>	S315T	(S315T1) MUT1 (S315T2) MUT2
<i>inhA</i> -15, -16	WT1	C-15T A-16G	(C-15T) MUT1 (A-16G) MUT2
<i>inhA</i> -8	WT2	T-8C T-8A	(T-8C) MUT3A (T-8A) MUT3B

<sup>1</sup> Incluye las mutaciones del área genética descrita según el fabricante.

<sup>2</sup> MDT (Mutación detectada por el test): mutación de la que el test o prueba dispone de una sonda mutada.

**Tabla 2. Áreas amplificadas y mutaciones del Test AID TB Resistance® Assay. Module Isoniazide/Rifampicin**

Codones de la sonda natural	Mutaciones detectadas en el test
<i>rpoB</i> 513-516	D516V, D516Y
<i>rpoB</i> 522-526	H526, H526D, H526R
<i>rpoB</i> 529-533	S531L, S531W
<i>katG</i> 315	S315T
<i>inhA</i> -16	-16G
<i>inhA</i> -15	-15T
<i>inhA</i> -8	-8A, -8C

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 5 de 12

**Tabla 3. Áreas amplificadas del Test Xpert® MTB/RIF**

Codones	Sonda natural	Mutaciones incluidas en el test
507-512	WT1 (A)	únicamente incluye sondas naturales
511-517	WT2 (B)	únicamente incluye sondas naturales
517-522	WT3 (C)	únicamente incluye sondas naturales
522-527	WT4 (D)	únicamente incluye sondas naturales
527-533	WT5 (E)	únicamente incluye sondas naturales

**Tabla 4. Áreas amplificadas y mutaciones del Test GenoType® MTBDRs/ (v1.0)**  
(Detección de mutaciones de resistencia a las fluoroquinolonas y el etambutol)

Codones	Sonda natural	Mutaciones descritas <sup>1</sup>	MDT <sup>2</sup>
<i>gyrA</i> 85-90	WT1	C88S, A88T	
<i>gyrA</i> 89-93	WT2	A90V S91P	MUT1 MUT2
<i>gyrA</i> 92-97	WT3	D94A D94N D94Y D94G D94H	MUT3A MUT3B  MUT3C MUT3D
<i>embB</i> 306	WT	M306 I M306V	MUT1A MUT1B

<sup>1</sup> Incluye las mutaciones del área genética descrita según el fabricante.

<sup>2</sup> MDT (Mutación detectada por el test): mutación de la que el test o prueba dispone de una sonda mutada

**Tabla 5. Áreas amplificadas y mutaciones del Test GenoType® MTBDRs/ (v1.0)**  
(Detección de mutaciones de resistencia a los aminoglucósidos e inyectables)

Codones	Sonda natural	Mutaciones descritas <sup>1</sup>	MDT <sup>2</sup>	Resistencia fenotípica <sup>3</sup>
<i>rrs</i> 1401 <i>rrs</i> 1042	WT1	A1401G C1402T	A1401G (MUT1)	CAP, AMK, KAN CAP, VIO, KAN
<i>rrs</i> 1484	WT2	G1484T	G1484T (MUT 2)	CAP, VIO, AMK, KAN

<sup>1</sup> Incluye las mutaciones del área genética descrita según el fabricante.

<sup>2</sup> MDT (Mutación detectada por el test) : mutación de la que el test o prueba dispone de una sonda mutada.

<sup>3</sup> CAP: capreomicina ; AMK: amikacina ; KAN: kanamicina ; VIO: viomicina.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 6 de 12

**Tabla 6. Áreas amplificadas y mutaciones del Test GenoType® MTBDRsI (v2.0)**  
(Detección de mutaciones frente a fluoroquinolonas)

Codones	Sonda natural	Mutaciones descritas <sup>1</sup>	MDT <sup>2</sup>
<i>gyrA</i> 85-90	WT1	G88A, G88C	
<i>gyrA</i> 89-93	WT2	A90V S91P	MUT1 MUT2
<i>gyrA</i> 92-97	WT3	D94A	MUT3A
		D94N	MUT3B
		D94Y	MUT3C
		D94G	MUT3D
		D94H	
<i>gyrB</i> 536-541	WT	M306 I M306V	MUT1 MUT2

<sup>1</sup> Incluye las mutaciones del área genética descrita según el fabricante.

<sup>2</sup> MDT (Mutación detectada por el test): mutación de la que el test o prueba dispone de una sonda mutada.

**Tabla 7. Áreas amplificadas y mutaciones del Test GenoType® MTBDRsI (v2.0)**  
(Detección de mutaciones frente a aminoglucósidos e inyectables)

Codones	Sonda natural	Mutaciones descritas <sup>1</sup>	MDT <sup>2</sup>	Resistencia fenotípica <sup>3</sup>
<i>rrs</i> 1401 <i>rrs</i> 1042	WT1	A1401G C1402T	A1401G (MUT1)	CAP, AMK, KAN CAP, VIO, KAN
<i>rrs</i> 1484	WT2	G1484T	G1484T (MUT2)	CAP, VIO, AMK, KAN
<i>eis</i>	WT1	G-37T		De bajo nivel a KAN
<i>eis</i>	WT2	C-14T	C-14T (MUT1)	
		C-12T G-10A		
<i>eis</i>	WT3	C-2A		

<sup>1</sup> Incluye las mutaciones del área genética descrita según el fabricante.

<sup>2</sup> MDT (Mutación detectada por el test) : mutación de la que el test o prueba dispone de una sonda mutada.

<sup>3</sup> CAP: capreomicina ; AMK: amikacina ; KAN: kanamicina ; VIO: viomicina.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 7 de 12

**Tabla 8. Áreas amplificadas y mutaciones del Test AID TEB Resistance Assay. Modules Streptomycin/Amikacin/Capreomycin y Fluorquinolonas/Ethambutol**

Codones sonda natural <sup>1</sup>	MDT <sup>2</sup>
Estreptomicina <i>rpsL</i> 43	K43R
Estreptomicina <i>rpsL</i> 88	K888R, K88Q
Estreptomicina <i>rrs</i> 513-517	C513T, A514C, G515C, C517T
KAN/AMK <i>rrs</i> 1041/1402	A1401G, C1402T
KAN/AMK/CAP <i>rrs</i> 1484	G1484C/T
FQ <i>gyrA</i> 90,91,94	A90V, S91P, D94A, D94N, D94Y, D94G
EB <i>embB</i> 306	M306V, M306I, G918A, G918C, G918T

<sup>1</sup> KAN : kanamicina ; AMK : amikacina ; CAP: capreomicina; FQ : fluoroquinolonas ; EB : etambutol.  
<sup>2</sup> MDT (Mutación detectada por el test) : mutación de la que el test o prueba dispone de una sonda mutada.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica IIA o superior.
- Equipos propios de los tests disponibles.
- Bata impermeable y guantes de protección.
- Mascarillas FFP2.
- Micropipetas de volumen variable.
- Puntas de micropipeta.
- Tubos de plástico de 50 ml tipo Falcon.
- Gradillas para tubos y viales.
- Pipetas Pasteur desechables (1 y 3 ml).
- Agitador tipo vórtex.
- Contenedor de residuos.
- Soluciones desinfectantes.

### 6.1. PROTOCOLOS DE MANTENIMIENTO

Los protocolos de mantenimiento de todos los equipos deben estar detallados en sus instrucciones de trabajo. El mantenimiento y calibración de los equipos correspondientes a los tests comerciales corresponden al proveedor, aunque el laboratorio debe velar por su cumplimiento en los plazos correspondientes.

## 7. PROCEDIMIENTO

La realización de las diversas técnicas de detección de mutaciones de resistencia a los fármacos antituberculosos en *M. tuberculosis* complex, debe hacerse de acuerdo a los protocolos del fabricante de cada test.

### 7.1. INDICACIONES DE LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS

La realización de estas pruebas está indicada en las situaciones y/o pacientes en los que deba descartarse resistencia a uno o más de los fármacos. Es variable de acuerdo a condiciones geográficas y epidemiológicas. Así mismo, está relacionada con factores de riesgo de los pacientes. Por este motivo, las indicaciones no son siempre universales. En nuestro entorno pueden resumirse en las siguientes: 1) pacientes con sospecha de fracaso clínico;

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 8 de 12

2) antecedentes de tuberculosis previa, sobre todo en los años recientes; 3) recidiva después de finalizar el tratamiento; 4) el desarrollo de una tuberculosis después de haber sido un contacto de un paciente con resistencia; 5) pacientes originarios de países con elevada incidencia de tuberculosis resistente, sobre todo si desarrollan la enfermedad durante los cinco primeros años de su llegada. Según el país de origen esta medida puede ser más o menos estricta; 6) una indicación complementaria podría ser confirmar resistencias de las pruebas de sensibilidad fenotípicas en situaciones de duda.

## 7.2. ELECCIÓN DE LA PRUEBA Y PROTOCOLO DE APLICACIÓN

- En nuestro entorno las resistencias más frecuentes aparecen frente a la isoniacida. La opción más adecuada sería utilizar un método capaz de detectar las mutaciones de resistencia a este fármaco, como son las técnicas de LPA.
- Numerosos laboratorios utilizan el sistema Xpert® como base del diagnóstico de la tuberculosis por ser un método sencillo y fiable. Es muy eficaz para detectar mutaciones de resistencia a la rifampicina, por lo que es un excelente marcador de multiresistencia (MDR-TB). Sin embargo, la MDR-TB en nuestro entorno es inferior al 2% y la monoresistencia a la rifampicina es aún más rara, por lo que en caso de sospecha es aconsejable utilizar un método de LPA. En el caso de que el sistema Xpert® detecte resistencia a la rifampicina, es muy probable que también lo sea a la isoniacida. La técnica de LPA podrá ponerla de manifiesto.
- Si se detecta resistencia a la isoniacida y/o a rifampicina está indicado realizar un LPA para comprobar si existen mutaciones frente a los fármacos de segunda línea, como son las fluoroquinolonas, aminoglucósidos (amikacina y kanamicina) y la capreomicina.
- Si se detectan mutaciones relacionadas con la resistencia a la isoniacida y rifampicina, también está indicado realizar uno de las pruebas moleculares capaces de detectar las mutaciones relacionadas con la resistencia al etambutol, ya que es más probable que la cepa sea resistente a este fármaco que a la kanamicina.
- Si no se detectan mutaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos de primera línea (isoniacida y/o rifampicina), no está indicada la realización de las pruebas moleculares para los fármacos de segunda línea, a no ser que se hayan utilizado estos con anterioridad.
- Los test de LPA pueden realizarse directamente sobre muestras clínicas con baciloscopia positiva. Las versiones recientes permiten también su uso sobre muestras con baciloscopia negativa, aunque la sensibilidad es menor. La sensibilidad óptima se consigue cuando se aplica el test en cultivos positivos.
- En el caso de que las pruebas moleculares se realicen directamente sobre las muestras clínicas, y los resultados sea dudosos o no interpretables, deberían repetirse cuando el cultivo sea positivo.
- En todos los casos, se detecten o no mutaciones de resistencia, debe realizarse siempre una determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos.
- Si no se detectaran mutaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos de primera línea, la prueba de sensibilidad fenotípica indicada sería a los antituberculosos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida).
- Sin embargo, si se detectan mutaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos de primera o de segunda línea, estaría indicado realizar la prueba de sensibilidad *in vitro* a los dos grupos de antimicrobianos.
- En algunas situaciones en que la prueba de sensibilidad fenotípica plantea dudas de interpretación, las técnicas de detección molecular pueden ser muy útiles.
- En casos de discrepancia en los resultados puede recurrirse a la secuenciación de los fragmentos genéticos que contienen las mutaciones en cuestión.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 9 de 12

## 8. OBTENCIÓN, EXPRESIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben valorarse de acuerdo a las instrucciones del fabricante de las pruebas.

### 8.1. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1.1. Para el sistema Xpert® los resultados posibles son:

- **Se detecta *M. tuberculosis* complex:** puede suceder con detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la rifampicina, no detectadas o detección indeterminada (probablemente debido a que la concentración de ADN es muy baja).
- **No se detecta *M. tuberculosis* complex:** para considerar válido el resultado, el control interno debe ser positivo.
- **No válido:** no se detecta ADN de *M. tuberculosis* complex y el control interno es negativo. No obstante, la comprobación del funcionamiento de las sondas es correcta. La causa puede ser la presencia de inhibidores en la muestra o un fallo del cartucho.
- **Error:** No se detecta ADN de *M. tuberculosis*, el control interno es negativo y la comprobación de funcionamiento de las sondas no es correcta. La causa puede ser un fallo del sistema y del cartucho.
- Ante resultados no válidos y errores es aconsejable repetir la prueba.

8.1.2. Para las pruebas LPA los resultados posibles son:

- Existen tres sondas control (del conjugado, de amplificación y del complejo *M. tuberculosis*) de la prueba y una sonda control de cada *locus* amplificado.
- La sonda del conjugado debe aparecer siempre. En caso contrario no se puede interpretar el resultado.
- La sonda de amplificación debe aparecer siempre. No obstante por competición en la amplificación puede no aparecer en presencia de bandas en todos los *loci*. En este caso la prueba es válida.
- La sonda del complejo *M. tuberculosis* debe aparecer siempre. Si no lo hace y se detectan mutaciones de resistencia, es conveniente repetir la prueba, ya que puede tratarse de una cepa resistente mixta con otra especie del genero *Mycobacterium*.
- Las sondas de cada *locus* indican si la amplificación ha sido suficiente para cada uno de ellos. Todas las sondas deben tener igual o mayor intensidad que la sonda control de amplificación.
- Cuando existe resistencia, la sonda natural correspondiente no hibridará. Si el kit contiene una sonda para la mutación en concreto, ésta hibridará. Si no contiene sonda para la mutación, la sonda no hibridará ni tampoco la natural o salvaje (no mutada) correspondiente.

### 8.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

8.2.1. Sistema Xpert®:

- El test no detecta mutaciones directamente, ya que las cinco sondas que contiene cubren la secuencia natural o salvaje. Si existe una mutación en la zona de cobertura de una sonda, ésta no hibridará. Si la mutación está en un extremo de la sonda, puede suceder que no hibride ésta ni la siguiente, ya que todas tienen un cierto grado de solapamiento. No obstante, las mutaciones más frecuentes coinciden con zonas centrales de las sondas.
- La no hibridación de alguna de las cinco sondas implica una posible resistencia fenotípica a la rifampicina en más del 98% de casos.

8.2.2. Sistemas de LPA:

- **Si existe hibridación con las sondas naturales y no con las mutadas,** indicaría que no se detectan mutaciones de resistencia. Para todos los fármacos implica que el fenotipo será sensible en la mayoría de los casos, aunque con una proporción variable según de cual se trate. Para la rifampicina, la sensibilidad será superior al 95%, mientras que para el etambutol y estreptomycinina puede estar alrededor del 55-60%.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 10 de 12

- **Si no existe hibridación con las sondas naturales y si con las mutadas**, indicaría una detección de mutaciones de resistencia. Esto implica una resistencia fenotípica en la mayoría de las ocasiones. La especificidad es muy alta.
- **En el caso de que no hibridara con las sondas naturales y si lo hiciera con las mutadas**, indicaría una posible mutación en la zona de cobertura de la sonda natural, pero no corresponde a ninguna de las sondas mutadas comprendidas en el kit, sino a otra mutación. Ello implica resistencia fenotípica.
- **Si existiera hibridación con las sondas naturales y también con las mutadas**, es probable que exista una población de bacterias sensibles coexistiendo con una población de bacterias resistentes. Puede indicar la existencia de población heterorresistente (misma cepa con dos poblaciones) o coexistencia de dos cepas distintas. Dependiendo de la proporción de bacterias resistentes, el fenotipo será sensible o resistente.

### 8.3 CORRELACIÓN CON LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD FENOTÍPICAS

La detección de mutaciones de resistencia, aparte de su objetivo principal, detectar las mutaciones en sí, puede ofrecer información rápida sobre el nivel de resistencia y sobre las resistencias cruzadas. Existen también discrepancias, respondiendo a diversas causas.

#### 8.3.1. Discrepancias genotipo resistente / fenotipo sensible

- Pueden ser debidas a la presencia de poblaciones mixtas (más de una cepa) o de población heterorresistente (una misma cepa, dos poblaciones). Si la proporción de la resistente no es suficiente puede no expresarse en el fenotipo. También puede suceder que tenga una *fitness* menor. Esta situación es más probable si se trata de una resistencia de bajo nivel.
- Otra causa pueden ser las mutaciones silentes. Las más estudiadas son las de la rifampicina y que se han relacionado con mutaciones en el codón 514, sobre todo C514T, así como en uno de los extremos, el codón 533. En el sistema Xpert® se encuentran en la zona de las sondas B y E, respectivamente.
- En un estudio reciente, con la última versión (v2.0) de segunda línea del sistema GenoType, se han detectado mutaciones en el gen *eis* en algunas cepas con fenotipo sensible a la kanamicina. Su significado real es aún incierto.

#### 8.3.2. Discrepancias genotipo sensible / fenotipo resistente

- Lo más frecuente es que el mecanismo de resistencia no esté incluido o contemplado en el kit.
- Otra posibilidad es la presencia de poblaciones mixtas con una representatividad variable.
- Con el sistema Xpert® se ha observado que poblaciones resistentes por debajo del 60%, pueden no ser detectadas cuando corresponden a resistencias de alto nivel.

#### 8.3.3. Nivel de resistencia

- Algunas mutaciones se asocian claramente a la resistencia de alto nivel, igual que otras lo hacen con bajo nivel de resistencia. Así mismo, en otros casos no puede establecerse esta relación de forma clara. Este hecho tiene implicaciones importantes en el tratamiento.
- Actualmente se sabe que las mutaciones que suelen estar relacionadas con la resistencia de alto nivel son: codón 315 del gen *katG* para la isoniacida, codón 531 del gen *rpoB* para la rifampicina, la mayoría de las mutaciones en el codón 526 del gen *rpoB* para la rifampicina, las mutaciones en el codón 94 de *gyrA* para las fluoroquinolonas, las mutaciones en el codón 1484 del gen *rrs* para la capreomicina, amikacina, kanamicina y viomicina, así como los codones 43 y 88 del gen *rpsL* para la estreptomina.
- Por otro lado las mutaciones que suelen estar relacionadas con la resistencia de bajo nivel son: promotor del gen *inhA* para la isoniacida, la mutación H526L y codones 516 y 533 del gen *rpoB* para la rifampicina y mutaciones en el gen *eis* para la kanamicina (aunque la experiencia es escasa).

#### 8.3.4. Resistencias cruzadas

- Según las mutaciones detectadas pueden inferirse algunas resistencias cruzadas. Para la isoniacida, las mutaciones en el gen *inhA* suponen resistencia cruzada con la etionamida, ya que comparten parte del mecanismo

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 11 de 12

de acción. Este hecho no sucede con las mutaciones en el gen *katG*, ya que la resistencia se basa en la falta de activación del profármaco.

- Para la rifampicina, las resistencias de alto nivel implican resistencia a las demás rifamicinas. Sin embargo, cuando se deben a mutaciones en el codón 514 o en mutaciones de bajo nivel en codones 516, 533, entre otros, pueden ser sensibles a la rifabutina u otras rifamicinas.
- Las mutaciones en el gen *gyrA*, sobre todo cuando suceden en codones diferentes al 94 pueden tener distinta respuesta a las diversas quinolonas, tomando como tipo el ofloxacino y moxifloxacino, por lo que es aconsejable introducirlas en las determinaciones de sensibilidad fenotípicas cuando se detecten estas mutaciones.
- Aunque la experiencia no es muy amplia, frente a los fármacos inyectables se han observado distintos patrones. Así en el gen *rrs* la mutación A1401G implica resistencia a la capreomicina, amikacina y kanamicina, mientras que la mutación en C1042T supone resistencia a la capreomicina, kanamicina y viomicina. La mutación G1484T provoca resistencia a los 4 fármacos mencionados.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento debería llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

En el caso del complejo *M. tuberculosis* deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por este motivo, se aconseja realizar todos los pasos de manipulación de cultivos, preparación del inóculo e inoculación de los viales en cabinas de seguridad biológica clase IIA o superior, utilizando bata, guantes y mascarillas desechables de uso exclusivo.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación de los métodos de detección de mutaciones de resistencia es que no cubren todos los casos de resistencia fenotípica a los fármacos, ya sea porque no se conocen todas las mutaciones o porque el mecanismo de resistencia implicado es distinto. La rifampicina es el fármaco con mayor correlación, ya que las mutaciones detectadas corresponden a más del 95% de los casos de resistencia fenotípica.

Una limitación adicional es la presencia de poblaciones mixtas o heterorresistentes que pueden causar dificultades en la interpretación.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Dominguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach K, Gagneux S, et al. for the TBNET and RESIST-TB network. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016; 20:24-42.
2. Feng Y, Liu S, Wang Q, Wang L, Tang S, Wang J, Lu W. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using GenoType® MTBDRsl assay: a meta-analysis. *Plos One*. 2013; 8:e55292.
3. Mironova S, Pimkina E, Kontsevaya I, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Skenders G et al. Performance of the GenoType® MTBDR-plus assay in routine settings: a multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012. 31:1381-1387.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de la resistencia a los fármacos antituber- culosos en <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> complex	PNT-SBK-05	
		Edición N° 01	Página 12 de 12

4. Nikam C, Patel R, Sadani M, Ajbani K, Kazi M, Soman R, et al. Redefining MTBDRPlus test results. What do indeterminate results actually mean? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2016 20:154-159.
5. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2014; 1:CD009593.
6. Theron P, Richardson M, Barnard M, Donegan S, Warren R, Steingart KR, et al. The diagnostic accuracy of the GenoType® MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2014; 10; CD010705.