

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**USO DE METALES DE TRANSICIÓN EN ENSAYOS  
COMBINATORIOS METAL-ANTIBIÓTICO CONTRA  
*Mycobacterium tuberculosis***

**POR**

**LILIANA ZULEM MONTELONGO PERALTA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**NOVIEMBRE, 2017**

USO DE METALES DE TRANSICIÓN EN ENSAYOS  
COMBINATORIOS METAL-ANTIBIÓTICO CONTRA  
*Mycobacterium tuberculosis*

Revisión de tesis por:

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez

---

Dr. Edgar Alan Blanco Gámez

---

Dra. Pilar Morales San Claudio

---

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

El presente trabajo de investigación se desarrolló en:

Laboratorio de Biotecnología 3

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Nuevo León

México

Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI)

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

México

## Agradecimientos

A lo largo del periodo que me ha ocupado la realización de este trabajo, muchas han sido las personas que con su ayuda, atención o simplemente su compañía, se han hecho merecedoras de aparecer en este apartado.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi madre, la mujer que ha estado conmigo brindándome su amor incondicional en todo momento. La cual durante todo este tiempo no se ha cansado de animarme y apoyarme. Gracias mamá, porque me has enseñado que no importan las dificultades que se tengan en el camino, siempre se tiene que seguir adelante. Gracias por ser un respetable ejemplo para mí.

A Eiber, ya que me brindó su incondicional apoyo y paciencia a lo largo de esta etapa de mi vida, pero sobre todo, gracias por creer en mi aun cuando ni yo misma creía que lo iba a lograr.

A la Dra. Pilar Morales, así como al Dr. Alan Blanco y Dr. Francisco Villarreal por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

A mi director de tesis el Dr. Rubén Morones por su infinita paciencia, su dedicación y su aporte de conocimientos para el desarrollo de la presente tesis.

A mis compañeros de laboratorio del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) de la Facultad de Medicina. Mimi, Aurora y Luis, les estoy muy agradecida por acogerme en el laboratorio como si fuera uno de ustedes.

Al Dr. Prisco Palma por permitirme trabajar en el CRCEI, facilitarme las instalaciones, y el material adecuado para la realización de este proyecto, además de su valiosas sugerencias y aporte de conocimientos.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología 3 de la Facultad de Ciencias químicas, con los cuales he tenido la suerte de trabajar, no me queda más que desearles toda el éxito en sus proyectos futuros.

A la Facultad de Ciencias Químicas y A la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como a sus autoridades, por todos los bienes proporcionados, así como el apoyo para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de esta maestría en ciencias.

A Dios por permitirme terminar esta etapa, que más que un trabajo escolar, ha sido una meta personal que tú me has permitido alcanzar. Sé también que esto no es el fin, sino el inicio de nuevas metas, segura estoy que tu estarás conmigo.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
TABLA DE CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE SIGLAS Y/O ABREVIATURAS.....	vi
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tuberculosis .....	1
1.1.1 Generalidades e incidencia.....	1
1.1.2 Agente etiológico: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	4
1.1.3 Tratamiento .....	6
1.2 Tuberculosis farmacorresistente .....	8
1.2.1 Generalidades e incidencia .....	8
1.2.2 Tratamiento.....	9
1.3 Mecanismos generadores de resistencia a fármacos de primera línea en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	11
1.3.1 Isoniacida.....	11
1.3.2 Rifampicina.....	12
1.3.3 Etambutol .....	12
1.3.4 Estreptomina.....	13
1.4 Estrategias para afrontar la problemática de fármacos contra tuberculosis .....	13
1.4.1 Investigación en el desarrollo de terapias combinatorias... 14	
1.4.1.1 Metales de transición.....	14

CAPITULO 2. ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	16
2.1 Antecedentes.....	16
2.2 Hipótesis.....	19
2.3 Objetivos.....	19
2.3.1 Especifico.....	19
2.3.2 Generales .....	19
CAPITULO 3. MATERIALES Y METODOS.....	20
3.1 Bioseguridad.....	20
3.2 Selección de aislados.....	21
3.3 Reactivación de <i>M. tuberculosis</i> .....	22
3.4 Pruebas bioquímicas .....	23
3.5 Prueba de sensibilidad a fármacos .....	25
3.6 Concentraciones mínimas inhibitorias.....	26
3.6.1 Concentraciones mínimas inhibitorias a fármacos.....	26
3.6.2 Concentraciones mínimas inhibitorias a sales de metal.....	31
3.7 Pruebas combinatorias .....	32
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
4.1 Selección de aislados y reactivación de <i>M. tuberculosis</i> .....	39
4.2 Pruebas bioquímicas .....	40
4.3 Prueba de sensibilidad a fármacos .....	42
4.4 Concentraciones mínimas inhibitorias.....	44
4.4.1 Concentraciones mínimas inhibitorias a fármacos.....	44
4.4.2 Concentraciones mínimas inhibitorias a sales de metal.....	48
4.5 Pruebas combinatorias .....	52
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	60
CAPITULO 6. BIBLIOGRAFÍA .....	63
APENDICES.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tasas de incidencia de Tuberculosis estimadas por países.....	2
2. Casos de tuberculosis en América.....	3
3. Distribución geográfica de la incidencia de la Tuberculosis.....	4
4. Pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .....	5
5. Casos de tuberculosis multifarmacorresistente en América.....	9
6. Casos de tuberculosis resistente a fármacos en México.....	10
7. Diseño del ensayo de microplaca Azul Alamar (MABA) para la evaluación de fármacos. Colocación del medio de cultivo.....	27
8. Diseño MABA para la evaluación de fármacos. Colocación de los fármacos.....	28
9. Diseño MABA para la evaluación de fármacos. Colocación del inóculo.	29
10. Diseño MABA para la evaluación de fármacos. Colocación de azul alamar .....	30
11. Diseño MABA para la evaluación de metales. Colocación de metales..	32
12. Diseño MABA para la evaluación de combinaciones. Colocación del medio de cultivo.....	34
13. Diseño MABA para la evaluación de combinaciones. Colocación del fármaco.....	35
14. Diseño MABA para la evaluación de combinaciones. Colocación de la solución de sales de metal.....	36
15. Diseño MABA para la evaluación de combinaciones. Colocación del inóculo.....	37

16. Diseño MABA para la evaluación de combinaciones. Colocación del Azul de Alamar. ....	38
17. Determinación de farmacoresistencia de los aislados clínicos mediante el método de proporción de resistencia .....	43
18. Reducción de Resazurina a resorufina.....	44
19. Resultados de metodología MABA.....	45
20. Esquema de ensayos Checkerboard realizados en aislados monoresistentes.....	54
21. Esquema de ensayos Checkerboard realizados en OxPs-22.....	55
22. Ensayos Checkerboard realizados en OxPs-22.....	56
23. Ensayos Checkerboard realizados en OxPs-4, OxPs-19, 152589.....	57
24. Combinación isoniacida-plata sobre 152589 y H <sub>37</sub> Rv.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Fármacos antituberculosos de primera línea.....	7
2. Fármacos antituberculosos de segunda línea.....	10
3. Procedimientos habituales en el laboratorio de microbiología que pueden generar aerosoles.....	20
4. Criterio de selección de aislados para su reactivación .....	22
5. Concentración crítica y proporción crítica de antifímicos de primera línea .....	25
6. Pruebas de identificación realizadas a los aislados clínicos .....	41
7. Concentración mínima Inhibitoria (MIC) de fármacos antituberculosos de primera línea sobre aislados de <i>M. tuberculosis</i> .....	46
8. MIC para determinar resistencia a fármacos mediante método MABA.....	47
9. MIC de sales de metales sobre aislados de <i>M. tuberculosis</i> .....	49
10. MIC de sales de metales sobre aislados de <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv.....	50
11. Mecanismos de eflujo de metales en <i>M. tuberculosis</i> .....	51
12. Metales con mayor inhibición sobre los aislados de <i>M. tuberculosis</i> .....	52
13. Combinación ISO-Plata sobre <i>M. tuberculosis</i> .....	59
14. Preparación de soluciones madre de fármacos de primera línea.....	76
15. Diluciones secundarias para alcanzar la concentración crítica.....	77

## ÍNDICE DE SIGLAS Y/O ABREVIATURAS

TB	Tuberculosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
LJ	Löwestein Jensen
ZN	Ziehl-Neelsen
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
STR	Estreptomicina
ISO	Isoniacida
RIF	Rifampicina
ETA	Etambutol
PAS	Ácido paraaminosalicílico
TB-MFR	Tuberculosis multifarmacorresistente
TB-XFR	Tuberculosis extremadamente resistente
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BTT	2-(2-tienil) benzotiazol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
Mpo	Oxido piridina-2-tiolato
CREI	Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa
INDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
MABA	Microensayo en placa con Azul Alamar
RND	Resistencia Nodulación División Celular
ATCC	American Type Culture Colletion
Zn	Zinc
Cu	Cobre
Ni	Níquel
Au	Oro
Mg	Magnesio
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Ga	Galio
Bi	Bismuto
Fe	Hierro
Mn	Manganeso
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinc
NiSO <sub>4</sub>	Sulfato de níquel
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata

# CAPITULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Tuberculosis

#### 1.1.1 Generalidades e incidencia

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que generalmente afecta el sistema respiratorio. Es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, y se adquiere por vía aérea. Puede llegar a ser mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado<sup>1</sup>.

La TB fue declarada como "emergencia global" por la organización mundial de la salud (OMS) en abril de 1993. Actualmente, es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. Se estima que en el año 2015 alrededor de 10.4 millones de personas se enfermaron a nivel mundial<sup>2</sup>, siendo Asia (61%) y África (26%) los continentes que reportaron el mayor porcentaje de nuevos casos. La incidencia más alta a nivel mundial de casos de TB fue reportada en Sudáfrica con aproximadamente más de 500 casos por cada 100 mil habitantes<sup>3</sup> (Figura 1).

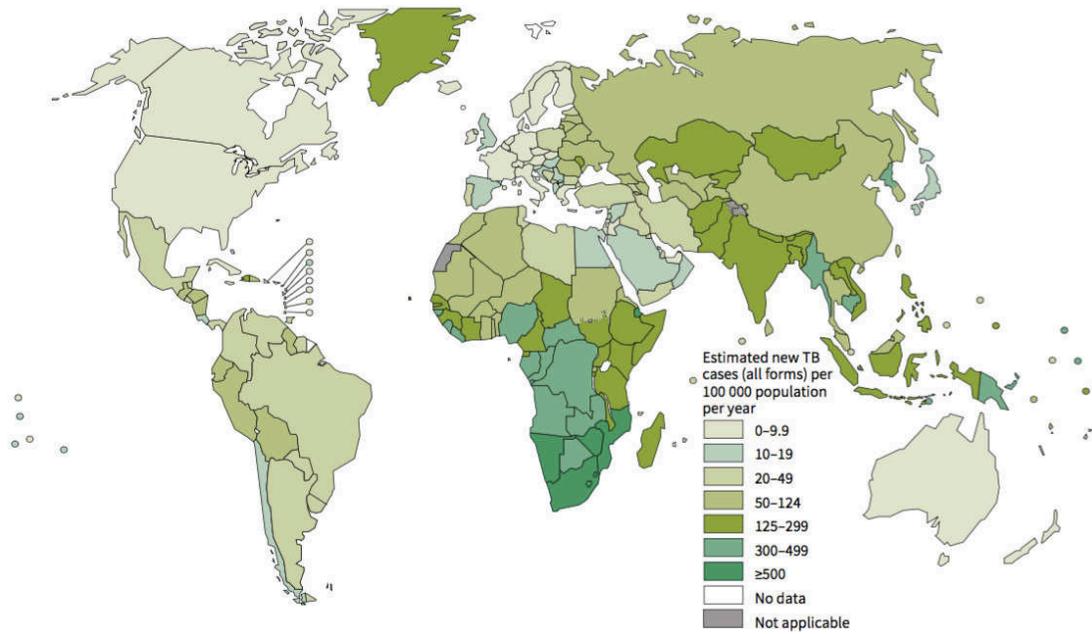


Figura 1. Tasas de incidencia de TB estimada por países, 2014

Fuente: Reporte Global de TB, OMS, 2014

A pesar de los esfuerzos para la erradicación de TB, ésta aún continúa siendo un problema de salud pública, concerniente principalmente a países de bajo y medio desarrollo. En el año 2015, en Latino América se reportaron 218,700 personas enfermas de TB, con una tasa de incidencia de 22.1 enfermos por cada 100,000 personas. Brasil notificó 73,221 casos (Figura 2), colocándolo como el primer lugar en incidencia de TB en los países de Latinoamérica, seguido de Perú con alrededor de 31,000 casos y México con 22,294 casos. Este último con una tasa de incidencia de 21 casos por cada 10,000 habitantes<sup>4</sup>.

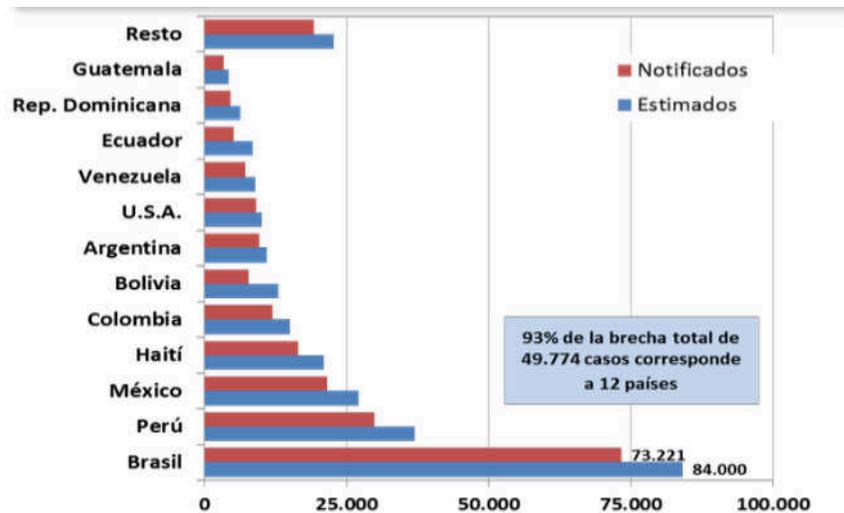


Figura 2. Casos de TB en América, 2016  
Fuente: Situación de TB en América, OMS, 2016

En el año 2013, México reportó una incidencia de 16.6 casos de TB por 100,000 habitantes, que correspondió a alrededor de 15,000 casos notificados. La incidencia tuvo grandes variaciones dentro del país que fueron desde 4.0 en Tlaxcala a 58.5 casos por 100 mil habitantes en Baja California. 16 Entidades Federativas reportaron incidencias superiores a las de la tasa nacional, siendo Nuevo León un claro ejemplo con una incidencia de 25 casos de TB por cada 100,000 habitantes<sup>5</sup> (Figura 3).

Por otra parte, la presencia de factores de riesgo como virus de inmunodeficiencia humana (VIH), desnutrición, diabetes, alcoholismo, tabaquismo y enfermedades crónicas pulmonares puede incrementar la oportunidad de una infección de TB<sup>6</sup>. En el año 2015, la TB fue una de las causas principales de defunción en las personas VIH-positivas, ya que el 35% de las muertes asociadas a VIH se debieron a TB<sup>7</sup>.

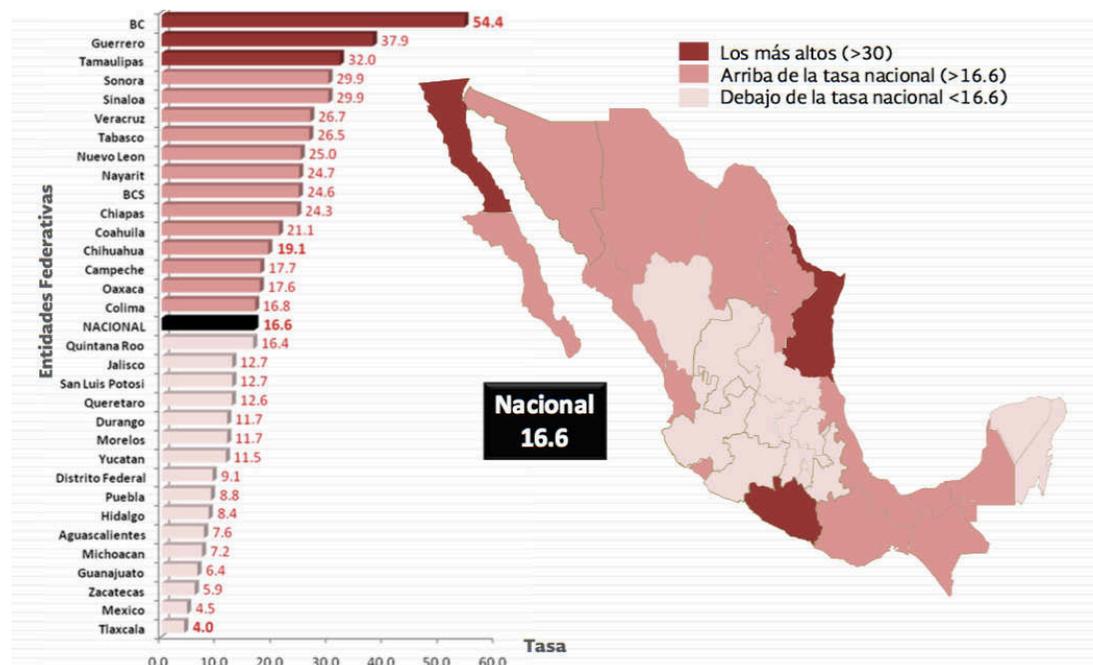


Figura 3. Distribución geográfica de la incidencia de TB, 2013

Fuente: Anuarios de Morbilidad, SS, 2013

### 1.1.2 Agente etiológico: *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* pertenece al Filo Actinobacteria, del orden Actinomycetales y familia *Mycobacteriaceae*. Se trata de una bacteria ácido-alcohol resistente, con tamaño entre 0.2-0.7 x 1-5  $\mu\text{m}$ , ligeramente curvados, aerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas y de crecimiento lento<sup>8</sup>.

Una de las características más representativa de *M. tuberculosis*, es que posee una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico, que supone el 60% del peso seco de la misma. Esta pared consta de cuatro capas (Figura 4): la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N- glucolilmurámico. Posteriormente una capa de arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Estos, se tratan de ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono). La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como trehalosa 6,6-dimicolato y por mucosidos. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la

micobacteria una escasa permeabilidad celular, la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos y la característica ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomano, intervienen en la patogenicidad y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos<sup>9</sup>.

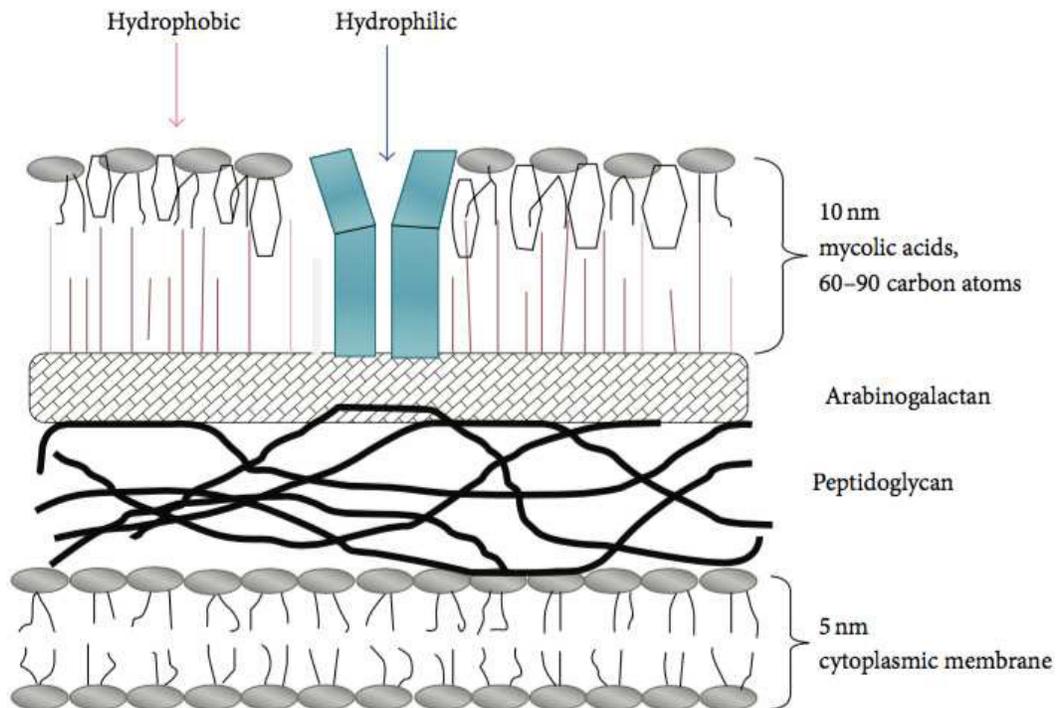


Figura 4. Pared celular de *M. tuberculosis*  
Fuente: Mandewale et al, 2015

*M. tuberculosis* forma colonias no pigmentadas y tiene un crecimiento muy lento con un tiempo de multiplicación de 15 a 18 horas en condiciones favorables. Su temperatura óptima de crecimiento suele estar entre los 35-37°C y su pH óptimo es 7. Este microorganismo es capaz de producir niacina y reducir nitratos. En general requiere una fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (amonio o aminoácidos) así como determinadas sales minerales, siendo estimulado su crecimiento por la presencia de CO<sub>2</sub> y ácidos grasos<sup>10</sup>.

El cultivo habitual para las micobacterias es uno de base sólida llamado Löwenstein- Jensen (LJ), el cual es considerado el medio de cultivo estándar ya que es económico y tiene una gran capacidad para hacer crecer las micobacterias la desventaja es que el crecimiento puede requerir hasta de dos meses. Actualmente se cuenta con otros medios de base líquida como Caldo Middlebrook que posibilitan un crecimiento más rápido que se observa en semanas<sup>11</sup>. Por otra parte, la tinción más usada para teñir micobacterias es la de Ziehl-Neelsen (ZN). Con esta técnica, las micobacterias son teñidas con fucsina fenicada y adquieren un color rojo que no se elimina al contacto con alcohol ácido y por eso que se las conoce como bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)<sup>12</sup>.

### 1.1.3 Tratamiento

La tuberculosis es una enfermedad que se puede tratar y en la cual la mayoría de los casos tiene cura, siempre y cuando se disponga de los medicamentos necesarios y que estos se tomen correctamente. Se calcula que entre 2000 y 2015 se salvaron unos 49 millones de vidas gracias al diagnóstico y tratamiento de la TB<sup>13</sup>.

Los resultados del tratamiento para TB en el año 2014 muestran una tasa de éxito de 83%. El objetivo del tratamiento es la curación en el 100% de los casos, asumiendo que los bacilos son sensibles a los medicamentos y que su administración sea efectuada en forma correcta durante un tiempo adecuado. Sin embargo, este resultado se dificulta por diferentes circunstancias relacionadas al uso indebido de los antifímicos y/o la administración de regímenes terapéuticos inadecuados<sup>14</sup>. Por otra parte, hay una pequeña proporción de microorganismos que por mutación al azar presentan resistencia natural a fármacos. El número aproximado se ha considerado que es de 1 en  $10^6$  microorganismos para isoniacida, 1 en  $10^8$  para rifampicina, 1 en  $10^6$  para etambutol,  $10^5$  para estreptomycin y  $10^2$  para pirazinamida. Por estas condiciones el tratamiento inicial de la forma activa de TB y sensible a antibióticos debe ser tratada con una combinación estándar de primera línea

la cual incluye cuatro medicamentos orales los cuales son etambutol, pirazinamida, isoniacida y rifampicina durante seis meses (Tabla 1). Estos fármacos se han usado por décadas<sup>15</sup>. Pero debido a los efectos secundarios que los fármacos provocan y a la duración del tratamiento, se ha notado un bajo apego al tratamiento por parte del paciente<sup>16</sup>, lo cual es área para la búsqueda de nuevos fármacos antituberculosos ya que según la OMS en su programa “Alto a la TB” no se ha observado un decremento en la prevalencia como se esperaba para el 2015<sup>17</sup>.

Tabla 1.  
Fármacos Antituberculosos de Primera Línea

Fármacos	Presentación	Dosis diaria			Dosis intermitentes (*)		Reacciones adversas
		Niños mg/kg peso	Adultos mg/kg peso	Dosis máxima	Niños mg/kg peso	Adultos dosis total máxima	
Estreptomina (STR) (**) (***)	Amp. 1 g	20-30	15	1 g	20	1 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vértigo</li> <li>• Hipoacusia</li> <li>• Dermatitis</li> </ul>
Isoniacida (ISO)	Comp. 100 mg	10-15	5-10	300 mg	20-30	600-800 mg	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuropatía periférica</li> <li>• Hepatitis</li> </ul>
Rifampicina (RIF)	Comp. 300 mg Jarabe 100 mg x 5 ml	15	10	600 mg	20-30	600 mg	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatitis</li> <li>• Hipersensibilidad</li> <li>• Interacciones medicamentosas</li> </ul>
Etambutol (ETA) (****)	Comp. 400 mg	20-30	15-25	1.2 g	50	2.4 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración de la visión</li> </ul>

(\*) 3 veces por semana según la tabla de referencia. (\*\*) Enfermos con menos de 40 kg de peso y mayores de 50 años, mitad de la dosis.  
(\*\*\*) No utilizar durante el embarazo. (\*\*\*\*) En menores de 8 años vigilar posible neuritis óptica la cual se puede presentar muy raramente.

Fuente: Estándares para la atención de TB en México, SS, 2009

## 1. 2 Tuberculosis Farmacorresistente

### 1.2.1 Generalidades e incidencia

El desarrollo de fármaco resistencia entre las Micobacterias contra los fármacos de primera línea es una cuestión de gran preocupación que requiere inmediata atención. En el año 2015 entre el total de los casos notificados de TB pulmonar hubo aproximadamente 480,000 casos de TB multifarmacorresistente (TB-MFR) a nivel mundial, la cual es causada por una cepa que no responde al tratamiento con isoniacida y rifampicina, los fármacos más efectivos para el tratamiento de TB<sup>18</sup>. La TB extensamente resistente (TB-XFR) es de mayor preocupación ya que muestra multidrogorresistencia y además resistencia a cualquier fluoroquinolona y al menos a un antibiótico inyectable de segunda línea<sup>19</sup>.

A lo largo de la primera década del siglo XXI, la emergencia de TB-MFR y TB-XFR todavía obstaculizan el control de TB. En América para el 2015, se diagnosticaron 4,508 de TB-MFR. El 94% de los casos estimados se concentró en 13 países con más casos de TB (Figura 5). Perú se encuentra en el primer lugar de incidencia con más de 1,500 casos notificados y México notifico menos de 200 casos para ese mismo año<sup>20</sup>.

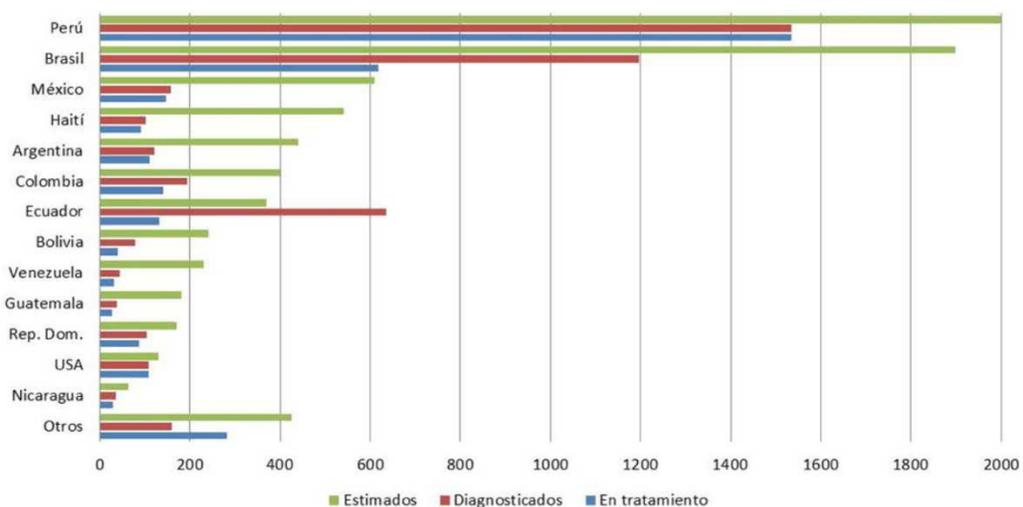


Figura 5. Casos de TB-MFR en América  
Fuente: TB-MFR en América, OMS, 2016

México reportó para el año 2012 un total de 161 casos de TB-MFR y 2 casos de TB-XFR. 15 de los Estados concentran el 90% de los casos de TB-MFR, siendo Nuevo León el 5º lugar con el reporte de 12 casos<sup>21</sup>(Figura 6).

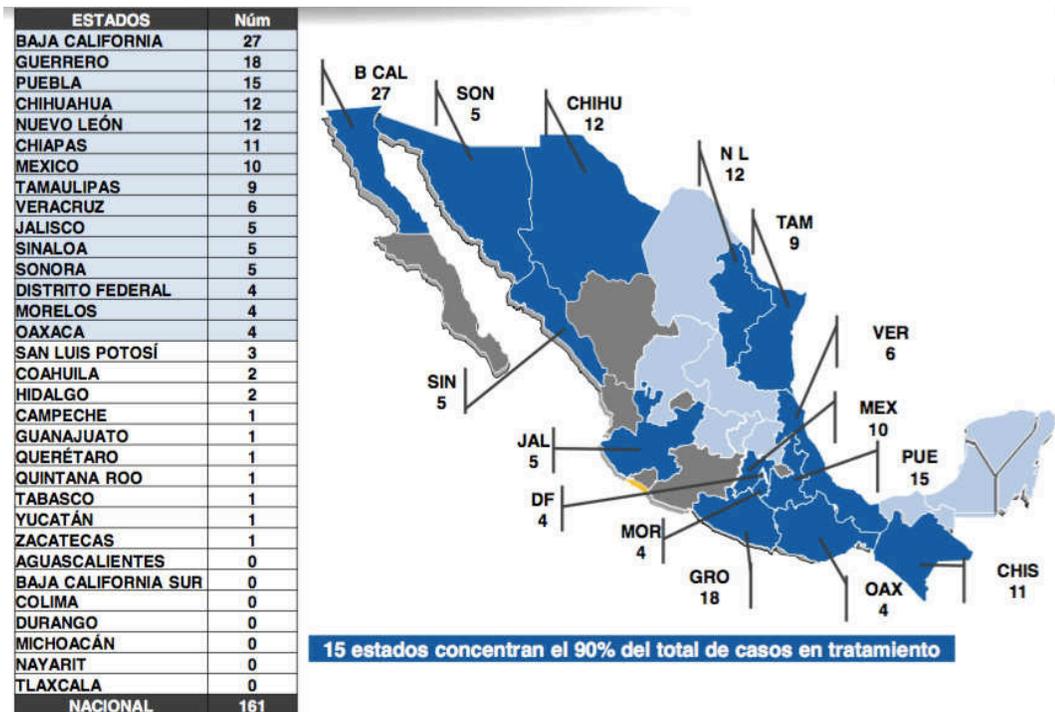


Figura 6. Casos de TB resistente a fármacos en México  
Fuente: CENAPRECE, 2013

### 1.2.2 Tratamiento

La TB-MFR puede ser tratada con medicamentos de segunda línea (Tabla 2), los cuales tienen la desventaja de ser más costosos, menos activos que la primera línea y el tratamiento puede llegar a extenderse hasta dos años además de aumentar la probabilidad de producir reacciones adversas (Tabla 2)<sup>22</sup>. Algunas de ellas graves, como hipoacusia y nefrotoxicidad producidas por Kanamicina, Amikacina o Capreomicina. Neuropatía periférica, crisis convulsivas, hepatitis, hipoglucemia producidas por Protionamida y Etionamida. Crisis convulsivas, cambios de personalidad y psicosis producidas por Cicloserina. Los resultados del tratamiento en el año 2013 muestran una tasa de éxito de 52% para TB-MFR y tan solo un 28% para TB-XFR<sup>23</sup>.

Tabla 2.

Fármacos Antituberculosos de segunda línea

Fármaco	Presentación	Dosis diaria			Reacciones adversas
		Niños mg/kg peso	Adultos mg/kg peso	Dosis máxima	
Kanamicina Amikacina Capreomicina	Amp. 1.0 g Amp. 0.5 g Amp. 0.5 g	15-20	10-15 15-30 15-20	1 g	Nefrotoxicidad Vértigo Hipoacusia rara vez bloqueo neuromuscular reversible Náusea vómito
Ciprofloxacino	Tab. 250 mg Tab. 500 mg	7.5 -15	30	1.5 g	gastritis artralgias cefalea
Ofloxacino	Tab. 400 mg	7.5 -15	20	800 mg	Náusea Vómito Gastritis Artralgias Cefalea
Levofloxacino	Tab. 500 mg Tab. 750 mg	7.5 -15	10-15	1.5 g	Náusea Vómito Gastritis Artralgias Cefalea
Moxifloxacino	Tab. 400 mg	3-7	3-10	800 mg	Náusea Mareo Diarrea
Protonamida Etionamida	Tab. 250 mg	10-15	15-20	1 g	Gastritis neuropatía periférica Depresión crisis convulsivas hepatitis hipoglucemia hipotiroidismo
Cicloserina	Caps. 250 mg	10-15	10-20	1 g	Cambios en la personalidad psicosis crisis convulsivas exantema
Ácido paraaminosalicílico	Sobres 3 g Tab. 3 g	200-300	200-300	10-12 g	Alteraciones gastrointestinales hepatitis hipersensibilidad

En casos complicados o fármacorresistentes, los fármacos deben ser indicados por los Comités Estatales de Fármacorresistencia (COEFAR) y por el Subcomité Nacional de Fármacorresistencia.

Fuente: Estándares para la atención de TB en México, SS, 2009

A partir del año 1989, hubo una disminución del número de nuevos fármacos antituberculosos descubiertos, hasta que en diciembre del 2012, la FDA aprobó un fármaco llamado Bedaquiline, el cual debido a sus efectos secundarios (mialgia, cefalea, mareos, prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma, náuseas, vómitos, diarrea, elevación de las transaminasas, artralgia) es usado principalmente para el tratamiento de TB-MFR<sup>24</sup>. Posteriormente en octubre del 2014, se autorizó el uso de Delamanid, para la misma finalidad debido a sus efectos secundarios (vómitos, diarreas, mareos, temblores ansiedad y prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma)<sup>25</sup>. Como parte de los esfuerzos para mejorar los resultados de éxito del tratamiento en TB-MFR, en el año 2015, al menos 70 países comenzaron a usar Bedaquiline y 39 introdujeron Delamanid. Sin embargo, en octubre del 2015 fue reportado un caso de un paciente con TB-MFR que desarrollo resistencia a Bedaquiline y Delamanid<sup>26</sup>.

La falta de fármacos con actividad contra TB-MDR continúa y se ha convertido en un serio problema de salud pública alrededor del mundo, por lo que hay una urgente necesidad para descubrir nuevos compuestos antituberculosos.

### 1.3 Mecanismos generadores de resistencia a fármacos de primera línea en *M. tuberculosis*

#### 1.3.1 Isoniacida

La isoniacida (ISO) es un fármaco con actividad bactericida frente a *M. tuberculosis*, el cual realiza su actividad específicamente cuando las bacterias se encuentran en fase de replicación activa. Se ha sugerido que el mecanismo de acción de este fármaco es debido a que *M. tuberculosis* mediante una enzima catalasa-peroxidasa transforma la ISO en su principio activo, el cual inhibe la síntesis de ácidos micólicos de la pared bacteriana<sup>27</sup>.

La presencia de mutaciones o deleciones en el gen *katG* que codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, y/o mutaciones en el gen que codifica para la

proteína InhA que es responsable de la producción de ácidos grasos, están asociadas al 70–80% de los aislados de *M. tuberculosis* resistentes a ISO. Cabe destacar que alrededor del 15–25% de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco que no poseen mutaciones en estas regiones génicas, han mostrado resistencia isoniacida, por lo cual se piensa debe existir otro mecanismo de resistencia<sup>28</sup>.

### 1.3.2 Rifampicina

La rifampicina (RIF) es otro fármaco importante el cual se une a la ARN polimerasa de la micobacteria e interfiere durante el proceso de replicación y síntesis de ácido nucleico. La ARN polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\sigma$ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente. Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa, disminuyendo la afinidad por RIF y otorgando resistencia al fármaco. En los últimos años se han observado algunos aislados resistentes cuya mutación no se localiza en la región de *rpoB*, por lo cual se cree que hay mecanismos adicionales generadores de resistencia<sup>29</sup>.

### 1.3.3 Etambutol

El etambutol (ETA) tiene actividad bacteriostática y actúa contra bacterias en fase de multiplicación activa. El mecanismo de acción de este medicamento no ha sido claramente definido, aparentemente está relacionado con la interferencia en el metabolismo del ARNr, la síntesis de fosfolípidos, la síntesis de ácido micólicos y la síntesis de polisacáridos de la pared celular bacteriana. Evidencias experimentales y clínicas indican que el etambutol ejerce un efecto sinérgico con otros fármacos antituberculosos como consecuencia del incremento en la permeabilidad bacteriana, permitiendo el ingreso en mayor cantidad de otros medicamentos.

La resistencia a ETA se encuentra asociada a mutaciones en los genes *embA*, *embB*, y *embC*, que codifican para la enzima arabinosiltransferasa,

relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular. Cerca del 70% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a ETA presentan una mutación en el gen *embB26*<sup>30</sup>.

#### 1.3.4 Estreptomicina

El mecanismo de acción de estreptomicina (STR) se basa en su unión al ARN ribosomal (ARNr) con lo cual inhibe la síntesis proteica de la bacteria. Mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* (o *rrnS*), los cuales codifican respectivamente la síntesis de la subunidad proteica 12s y el ARNr 16s están asociados a resistencia a este fármaco. En investigaciones previas se mostró que el 30% de las cepas resistentes a estreptomicina no mostraron mutaciones en los genes *rrs* o *rpsL*, por lo cual, se cree que existen mecanismos adicionales de resistencia relacionados con la permeabilidad de la pared y membrana bacteriana<sup>31</sup>.

#### 1.4 Estrategias para afrontar la problemática de fármacos contra Tuberculosis

Schatz reportó por primera vez en Estados Unidos Americanos en el año 1944 el uso de STR y un año más tarde en Suecia, Lehman reportó el uso de ácido paraaminosalicílico (PAS) ambos para el tratamiento de TB. Al paso de los años se observó resistencia a cada uno de estos fármacos, por lo que desde ese momento se evitó la monoterapia y surgió la terapia combinatoria<sup>32</sup>, posteriormente, se estandarizó el uso de fármacos con actividad contra *M. tuberculosis*, colocándose los esquemas farmacológicos de primera y segunda línea. Actualmente, hay menos de 20 fármacos con actividad contra micobacterias. Sin embargo, la investigación sobre el desarrollo de fármacos contra TB ha aumentado en la última década. La evaluación de la actividad antimicobacteriana de nuevas moléculas obtenidas por productos naturales o síntesis química<sup>33</sup>, la evaluación de fármacos que ya existen en el mercado, los cuales son usados en el tratamiento de padecimientos distintos a la TB<sup>34</sup>, y/o la evaluación de combinaciones de moléculas, son algunas de las estrategias utilizadas con la finalidad de encontrar un potencial fármaco contra TB.

#### 1.4.1 Investigación en el desarrollo de terapias combinatorias

Las combinaciones de diversas moléculas pueden ser una alternativa valiosa, mostrando ventajas como, mejor eficacia, decremento en la toxicidad, y reducción en desarrollo de drogo resistencia, debido a estas, se han convertido en un estándar para el tratamiento de diversas enfermedades, incluido TB y continúan representado un enfoque prometedor para problemáticas aun no resueltas<sup>35</sup>.

A partir del año 2010, se observado un incremento en la investigación sobre la potenciación del efecto de los fármacos de primera línea sobre TB en combinación con vitaminas como ácido ascórbico<sup>36</sup>, minerales como zinc, cobre, níquel<sup>37</sup> y algunos fármacos como ácido clavulánico /amoxicilina<sup>38</sup> y disulfiram<sup>39</sup>, mostrando mejores resultados de inhibición contra *M. tuberculosis* en combinación que por sí solos.

##### 1.4.1.1 Metales de transición

Algunos metales de transición como cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co), cromo (Cr) y magnesio (Mg) son micronutrientes. Su presencia e intervención es imprescindible para la actividad adecuada de las células, ya que controlan el metabolismo, conservan las funciones de diversos tejidos y el equilibrio de iones corporales. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal y animal<sup>40</sup>. Los cuales al ser consumidos, absorbidos y metabolizados, son eliminados principalmente a través de las heces y la excreción renal, siempre y cuando no sobrepasen las capacidades de excreción renal y hepática, ya que cuando esto ocurre, se acumulan en piel, mucosas u órganos internos<sup>41</sup>.

Recientes investigaciones han puesto en manifiesto el uso de metales de transición como una estrategia de los hospederos para resistir o controlar las infecciones por microorganismos, tal es el caso de infecciones por *M. tuberculosis*, en el cual, el hospedero intenta restringir la disponibilidad de hierro

y manganeso mediante proteínas llamadas calprotectinas, mientras que otras proteínas se encargan de acumular cobre y zinc dentro del fagosoma infectado por *M. tuberculosis*, con la finalidad de controlar la infección<sup>42</sup>.

Por otro lado, el efecto antimicrobiano que poseen algunos metales de transición como Zn, Co, Ni y Ag ha sido conocido desde la antigüedad, haciendo uso de estos metales como agentes antimicrobianos, pero durante la mayor parte de la historia sus modos de acción han permanecido inciertos. Recientes estudios indican que los diferentes metales causan distintos tipos de lesiones a las células microbianas, como lo es el estrés oxidativo, disfunción de proteínas o daño a la membrana<sup>43</sup>.

Debido a las características que presentan los metales de transición han formado parte de múltiples investigaciones, las cuales hacen uso de su potencial antimicrobiano en diversas disciplinas del conocimiento.

## CAPITULO 2

### 2. ANTECEDENTES, HIPOTESIS, OBJETIVO

#### 2.1 Antecedentes

En los últimos años, ha habido un creciente interés en los efectos antibacterianos sinérgicos de metales en combinación con antibióticos. Pereira *et al.*, 2012 evaluaron un compuesto orgánico llamado 2-(2-tienil) benzotiazol (BTT) frente a *M. tuberculosis* ATCC 27294, el cual mostró una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 230  $\mu\text{M}$ , por otra parte, realizaron complejos BTT con plata ( $\text{AgBTT}_2$ ) y BTT con oro ( $\text{AuBTT}$ ) los cuales mostraron MIC de 20.7  $\mu\text{M}$  y 34.7  $\mu\text{M}$ . Mostrando que al usar plata en su complejo se obtenían mejores resultados de inhibición contra *M. tuberculosis* que con el uso de oro<sup>44</sup>. Se sabe que la plata interrumpe procesos celulares en bacterias *in vitro* como la formación de enlaces disulfuro, homeostasis del hierro y el metabolismo. Estos cambios conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno e incremento en la permeabilidad de la membrana. Morones *et al.*, en el 2013 reportaron que al combinarse 15 y 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$ , (para células activas metabólicamente y no activas metabólicamente, respectivamente) con antibióticos como ampicilina, ofloxacina y gentamicina, se observa una potenciación de su actividad antimicrobiana<sup>45</sup>.

La toxicidad de los metales es debido a que estos pueden asociarse fuertemente con bases débiles como los grupos sulfhidrilo de las proteínas y se ha encontrado que el uso de estos a bajas concentraciones han potenciado la actividad

antimicrobiana de complejos y fármacos contra *M. tuberculosis in vitro*<sup>46</sup>. Machando *et al.*, en el 2013, probaron la actividad de un complejo llamado oxido piridina-2-tiolato (Mpo) contra *M. tuberculosis* mostrando MIC de 2.42  $\mu\text{M}$ , y MIC de 3.714  $\mu\text{M}$  para *M. tuberculosis* resistente a ISO y RIF. Posteriormente realizaron experimentos agregando Galio (Ga), Bismuto (Bi) y Hierro (Fe) al complejo, Ga(III)-Mpo, Bi(III) -Mpo y Fe(III) -Mpo, y al ser evaluadas las MIC se observó que las combinaciones con Ga(III) y Fe(III) mostraban MIC más bajas comparadas con el complejo sin los metales siendo 1.06 y 1.53  $\mu\text{M}$ , respectivamente, mientras que con Bi(III) la MIC fue de 3.29  $\mu\text{M}$  para *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. El mismo efecto fue observado en la exposición de *M. tuberculosis* resistente, la cual mostro MIC de 1.47 y 1.58  $\mu\text{M}$  para Ga(III) y Fe(III), mientras que para Bi la MIC fue de 7<sup>47</sup>.

Hoffman *et al.*, en el 2013, realizaron combinaciones de Cu (II)/fosfato y Co (II)/ fosfato mostrando para *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, MIC de 2.05  $\mu\text{M}$  y 71.53  $\mu\text{M}$  respectivamente, mientras para *M. tuberculosis* resistente a ISO y RIF, MIC de 2.7  $\mu\text{M}$  y 18.3 MIC. La combinación con Cu mostró mejor actividad antibacteriana contra *M. tuberculosis*, además demostraron que la combinación tenia efecto bactericida<sup>48</sup>. En el 2015, Mandewale *et al.*, observaron que al agregar Zn(II) y Cu(II) a hidrazonas, obtenían MIC menores que las hidrazonas por si solas. Ellos probaron dos hidrazonas, hidrazona A y B, las cuales mostraron MIC de 50 y 50  $\mu\text{M}$  sobre *M. tuberculosis* H37Rv. Al combinar hidrazona A y Zn(II), obtuvieron una MIC de 25  $\mu\text{M}$  y al combinar hidrazona A y Cu la MIC obtenida fue 6.25  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, al combinar la hidrazona B con Zn la MIC obtenida fue 12.5  $\mu\text{M}$ , y mientras que la combinación hidrazona B con Cu la MIC obtenida fue 6.25  $\mu\text{M}$ . Mostrando que las hidrazonas evaluadas al combinarse con Cu eran más efectivas contra *M. tuberculosis*.

El complejo Cu(II)-polietilenglicol-sucrosa-isoniacida fue descrito por Manning *et al.*, en el 2015, como un complejo que muestra mayor actividad antimicrobiana in vitro contra *M. tuberculosis* que la isoniacida individualmente. (MIC

complejo=0.21  $\mu$ M, MIC isoniacida= 0.97), fueron probados otros cationes como Zn y Co, pero debido a los valores menores obtenidos en las MIC combinando el complejo con Cu, este fue el que se seleccionó para formar parte del complejo.

Dalecki *et al.*, en el 2015, realizaron estudios sobre las propiedades antimicobacterias de Cu ( II / I) en combinación con disulfiram. Encontrando que en presencia de cobre (10  $\mu$ M) , disulfiram es bactericida sobre *M. tuberculosis* a 0.3  $\mu$ M. Esta combinación ejerció su actividad bactericida muy por debajo de la concentración activa de Cu II / I, mientras disulfiram individualmente no muestra actividad contra micobacterias. No fue observado este efecto con otro metal de transición como Fe(II), Ni(II), Mn(II) y Co(II).

Los métodos metalofarmacéuticos han logrado obtener menores MIC que el fármaco, o el complejo por sí solo en diversos experimentos anteriormente mencionados, debido a la habilidad del ligando para alterar la reactividad del metal, así como los efectos que el ion metálico puede tener sobre los ligandos<sup>49</sup>. Esta información nos da la pauta para suponer que los metales de transición a bajas concentraciones poseen la capacidad para mejorar el efecto de los antifímicos y de esta forma encontrar un posible estrategia para abordar la problemática de TB, debido a la necesidad del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos a los cuales este microorganismo sea sensible.

## 2.2 Hipótesis

La combinación de metal de transición (cobre, zinc, níquel, plata) con antifímico (etambutol, estreptomina, isoniazida, rifampicina) muestra actividad antimicrobiana sinérgica contra *Mycobacterium tuberculosis*

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 Objetivo general

Realizar un tamizaje para detectar la combinación (metal-antifímico) que muestre actividad antimicrobiana sinérgica contra *Mycobacterium tuberculosis*

### 2.3.2 Objetivos específicos

- 1 Reactivar cepas bacterianas de *M. tuberculosis*
- 2 Selección de cepas *M. tuberculosis* monoresistentes y multifarmacorresistentes
- 3 Identificar concentraciones mínimas inhibitorias de sales de cobre (II), níquel (II), zinc (II), plata y antifímicos de primera línea contra *M. tuberculosis*
- 4 Evaluar el efecto de la combinación del metal con menor MIC y el antifímico (etambutol, estreptomina, isoniazida, rifampicina) al cual se mostró resistencia

## CAPITULO 3

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Bioseguridad

*M. tuberculosis* está clasificado como un microorganismo de riesgo biológico nivel 3, este tipo de microorganismos pueden causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propaguen a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz. Este microorganismo se contagia principalmente vía aérea por lo que su manipulación en el laboratorio exponen al laboratorista al contagio debido a la producción de aerosoles. Tales procedimientos son muy comunes en el laboratorio de microbiología, aunque dichos aerosoles no sean claramente aparentes (Tabla 3).

Tabla 3.

Procedimientos habituales en el laboratorio de microbiología que pueden generar aerosoles

Procedimientos
Subcultivar colonias
Abrir placas de cultivo
Calentar y enfriar asas
Pipetear o inyectar suspensiones con cultivos
Centrifugar muestras o cultivos
Manipular y filtrar líquidos
Mezclar por agitación mecánica o manual

Las medidas a aplicar en caso de manejar microorganismos de nivel 3<sup>50</sup>, principalmente se centran en:

1. Debe existir un sistema de regulación del flujo de aire que evite la salida de corrientes desde el laboratorio de seguridad hacia el resto de las instalaciones, mediante el mantenimiento de una presión atmosférica inferior a la existente en el exterior del mismo (presión negativa)
2. Campanas de seguridad biológica clase II, en el interior de las cuales se realizará toda la manipulación de muestras y cultivos
3. Autoclave para esterilizar material independientemente del resto.
4. La descontaminación de las superficies de trabajo al menos una vez al día y después de cada manipulación de material infectado, la eliminación adecuada de los residuos generados en el laboratorio y la adopción de todas aquellas medidas que minimicen la generación de aerosoles.
5. El empleo de diversas ropas protectoras: batas impermeables de cierre trasero, guantes (no necesariamente estériles), cofia, lentes de protección. Todo este equipo debe permanecer en el interior del laboratorio de nivel 3 y no debe usarse en el exterior del mismo
6. Protección respiratoria siempre que se realice alguna actividad con muestras o cultivos mediante el empleo de mascarillas de seguridad N95
7. Todo el material de desecho debe ser descontaminado y posteriormente esterilizado antes de su eliminación

Las medidas de seguridad antes mencionadas fueron llevadas a cabo durante la realización de este proyecto de tesis. El desinfectante usado fue glutaraldehído 2 % y etanol al 70%.

### 3.2 Selección de aislados

Se seleccionaron aislados clínicos de *M. tuberculosis* del cepario del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI), los cuales fueron aislados del año 2013 al 2016. Los cuales mostraron perfil de monoresistencia y

multifarmacoresistencia a fármacos de primera línea al momento de su asilamiento (Tabla 4). Se reactivaron 13 aislados, tomando como control sensible a fármacos la cepa H<sub>37</sub>Rv.

Tabla 4.

Criterio de selección de aislados para su reactivación

Fármaco	H37Rv	A	B	C	D	E
STR	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
ISO	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	sensible
RIF	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	sensible
ETA	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	sensible

### 3.3 Reactivación de *M. tuberculosis*

Los aislados seleccionados fueron reactivados en Caldo Middlebrook 7H9 adicionado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) al 10%, Tween 80 al 5% y glicerol al 0.2%.

#### I. Procedimiento

Dentro de campana de seguridad

- a) Se tomaron 25 µl del aislado clínico a reactivar y se colocaron en un tubo de vidrio (13x 100 mm) con tapa de rosca, al cual previamente se le adiciono 2 ml de Caldo Middlebrook 7H9 con OADC al 10%, Tween 80 al 5% y glicerol al 0.2%
- b) Se incubaron a 37°C durante 8 semanas

Posteriormente a su reactivación, se le realizo tinción Ziehl-Neelsen.

#### II. Procedimiento

Dentro de campana de seguridad

- a) El aislado a teñir se colocó y extendió en la superficie de un portaobjetos con la ayuda de una pipeta Pasteur

- b) La laminilla fue secada a temperatura ambiente, posteriormente se fijó el extendido colocando la laminilla en una plancha a 80°C durante 5 segundos en dos ocasiones

Fuera de campana de seguridad

- a) Se cubrió completamente el extendido con fucsina fenicada, durante 15 min para permitir su coloración apropiada
- b) Se enjuagó la laminilla suavemente con agua destilada hasta desplazar el colorante
- c) Se decoloró el frotis con una solución de alcohol ácido al 3%
- d) Se enjuagó nuevamente con agua destilada y se eliminó el exceso
- e) Se cubrió el frotis con azul de metileno durante 1-3 min
- f) Finalmente se enjuagó nuevamente con agua, y se secó a temperatura ambiente para posteriormente realizar la observación microscópica. Los bacilos acido-alcohol-resistentes se observaron de color rosa-rojo.

### 3.4 Pruebas bioquímicas

Los 13 aislados clínicos reactivados fueron identificados fenotípicamente mediante ensayos por triplicado usando las pruebas bioquímicas de acumulación de niacina y reducción de nitratos previamente descritas por Bernardelli *et al.* tomando como control positivo: *M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv* y como control negativo un tubo con medio sin inóculo.

#### Procedimiento

Dentro de campana de seguridad

- a) Se cultivaron los aislados clínicos en tubos con Medio Löwenstein-Jensen y incubándose a 37°C durante 5 semanas
- b) Posteriormente, se le agregaron 2 ml de solución de nitrato de sodio 0.01M en buffer fosfato 0.022 M, corroborando que en el medio hubiera más de 50 colonias.

- c) Se incubó la solución de nitrato de sodio 0.01 M en buffer fosfato 0.022 M en contacto con el cultivo a 37°C de 24 a 48 horas
- d) Posteriormente a dos tubos vacíos estériles con tapón de rosca (13x100) y se les transfirió un 1 ml de sustrato a cada uno para la prueba de acumulación de niacina (I) y la reducción de nitratos (II)

#### I. Prueba de la acumulación de niacina

##### Dentro de campana de seguridad

- a) Se tomó 1 tubo con la solución de nitrato de sodio 0.001 M en buffer fosfato 0.022 M que había sido incubada anteriormente, además del control positivo (*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv) y negativo (Solución de nitratos sin inóculo), y se les agregó 1 gota de solución de anilina al 4% y dos gotas de bromuro de cianógeno. El cambio de color de transparente a amarillo indicó la presencia de niacina
- b) Una vez terminada la prueba se añadió NaOH al 4% a los tubos con la finalidad de neutralizar la reacción, ya que el bromuro de cianógeno en presencia de ácido se convierte en ácido cianhídrico que es muy tóxico

#### II. Pruebas de reducción de nitratos

##### Dentro de campana de seguridad

- a) Se tomó 1 tubo con la solución de nitrato de sodio 0.01M en buffer fosfato 0.022 M que había sido incubada anteriormente, además del control positivo (*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv) y negativo (solución de nitratos sin inóculo) y se les agregó 1 gota de HCL al 50%, 2 gotas de sulfanilamida al 0.02% y 2 gotas de clorhidrato de N-naftiletildiamina al 0.1%. El viraje a color rosado-rojo indicó que la prueba fue positiva para la presencia de nitritos.

### 3.5 Prueba de sensibilidad a fármacos

Las pruebas de sensibilidad a STR, ISO, RIF, ETA se obtuvieron mediante ensayos por triplicado usando el método de la proporción de resistencia previamente descrito por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). Este método consiste en determinar la proporción (porcentaje) de mutantes resistentes a cada uno de los fármacos, para lo cual se siembra un inóculo estandarizado en dos tubos de Löwenstein-Jensen, uno de ellos conteniendo una concentración estándar del antibiótico, mientras que el otro no contiene fármaco. Esto permite calcular el porcentaje de colonias que se desarrollan en presencia del fármaco (% de mutantes) respecto del crecimiento en ausencia del mismo (considerando como el 100%).

El medio Löwenstein-Jensen con fármaco se preparó incorporando al medio de cultivo la concentración crítica del fármaco antes de su coagulación. Dicha concentración crítica es la concentración mínima del fármaco que inhibe al 95 % de cepas silvestres de *M. tuberculosis* que nunca han sido expuestas al fármaco, pero que al mismo tiempo no inhibe a las cepas de *M. tuberculosis* que han sido aisladas de pacientes que no responden a la terapia y que son consideradas resistentes. Por otra parte, la proporción crítica también llamado criterio de resistencia, es el porcentaje de mutantes resistentes de una población bacilar por encima del cual, la cepa es considerada resistente y por debajo del cual, la cepa se cataloga como sensible para un fármaco dado (Tabla 5).

Tabla 5.  
Concentración crítica y proporción crítica de Antifímicos de Primera Línea

Fármaco	Concentración crítica ( $\mu\text{l/ml}$ )	Proporción crítica (%)
STR	5.5	1
ISO	0.2	1
RIF	42.0	1
ETA	2.0	1

## PROCEDIMIENTO

Dentro de campana de seguridad

- a) Se cultivó el asilado clínico en Medio Löweinsten-Jensen durante 4 semanas a 37°C
- b) Posteriormente empleando un aplicador de madera se tomaron colonias para realizar una suspensión de micobacterias en 2 ml de solución salina, ajustándolo al tubo N 1 de McFairland (en el tubo de 13 x 100)
- c) Se transfirió 1 ml de esta solución al primer tubo de 16 x 150 (dilución 1 a 10) y se mezcló. Se realizó la misma operación para los siguientes tubos, hasta obtener las 3 diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$
- d) Una vez realizadas las diluciones se inoculó el tubo control sin antibiótico, utilizando la dilución  $10^{-3}$ . Se aseguró la eliminación del agua de condensación
- e) Los tubos con STR, ISO, RIF, ETA se sembraron usando 2 gotas de la dilución  $10^{-3}$
- f) Se incubaron los tubos en posición inclinada a 37°C durante 4 semanas
- g) Al finalizar este periodo se observó la aparición de colonias en el tubo control (100%) y en los tubos con fármacos (1ª lectura), se incubó nuevamente a 37°C durante 3 semanas y posteriormente se realizó la observación de aparición de colonias en los tubos que no hayan mostrado crecimiento en la 1ª lectura. Porcentajes por arriba de la proporción crítica de acuerdo al fármaco correspondiente se consideraron resistentes.

Se aislaron las colonias resistentes de los tubos de la prueba de proporciones para los experimentos posteriores.

### 3.6 Concentraciones mínimas inhibitorias

#### 3.6.1 Concentraciones mínimas inhibitorias a fármacos

La obtención de las Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) a fármacos para cada una de los aislados se obtuvo mediante ensayos por triplicado usando

el microensayo en placa de 96 pocillos por el método de Azul Alamar (MABA) previamente descrito por Luna *et al.* Los fármacos evaluados fueron STR, ISO, RIF y ETA.

I. Preparación de placa

- a) Los pocillos marcados con naranja recibieron 100  $\mu$ l de medio 2 (Caldo Middlebrook 7H9 adicionado con glicerol al 0.2%, OADC al 0.05%), excepto el 6B en color morado, este recibió 200  $\mu$ l ya que se trata del control negativo (Figura 7)
- b) 200  $\mu$ l de agua destilada estéril fueron agregados a los pocillos de la periferia marcados en color celeste

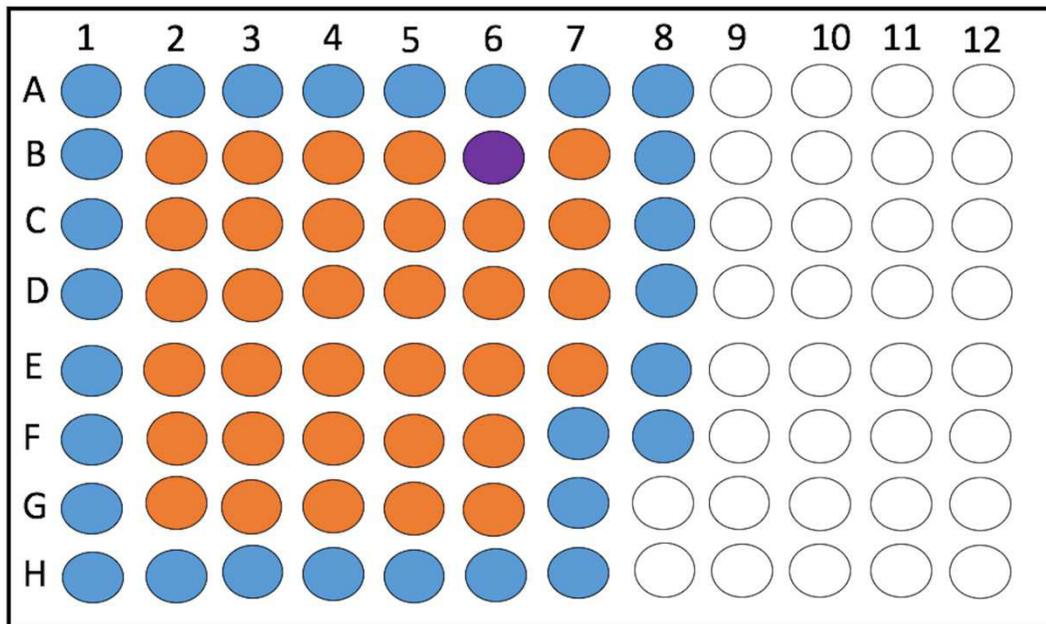


Figura 7. Diseño de MABA para la evaluación de fármacos, colocación del medio de cultivo. Los pocillos naranjas y morado contienen el medio de cultivo y los pocillos celestes contienen agua.

c) Posteriormente, 100 µl de solución de fármacos fueron agregados a los pocillos de la siguiente manera: (Figura 8)

2B y 7B en color amarillo, solución de STR (16 µg/ml)

3B y 7C en color celeste, solución de INH (4.0 µg/ml)

4B y 7D en color verde, solución de RIF ( 8.0 µg/ml )

5B y 7E en color morado, solución de EMB ( 64.0 µg/ml)

\*Los pocillos 7B, 7C, 7D, 7E fueron tomados como controles de fármacos sin inóculo

d) Se realizaron diluciones seriadas de los fármacos a evaluar de forma descendiente descartando los 100 µl del ultimo pocillo

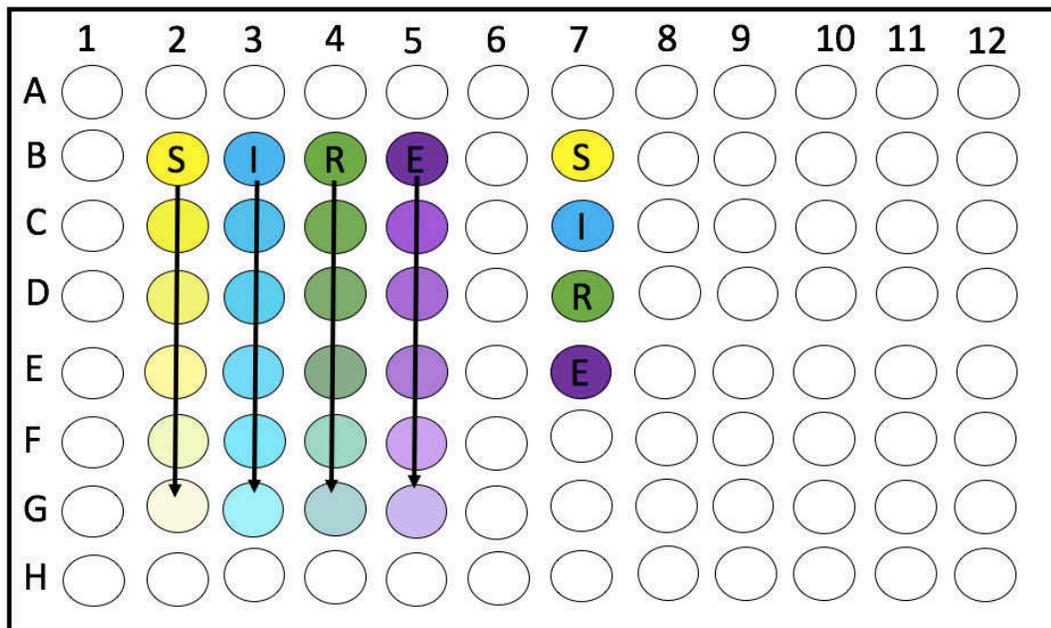


Figura 8. Diseño del ensayo MABA para la evaluación de fármacos, colocación de los fármacos. Los pocillos amarillos contienen STR, los pocillos celestes contienen ISO, los pocillos verdes contienen RIF, los pocillos morados contienen ETA, la dirección de la flecha indica el decremento en la concentración de los fármacos. S=estreptomicina, I= isoniacida, R=rifampicina, E=etambutol

## II. Preparación del inóculo

Dentro de campana de seguridad

- a) El aislado clínico a evaluar se se cultivó a 37°C en Medio 1 (Caldo Middlebrook 7H9, suplementado con glicerol al 0.2%, Tween 80 al 0.05% y OADC al 10%) durante 21 días
- b) Posteriormente, el inóculo se ajustó en Medio 2 a turbidez de McFarland 1, este se diluyó 1:25 en Medio 2

## III. Inoculación de placa (Figura 9)

- a) Se colocaron 100 µl del inóculo en los pocillos que contienen los fármacos a evaluar (en color verde), y en los controles positivos (pocillos 6C,6D,6E,6F en color rosa)
- b) Se agregó el inóculo diluido al 1% al pocillo 6G (en color amarillo), el cual sirvió para facilitar la interpretación de resultados. Este control se preparó agregando 99 µl del medio 2 y 1 µl de la suspensión 1:25 de inóculo
- c) La placa se incubó a 37°C durante 5 días

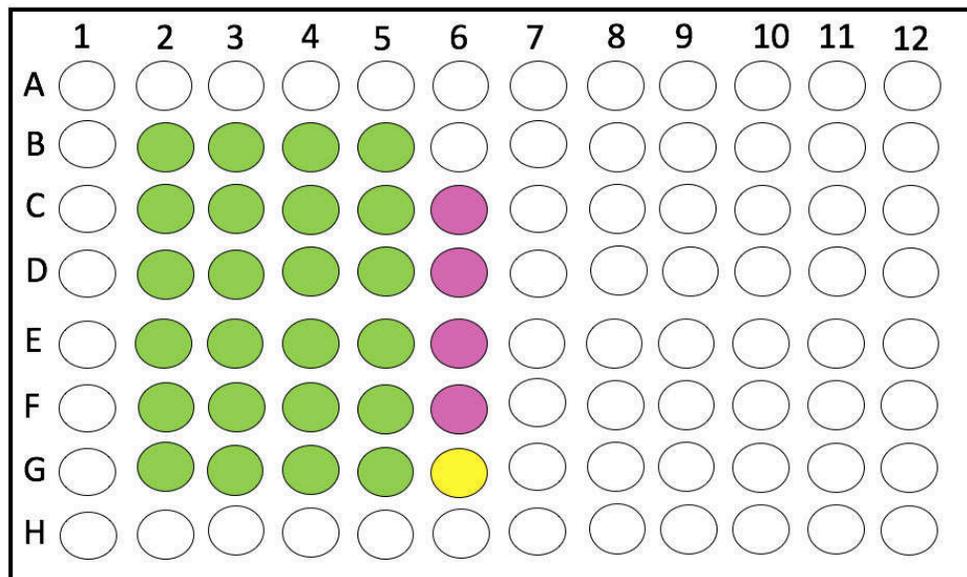


Figura 9. Diseño de MABA para la evaluación de fármacos, colocación del inóculo.

Los pocillos en color rosa y verde contienen inóculo. El pocillo en color amarillo contiene el inóculo diluido al 1%.

IV. Obtención de resultados (Figura 10)

- a) En el día 5, 20 µl de solución de Azul Alamar y 12 µl Tween 80 estéril al 10% fueron agregados a los controles de fármacos (en color verde), al control negativo (en color morado) y al control positivo (en color amarillo)
- b) La placa fue colocada a 37°C durante 24 horas

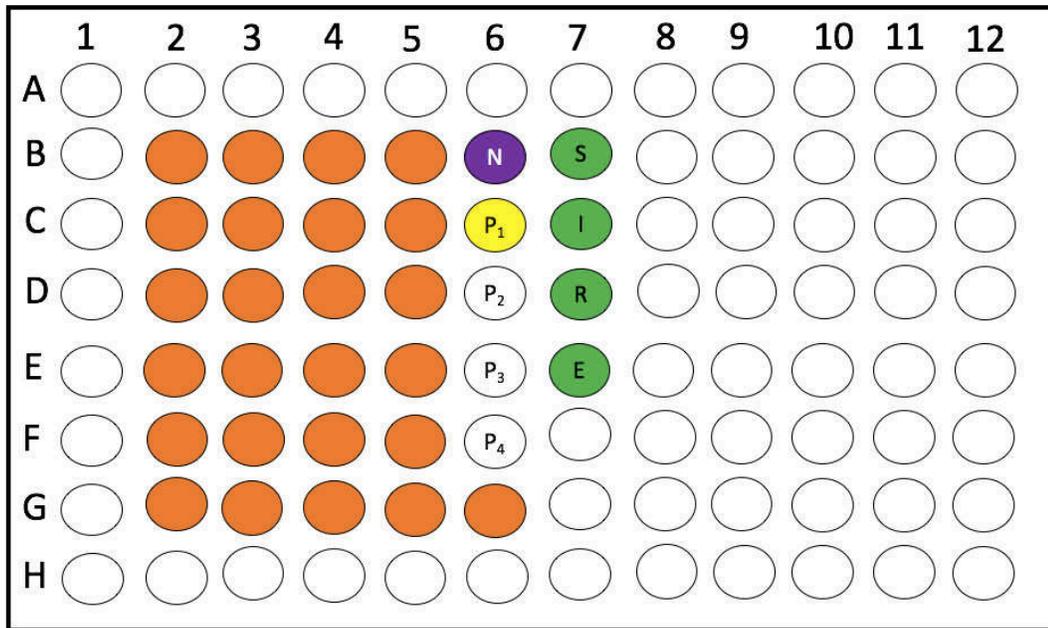


Figura 10. Diseño de MABA para la evaluación de fármacos, colocación Azul Alamar . El pocillo morado indica control negativo (N). El pocillo amarillo indica control positivo (P<sub>1</sub>). Los pocillos verdes indican controles de fármacos. Los pocillos naranjas indican área a evaluar. S=estreptomicina, I= isoniacida, R=rifampicina, E=etambutol, P<sub>2</sub>=control positivo 2, P<sub>3</sub>=control positivo 3, P<sub>4</sub>=control positivo 4

- c) Posterior a la incubación, los controles de fármacos y el control negativo permanecieron azules, mientras que el pocillo usado como control positivo (P<sub>1</sub>) se tornó rosa. Por lo que, se agregó 20 µl de solución de Azul Alamar y 12 µl Tween 80 estéril al 10% a los pocillos restantes (en color naranja)
- d) la placa se incubó nuevamente a 37°C durante 24 horas

Nota: Si después de las 24 horas de la colocación del Azul Alamar en el control positivo (P<sub>1</sub>), éste, no se tornó rosa, se agregaron 20 µl de solución de Azul

Alamar y 12 µl Tween 80 estéril al 10% al siguiente control positivo (P<sub>2</sub>), se incubó la placa a 37°C, éste procedimiento se realizó máximo 4 veces (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>). Posterior al cambio de coloración de azul a rosa en el control positivo, se colocó el azul y el Tween en los pocillos restantes.

Los resultados fueron interpretados como células no viables si permanecieron azules o si tuvieron la misma intensidad que el pocillo control al 1% e interpretado como viable, cualquier tonalidad de rosa, violeta o morado.

Los rangos de las concentraciones finales evaluadas correspondientes a cada fármaco fueron las siguientes: STR 0.125 - 4.0 µg/ml, INH 0.031-1.0 µg/ml, RIF 0.062-2.0 µg/ml, EMB 0.5-16 µg/ml.

### 3.6.2 Concentraciones mínimas inhibitorias a sales de metal

La obtención de las MIC a sales de metales para cada una de los aislados se obtuvo mediante ensayos por triplicado usando MABA previamente descrito. Las sales de metales evaluados fueron nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>), sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>) y sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>).

Fueron agregados 100 µl de solución sales de los metales a los pocillos de la siguiente manera: (Figura. 11)

2B y 7B en color amarillo, solución de CuSO<sub>4</sub> (2000 µM)

3B y 7C en color celeste, solución de AgNO<sub>3</sub> (2000 µM)

4B y 7D en color verde, solución de ZnSO<sub>4</sub> (2000 µM)

5B y 7E en color morado, solución de NiSO<sub>4</sub> (2000 µM)

\*Los pocillos 7B, 7C, 7D, 7E fueron tomados como controles de sales de metal sin inóculo

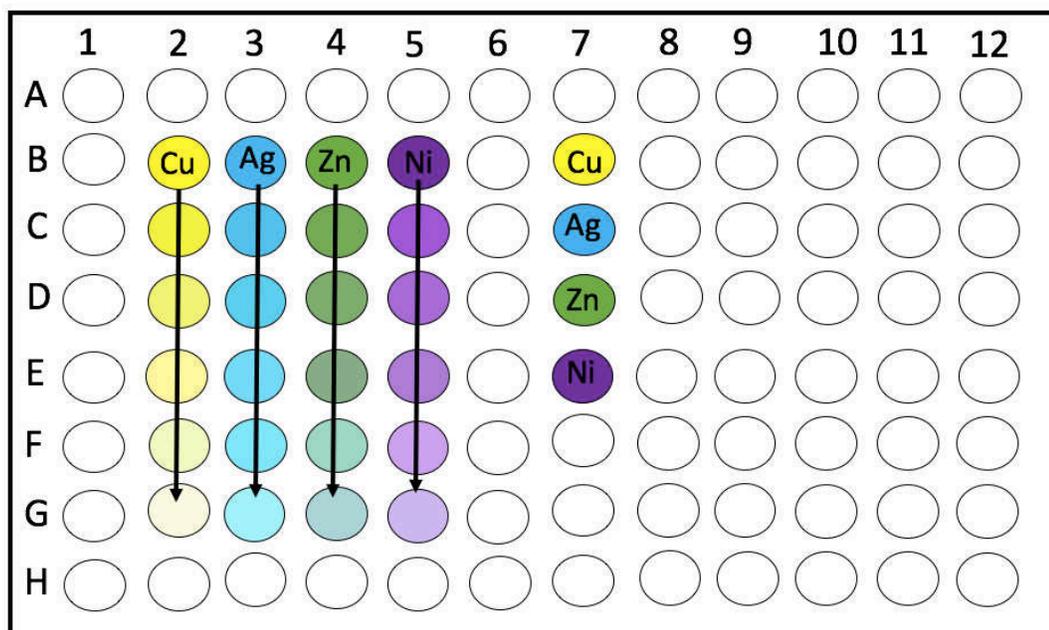


Figura 11. Diseño de MABA para la evaluación de metales, colocación de metales. Los pocillos amarillos contienen solución de  $\text{CuSO}_4$ , los pocillos celestes contienen  $\text{AgNO}_3$ , los pocillos verdes contienen  $\text{ZnSO}_4$ , los pocillos morados contienen  $\text{NiSO}_4$ , la dirección de la flecha indica el decremento en la concentración de los metales. Cu=  $\text{CuSO}_4$ , Ag=  $\text{AgNO}_3$ , Zn=  $\text{ZnSO}_4$ , Ni=  $\text{NiSO}_4$

Los rangos de las concentraciones finales evaluadas correspondientes a cada sal fueron las siguientes:  $\text{CuSO}_4$  15.625-500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{AgNO}_3$  15.625-500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  15.625-500  $\mu\text{M}$  y  $\text{NiSO}_4$  15.625-500  $\mu\text{M}$ .

### 3.7 Pruebas combinatorias

La combinación de tratamientos con actividad antituberculosis ha mostrado buen resultado contra esta enfermedad. Y al igual que los procedimientos para evaluar la susceptibilidad individual de los fármacos, existen pruebas para determinar el efecto de sus combinaciones. Para ello, uno de los métodos de laboratorio más utilizados es el tablero de damas o checkerboard (de su nombre en inglés). Mediante el cual, se evaluaron combinaciones de metales y fármacos,

los cuales mostraron las mejores actividades inhibitorias individualmente.

Los ensayos checkerboard fueron realizados por triplicado, se usaron microplacas de 96 pocillos, la lectura de resultados fue observada mediante un colorante de viabilidad celular Azul Alamar. Se evaluaron las combinaciones de fármacos y sales de metales, una dilución arriba de la MIC obtenida, la MIC y dos por debajo de ella, de cada tratamiento respectivamente. El fármaco fue colocado en el eje x, y el metal en el eje y. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de acuerdo a sus respectivos ejes, por lo tanto cada cuadro en la microplaca corresponde a una combinación única. Las solución del fármaco fue concentrada 8 veces (8x) y la solución del sales de metal (4x) respecto a la MIC al realizar el experimento, y posteriormente al realizar las diluciones para realizar las combinaciones y agregar el inóculo, estas soluciones se encontraban al 1x.

#### Preparación de placa

- I. Colocación del medio de cultivo (Figura 12)
  - a) Los pocillos en morado recibieron 100  $\mu$ l de medio 2 al 2x
  - b) Los pocillos en verde recibieron 100  $\mu$ l de medio 2 al 1x , excepto el 7B (en amarillo), el cual recibió 200  $\mu$ l de medio 2 al 1x ya que se trata el control negativo
  - c) 200  $\mu$ l de agua destilada estéril fueron agregados a los pocillos de la periferia (en color celeste)

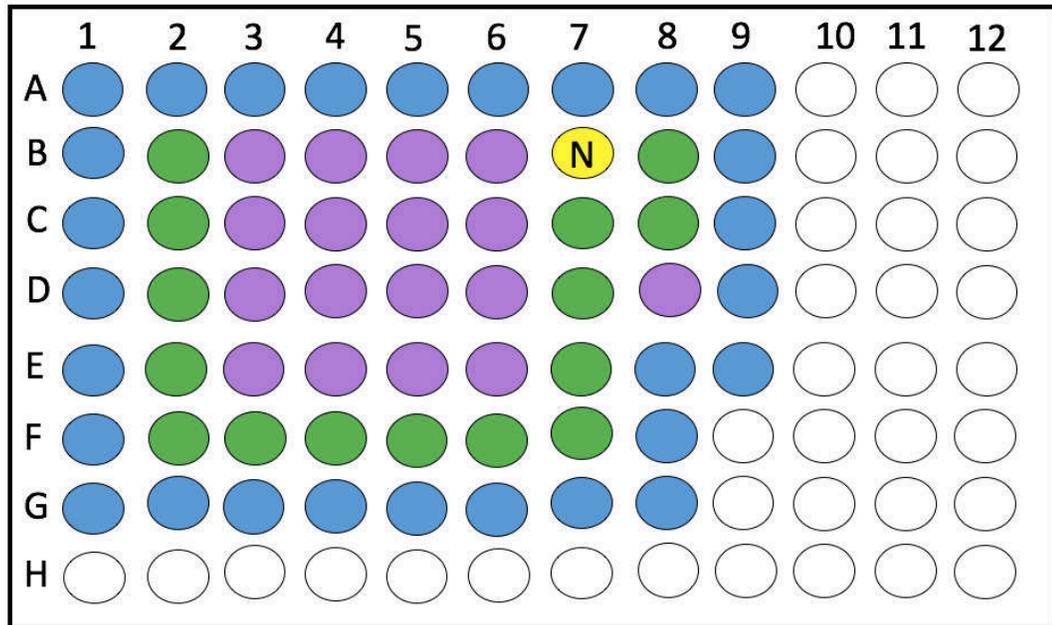


Figura 12. Diseño de MABA para la evaluación de combinaciones, colocación del medio de cultivo. Los pocillos morados contienen el medio de cultivo al 2x, los pocillos verdes y amarillo contienen el medio de cultivo al 1x, los pocillos azules contienen agua, N=control negativo

## II. Colocación del fármaco (Figura 13)

- a) Los pocillos en color verde recibieron 100  $\mu$ l del fármaco evaluado al 4x.  
El pocillo 8B fue usado como control de fármaco sin inóculo
- b) Los pocillos en color rosa y amarillo recibieron 100  $\mu$ l del fármaco evaluado al 8x
- c) El volumen del pocillo 8D (en amarillo) se mezcló y posteriormente se desecharon 100  $\mu$ l
- d) Se realizaron diluciones seriadas del fármaco en forma descendente, de la fila B hasta la E, descartando 100  $\mu$ l de este último

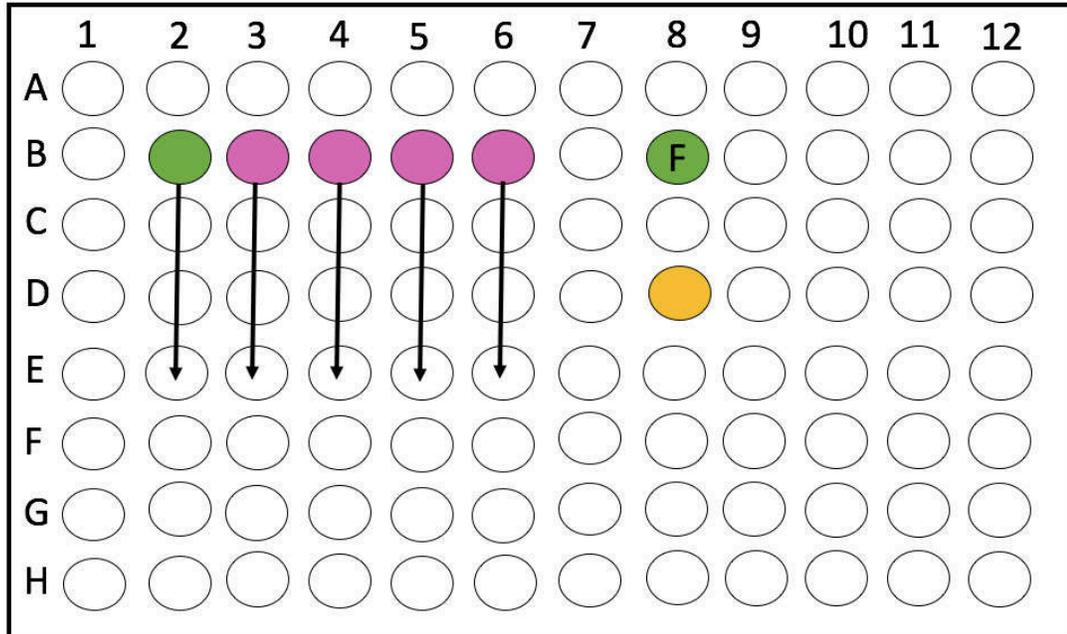


Figura 13. Diseño de MABA para la evaluación de combinaciones, colocación del fármaco. Los pocillos verdes contienen el fármaco al 4x, Los pocillos rosas y amarillos contienen el fármaco al 8x. La dirección de la flecha indica el decremento en la concentración de los fármacos. F=control de fármaco sin inóculo

### III. Colocación de la sal del metal (Figura 14)

- a) Se colocó 100  $\mu$ l la solución de sales de metal al 4x en los pocillos color azul. El pocillo 8C fue usado como control de metal sin inóculo
- b) El volumen del pocillo 8D (color verde) se mezcló, se desecharon 100  $\mu$ l, y posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ l de medio 2 al 1x. Éste, fue usado como control de combinación metal-fármaco sin inóculo
- c) Se realizaron diluciones seriadas de la solución de sales de metal, de izquierda a derecha, de la columna 6 hasta la 3, descartando 100  $\mu$ l de este último

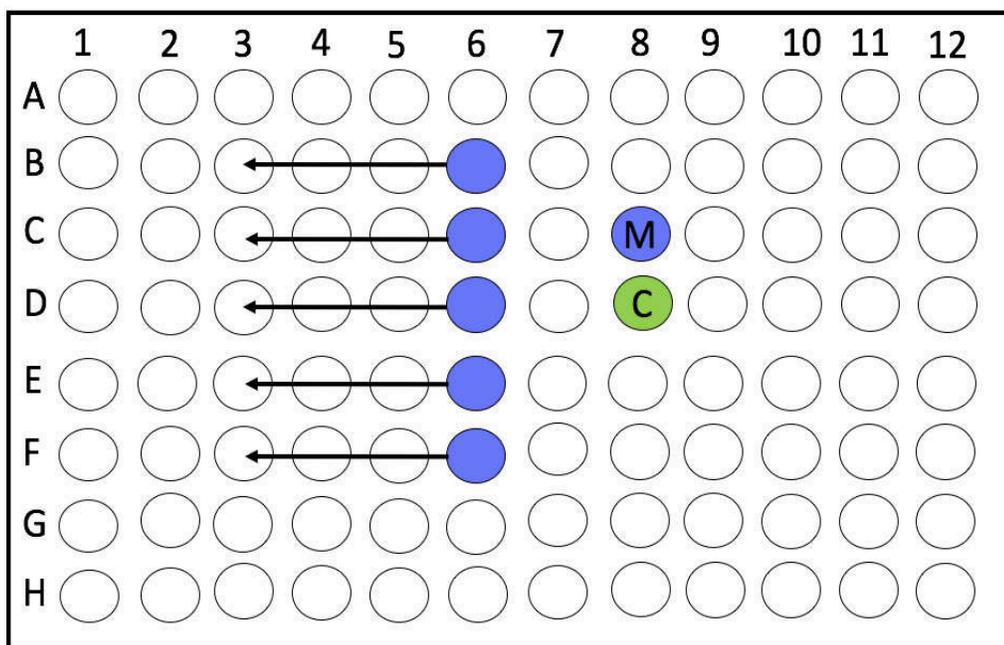


Figura 14. Diseño de MABA para la evaluación de combinaciones, colocación de la solución de sales de metal. Los pocillos azules y verde contienen las solución de sales de metal al 4x. La dirección de la flecha indica el decremento en la concentración de las sales de metal.

#### Preparación del inóculo

- a) El aislado a evaluar se cultivó a 37°C en Medio 1 (Caldo Middlebrook 7H9, suplementado con glicerol al 0.2%, Tween 80 al 0.05% y OADC al 10%) durante 21 días.
- b) Posteriormente el inóculo se ajustó en Medio 2 (Caldo Middlebrook 7H9 adicionado con glicerol al 0.2%, OADC al 0.05%) a turbidez de McFarland 1, este se diluyó 1:25 en Medio 2

#### Inoculación de la placa (Figura 15)

- a) Se inoculó la placa de 96 pocillos previamente preparada, colocando 100 µl del inóculo en los pocillos en color verde
- b) La placa se incubó a 37°C durante 5 días

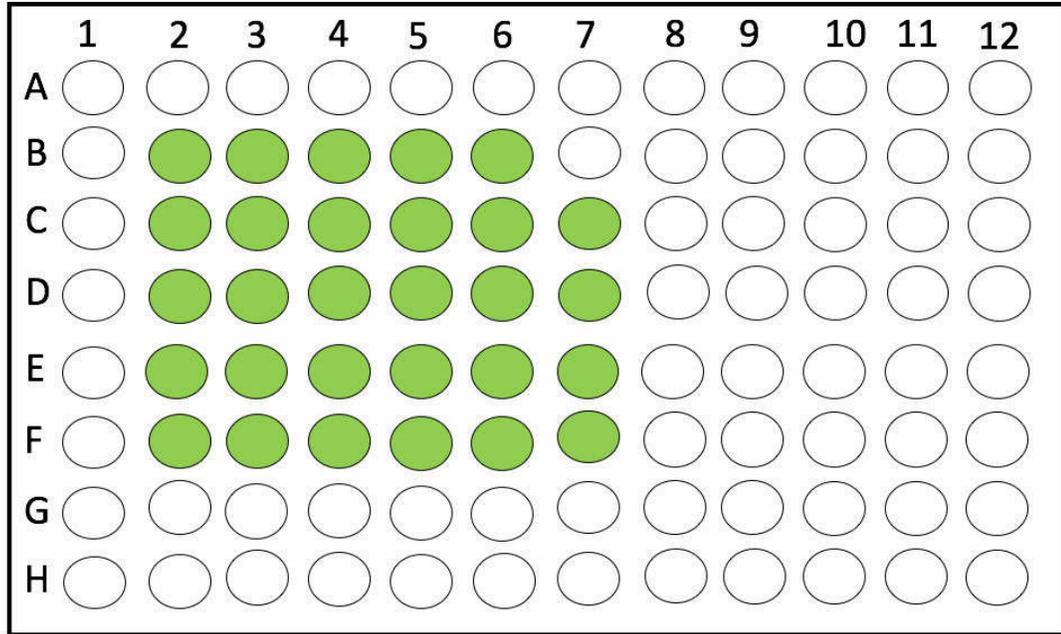


Figura 15. Diseño de MABA para la evaluación de combinaciones, colocación de inóculo. Los pocillos verdes contienen 100  $\mu$ l de inóculo.

#### Obtención de resultados (Figura 16)

- En el día 5, 20  $\mu$ l de solución de Alamar azul y 12  $\mu$ l Tween 80 estéril al 10% fueron agregados al control de fármaco (en color verde), al control de metal (en color naranja), al control de combinación (en color rosa), control negativo (en color morado) y control positivo (en color amarillo)
- La placa se colocó nuevamente a 37°C durante 24 horas
- Posterior a la incubación, los controles de fármacos, metal, combinación y el control negativo permanecieron azules, mientras que el pocillo usado como control positivo ( $P_1$ ) se tornó rosa. Por lo que, se agregó 20  $\mu$ l de solución de Alamar azul y 12  $\mu$ l Tween 80 estéril al 10% a los pocillos restantes (en color celeste)
- la placa se incubó nuevamente a 37°C durante 24 horas

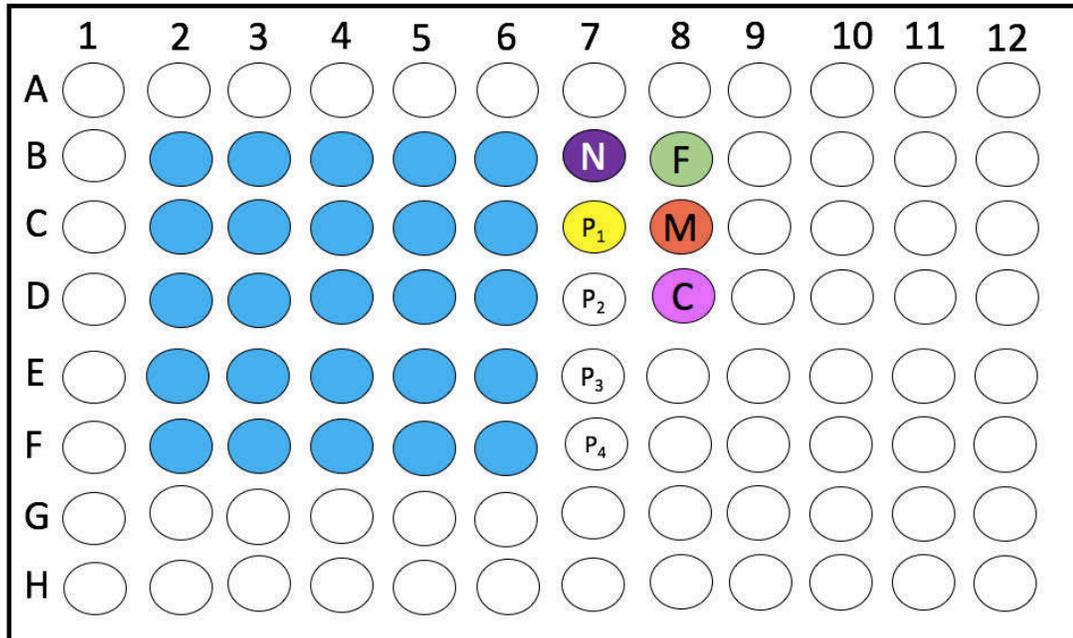


Figura 16. Diseño de MABA para la evaluación de combinaciones, colocación del Azul de Alamar. El pocillo morado indica control negativo (N). El pocillo amarillo indica control positivo (P<sub>1</sub>). El pocillos verdes indica el control de fármaco, el naranja el control de metal, el rosa el control de la combinación metal-fármaco. Los pocillos celestes indican área a evaluar. P<sub>2</sub>=control positivo 2, P<sub>3</sub>=control positivo 3, P<sub>4</sub>=control positivo 4

Nota: Si después de las 24 horas de la colocación del Alamar azul en el control positivo (P<sub>1</sub>), éste, no se tornó rosa, se agregaron 20 µl de solución de Alamar azul y 12 µl Tween 80 estéril al 10% al siguiente control positivo (P<sub>2</sub>), se incubó la placa a 37°C, éste procedimiento se realizó máximo 4 veces (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>). Posterior al cambio de coloración de azul a rosa en el control positivo, se colocó el azul y el Tween en los pocillos restantes.

Los resultados fueron interpretados como células no viables si permanecieron azules, e interpretado como viable, cualquier tonalidad de rosa, violeta o morado.

Por otra parte, la aproximación de los costos invertidos en el presente proyecto fueron de 50-60 mil pesos.

## CAPITULO 4

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Selección de aislados y reactivación de *M. tuberculosis*

Se seleccionaron 12 aislados con perfil de resistencia deseado dentro de las bases de datos del CRCEI del año 2013 al 2016, pero no se localizaron aislados clínicos con perfil de monoresistencia a etambutol. Por lo cual no se reactivó ninguna cepa con este perfil. La probabilidad de resistencia a este fármaco es más baja comparada con los otros antifímicos, por lo cual este ha sido incluido en el esquema de tratamiento de primera línea<sup>51</sup>. Esto coincide con la baja incidencia de aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a etambutol reportado por Fescina *et al.*, 2013, ya que del año 1997 al 2010 solo reportaron 1 aislado<sup>52</sup>.

Dorronsoro y Torroba en el 2007, observaron que los aislamientos de *M. tuberculosis* que se reactivaron en medio líquido comparado con el tiempo que tardaban en aparecer las colonias en Löwestein Jensen, se acortó 10 días<sup>53</sup>, por lo que el medio líquido fue seleccionado para este fin, en este proyecto. Los 12 aislados clínicos seleccionados lograron ser reactivados en un periodo máximo de 6 semanas mediante su cultivo en Caldo Middlebrook 7H9 adicionado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y *catalasa*) al 10%, Tween 80 al 5% y glicerol al 0.2%.

A la tinción de Ziehl Neelsen todos los aislados mostraron ser bacilos delgados ácido alcohol resistente, esta tinción se basa en la capacidad de las Micobacterias para incorporar un colorante básico (Fucsina fenicada) y retenerlo por la presencia de ácidos micólicos, resistiendo a la acción decolorante de una solución de ácido y alcohol<sup>54</sup>. Otros géneros como *Nocardia*, que también pueden ser causa de infecciones pulmonares y por lo tanto encontrarse en muestras clínicas, tienen ácidos micólicos de cadena corta (30-40 átomos de

carbono) y son débilmente ácidos-alcohol-resistentes, sin embargo la morfología colonial y micelial de las nocardias en medios de cultivo sólido permite su fácil diferenciación del género *Mycobacterium*.

## 4.2 Pruebas bioquímicas

La realización de las pruebas bioquímicas (niacinas y nitratos) para demostrar que los aislados se tratan de *M. tuberculosis*, y no de otra micobacteria de crecimiento lento parten de cultivar los asilados en uno de los medios más empleado para el cultivo de Micobacterias, Löwenstein Jensen , el cual es un medio sólido preparado a base de yema de huevo y que contiene el indicador de pH verde de malaquita. Los nutrientes de este medio basal, más los aportados por el agregado de la mezcla de huevos, constituyen un rico soporte para el crecimiento de una gran variedad de micobacterias excepto *M. leprae*. El verde de malaquita inhibe el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva y de algunas bacterias Gram negativas. Con el agregado de glicerina se estimula el crecimiento de *M. tuberculosis*, aunque gran parte de *M. bovis* es inhibido<sup>55</sup>. Al cabo de 3 a 4 semanas de incubación se lograron observar colonias color crema, de aspecto rugoso las cuales se desarrollaron en la superficie del medio, lo cual es característico de *M. tuberculosis*<sup>56</sup> según lo reportado por Borda *et al.*, 1977 y Fernández *et al.*, 2005.

Todas las micobacterias producen niacina, sin embargo la especie de *M. tuberculosis* carece de las enzimas necesarias para convertirla en ribonucleótido de niacina, por lo que esta se acumula en el medio de cultivo. Por lo tanto la prueba es positiva para la especie *M. tuberculosis*, aunque también para *M. simiae* y algunas cepas de *M. marinum* y *M. chelonae* que rara vez son causa de enfermedad pulmonar en humanos<sup>57</sup>. En la prueba química para la detección de niacina descrita por Bernardelli *et al*, el ácido nicotínico reacciona con el bromuro de cianógeno en presencia de una amina primaria (anilina) formando un compuesto amarillo, el cual fue observado en cada uno de los aislados evaluados.

Algunas micobacterias utilizan nitratos como fuentes de nitrógeno, reemplazando a las sales de amonio, las micobacterias que contienen actividad nitrato reductasa pueden obtener oxígeno de nitratos y otros productos de reducción. La reacción química es:



Esta reacción es positiva para *M. tuberculosis*; aunque también lo es para otras micobacterias que rara vez son causa de enfermedad pulmonar en humanos como *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*<sup>58</sup>. En la prueba química para la detección de nitrito descrita por Bernardelli *et al*, este compuesto es detectado añadiendo sulfanilamida y clorhidrato de N- naftiletilendiamina en un pH ácido. Si hay nitritos, se forma una coloración rojo, lo cual fue observado en cada uno de los aislados evaluados.

Los 12 aislados clínicos evaluados mostraron crecimiento lento, capacidad de producir niacina y reducción de nitratos, por lo que se confirmó que se trataban de *M. tuberculosis* (Tabla 6).

Tabla 6.  
Pruebas de identificación realizadas a los aislados clínicos

Aislado	BAAR	Velocidad de crecimiento	Niacina	Nitratos	
H <sub>37</sub> Rv	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
OxPs-22	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
152589	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
151655	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
OxPs-13	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
OxPs-3	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
151228	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
OxPs-4	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
160206	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
141206	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
160251	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
OxPs-19	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
141406	Positivo	3-4 semanas	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>

### 4.3 Prueba de sensibilidad a fármacos

La evaluación de sensibilidad de *M. tuberculosis* a los medicamentos de primera línea es de suma importancia clínica para el tratamiento de los pacientes con TB, ya que el médico responsable adecuará un nuevo esquema de tratamiento a su paciente en caso de reportarse resistencia a los fármacos de primera línea contra TB en las micobacterias aisladas de las muestras<sup>59</sup>. Por lo que esta prueba fue realizada en los aislados clínicos del CRCEI.

Existen al menos tres procedimientos estandarizados para llevar a cabo la prueba de sensibilidad: método de las concentraciones absolutas, método de la relación de resistencia y el método de la proporción de resistencia. El método de la proporción de resistencia fue elegido para este proyecto debido a que es el más utilizado a nivel global como referencia, debido a su alta sensibilidad, especificidad y bajo costo, esta técnica consiste en determinar el porcentaje de mutantes resistentes a cada uno de los fármacos, respecto al crecimiento de *M. tuberculosis* en ausencia de los fármacos. Su gran desventaja es que requiere de una gran cantidad de tiempo para generar resultados<sup>60</sup>.

El método de proporción de resistencia se basa en concentración crítica, que es la concentración mínima del fármaco que inhibe al 95 % de cepas silvestres de *M. tuberculosis* que nunca han sido expuestas al fármaco, pero que al mismo tiempo no inhibe a las cepas de *M. tuberculosis* que han sido aisladas de pacientes que no responden a la terapia y que son consideradas resistentes. Las concentraciones críticas para los fármacos utilizados en este proyecto fueron 5.5 µg/ml para STR, 0.2 µg/ml para ISO, 42.0 µg/ml para RIF y 2.0 µg/ml para ETA.

Los resultados se basan en proporción crítica o criterio de resistencia, el cuál es el porcentaje de mutantes resistentes de una población bacilar por encima del cual, la cepa es considerada resistente y por debajo del cual, la cepa se cataloga como sensible para un fármaco dado. La proporción crítica para STR, ISO, RIF y ETA es 1%<sup>61</sup>. Las proporciones críticas para cada uno de los aislados fue mayor

a 30% (Figura 17), con base en estos resultados se determinó que los aislados OxPs-22, 152589, OxPs-13, OxPs-4, 141206, OxPs-19 y 141406 mostraron un perfil de resistencia, mientras que los aislados 151655, OxPs-3, 151228, 160206, 160251 mostraron ser sensibles, de la misma forma que la cepa de referencia H37rv que fue tomada como control de sensibilidad.

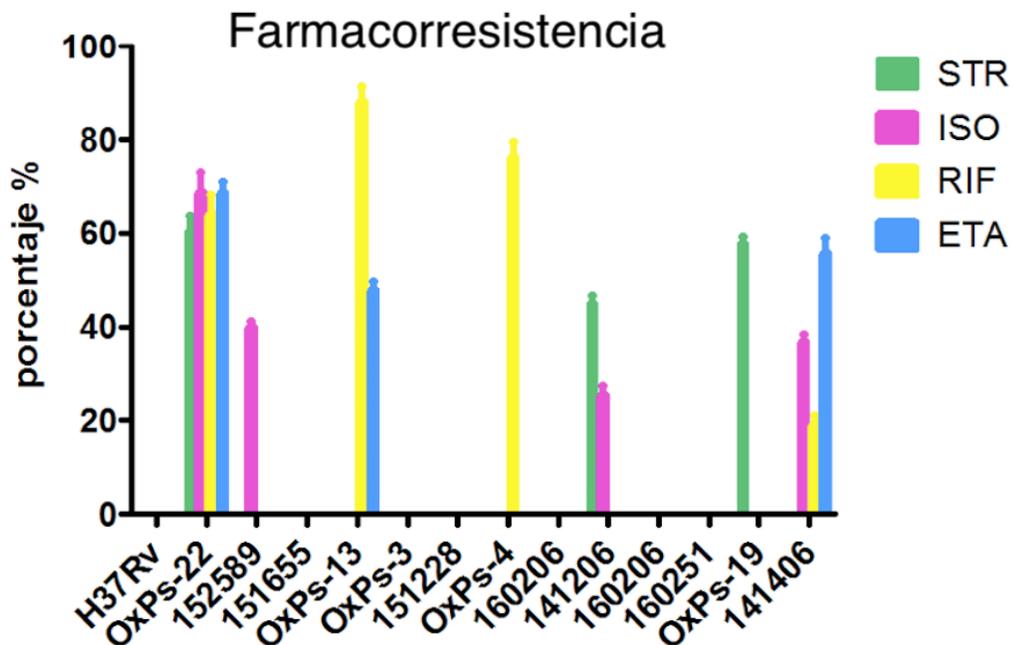


Figura 17. Determinación de farmacorresistencia de los aislados clínicos mediante el método proporción de resistencia. STR= Estreptomicina 40.0 µg/ml, ISO= Isoniacida 2.0 µg/ml, RIF= Rifampicina 40.0 µg/ml, ETA= Etambutol 2.0 µg/ml

Se seleccionaron los aislados clínicos: 152589 (resistente a ISO), OxPs-4 (resistente a RIF), OxPs-19 (resistente a STR), y OxPs-22 (MDR), para posteriores experimentos, debido a que mostraron el perfil de resistencia propuesto para su selección. Por otra parte, este experimento nos permitió la selección de colonias reistentes, las cuales fueron tomadas de los cultivos con fármaco al que fueron resistentes.

## 4.4 Concentraciones Mínimas inhibitorias

### 4.4.1 Evaluación de Concentración Mínima Inhibitoria a Fármacos

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* a diversos compuestos, permite monitorear los niveles de resistencia de los microorganismos a los mismos para establecer las políticas terapéuticas adecuadas y evaluar el desarrollo futuro de los nuevos fármacos, para esta finalidad el ensayo MABA ha sido usado por diversos autores en *Mycobacterium* spp.<sup>62</sup>

En el presente proyecto la obtención de las MIC a fármacos para cada una de los aislados se obtuvo mediante el método MABA, en este método es usado el colorante azul Alamar, el cual evidencia la actividad metabólica celular. El ingrediente activo de Azul Alamar, es la resazurina, un compuesto no tóxico, permeable a las células y de color azul. Al entrar en las células viables, la resazurina se reduce a resorufina por medio de enzimas mitocondriales, por lo cual se observa un cambio de coloración de azul a rosa<sup>63</sup> (Figura 18).

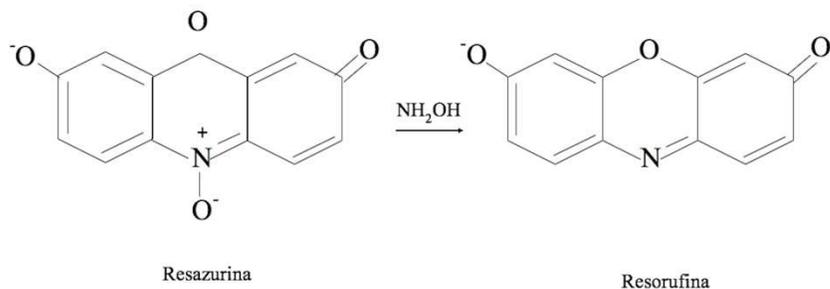


Figura 18. Reducción de resazurina a resorufina

La metodología MABA fue realizada por triplicado en los aislados: 152589 , OxPs-4 , OxPs-19 , OxPs-22 y H37Rv (Figura 19). Las MIC fueron definidas como la más baja concentración del fármaco que impide un cambio a rosa y que da una intensidad de color igual o menor que el control diluido.

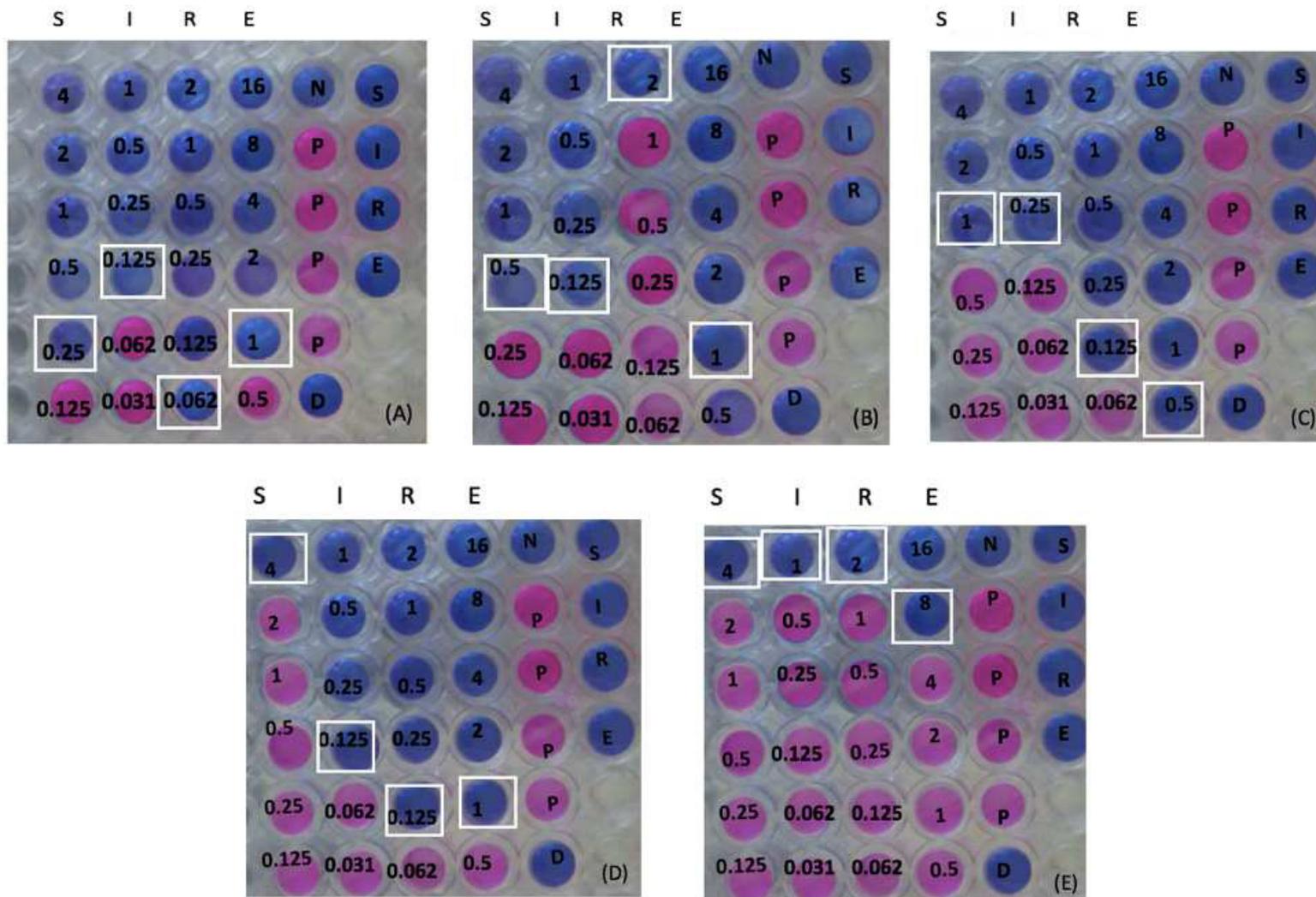


Figura 19. Resultados de Metodología MABA. (A): H37Rv, (B): OxPs-4, (C): 152589, (D): OxPs-19, (E): OxPs-22. Recuadros blancos representan las MIC. N=control negativo, P=control positivo, D=control inoculo 1%, S=estreptomicina, I= isoniacida, R= rifampicina, E= etambutol.

Las MIC obtenidas de cada aislado fueron colocados en la Tabla 7. Los aislados evaluados mostraron diferentes perfiles de resistencia a los fármacos, OxPs-22 y OxPs-19 mostrarón ser 16 veces mas resistentes, OxPs-4 mostró ser 2 veces mas resistente, 152589 mostró ser 4 veces mas resistente, a STR respecto a H<sub>37</sub>Rv.

Por otra parte, OxPs-22 mostró ser 8 veces mas resistente y 152589 mostró ser 2 veces mas resistente a ISO, respecto a H<sub>37</sub>Rv, mientras que OxPs-4 y OxPs-19 mostraron mostraron la misma sensibilidad que H<sub>37</sub>Rv.

OxPs-22 y OxPs-4 mostrarón ser 32 veces mas resistentes, OxPs-19 y 152589 mostró ser 2 veces mas resistentes a RIF respecto a H<sub>37</sub>Rv.

En cuanto a ETA, OxPs-22 mostró ser 8 veces mas resistente, OxPs-4 y OxPs-19 mostraron la misma sensibilidad que H<sub>37</sub>Rv, mientras que 152589 mostró ser aun mas sensible que la H<sub>37</sub>Rv.

Tabla 7.  
Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) de fármacos de primera línea sobre aislados de *M. tuberculosis*

Fármaco	H <sub>37</sub> Rv	OxPs-22	OxPs-4	152589	OxPs-19
STR	0.25 µg/ml	4.0 µg/ml	0.5 µg/ml	1.0 µg/ml	4.0 µg/ml
ISO	0.125 µg/ml	1.0 µg/ml	0.125 µg/ml	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml
RIF	0.062 µg/ml	2.0 µg/ml	2.0 µg/ml	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml
ETA	1.0 µg/ml	8.0 µg/ml	1.0 µg/ml	0.5 µg/ml	1.0 µg/ml

Comparando las MIC obtenidas de los aislados clínicos con MIC reportadas en literatura, las cuales se toman como rango de referencia para determinar si la cepa es considerada sensible o resistente a un fármaco<sup>64</sup> (Tabla 8), se determinó que el aislado clínico: 152589 es resistente a ISO, OxPs-4 es resistente a RIF, OxPs-19 es resistente a STR, y OxPs-22 es multifarmacorresistente. Los resultados obtenidos mediante el método MABA fueron acordes a los obtenidos con el método de porcentaje de resistencia. Lo que corresponde con lo reportado con Luna *et al.*, 2003.

Tabla 8.  
MIC para determinar resistencia a fármacos mediante método MABA

	Concentración de Fármacos (µg/ml)			
	STR	ISO	RIF	EMB
Palomino <i>et al.</i> , 2002				
Luna <i>et al.</i> , 2003	≥ 4	≥ 0.25	≥ 0.5	≥ 4
Pagliotto <i>et al.</i> , 2015				

Las MIC de OxPs-22 (multifarmacorresistente) y OxPs-19 (resistente a STR) fueron 4 µg/ml para STR, respectivamente. Las mutaciones que afectan al gen *rpsL* se dan en el 52–59% de las cepas resistentes y producen una resistencia de alto nivel con MIC alrededor de 4.5 mg/ml, mientras que las que afectan al gen *rrs* se observan en el 8–21% de las cepas y producen una resistencia de nivel intermedio con MIC de 0.05–0.5 mg/ml. En aproximadamente un tercio de las cepas resistentes existe un nivel de resistencia menor a los mencionados anteriormente y no se les detectó alteraciones en los genes *rrs* o *rpsL*<sup>65</sup>. En estas cepas se ha evidenciado un mecanismo de permeabilidad para justificar la resistencia.

Las MIC de OxPs-22 (multifarmacorresistente) y 152589 (resistente a ISO) fueron 1.0 y 0.25 µg/ml para ISO, respectivamente, uno de los mecanismos más frecuentes de las Micobacterias para la resistencia a ISO son las mutaciones del gen *katG*. En el 42 al 58% de las cepas resistentes a la ISO se encuentran mutaciones de este gen, la más frecuente es la Ser315Thr, que se encuentra en aproximadamente el 40% de las cepas resistentes. La enzima resultante es incapaz de activar la ISO y provoca una resistencia de alto nivel mostrando MIC superiores a 1.0 mg/ml<sup>66</sup>.

La MIC de OxPs-22 (Multifarmacorresistente) fue de 8 µg/ml para ETA. El ETA es activo frente a *M. tuberculosis* ya que inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana. La resistencia al ETB se asocia a cambios la región genómica del operon *embCAB*, que codifica arabinosil transferasa relacionada con la síntesis de componentes de la pared celular, como el

arabinoga-lactano y el lipoarabinomanano. Entre el 47 y el 69% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes que presenta mutaciones en la región EmbB con MIC alrededor de 4.2 mg/ml. En las cepas que no presentan mutaciones en la región EmbB la resistencia suele ser menor con MIC inferiores a 1.0 mg/ml<sup>67</sup>.

Las MIC de OxPs-22 (multifarmacorresistente) y OxPs-4 (resistente a RIF) fueron 2.0 µg/ml para RIF, respectivamente. La RIF es un inhibidor de la síntesis de ARN mensajero (ARNm) y, por tanto, de la transcripción genética, al unirse a la polimerasa del ARN dependiente del ADN de los procariontes. Las micobacterias, adquieren resistencia a la RIF mediante mutaciones en el gen *rpoB* que codifica para la subunidad b de la polimerasa del ARN. Aproximadamente el 96% de las cepas resistentes a la RIF posee mutaciones en esta región. Las mutaciones más comunes (65–86%) son las que afectan al codón 526 o al codón 531 y dan lugar a una resistencia de alto nivel con MIC alrededor de 4.32 mg/ml. Por otra parte se sabe que en el 4% de las cepas que no se detectan mutaciones en este fragmento, la resistencia puede deberse a mutaciones fuera de esta región<sup>68</sup>.

De los aislados evaluados farmacorresistentes, ninguno mostró resistencia de alto nivel con MIC alrededor de las reportadas, por lo que no se puede relacionar la MIC obtenidas con un probable gen responsable del comportamiento fenotípico de las cepas, cabe destacar que para evaluar si los aislados tienen o no una mutación, a la cual se pueda conferir la resistencia a determinado fármaco, deben de realizarse los experimentos pertinentes.

#### 4.4.2 Evaluación de Concentración Mínima Inhibitoria a Metales

Los aislados evaluados mostraron diferentes perfiles de resistencia a las sales de los metales (Tabla 9).

Tabla 9.  
MIC de sales de metales sobre aislados de *M. tuberculosis*

Fármaco	H <sub>37</sub> Rv	OxPs-22	OxPs-4	152589	OxPs-19
CuSO <sub>4</sub>	35 µM	200 µM	200 µM	200 µM	250 µM
AgNO <sub>3</sub>	20 µM	40 µM	25 µM	25 µM	25 µM
NiSO <sub>4</sub>	200 µM	500 µM	500 µM	160 µM	140 µM
ZnSO <sub>4</sub>	100 µM	> 500 µM	> 500 µM	400 µM	400 µM

152589, OxPs-4 y OxPs-22 mostrarán ser 5 veces más resistentes, mientras que OxPs-19 mostró ser 7 veces más resistente, a CuSO<sub>4</sub> respecto a H<sub>37</sub>Rv.

Por otra parte, OxPs-19, 152589, OxPs-4 mostrarán ser 1.25 veces mas resistentes, mientras que OxPs-22 mostró ser 2 veces mas resistente a AgNO<sub>3</sub> respecto a H<sub>37</sub>Rv.

OxPs-22 y OxPs-4 mostrarán ser 2.5 veces mas resistentes a NiSO<sub>4</sub> respecto a H<sub>37</sub>Rv, mientras que OxPs-19 y 152589 mostraron ser más sensibles a NiSO<sub>4</sub> respecto a H<sub>37</sub>Rv.

En cuanto a ZnSO<sub>4</sub>, OxPs-19 y 152589 mostraron ser 4 veces mas resistentes, OxPs-4 y OxPs-22 mostraron ser arriba de 5 veces mas resistentes, a ZnSO<sub>4</sub> respecto a H<sub>37</sub>Rv.

Se observó que los aislados clínicos OxPs-19 y 152589 con perfil fenotípico de monoresistencia a STR y ISO, respectivamente, mostraron mayor resistencia a sales de AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> respecto a H<sub>37</sub>Rv, mientras que a NiSO<sub>4</sub> estos mismos aislados mostraron mayor sensibilidad. Los aislados clínicos OxPs-4 y OxPs-22 mostraron mayor resistencia a las sales evaluadas (AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>) respecto a H<sub>37</sub>Rv.

Las MIC obtenidas en el presente trabajo así como las obtenidas en literatura para las sales evaluadas de H<sub>37</sub>Rv son presentadas en la Tabla. 10 la cual compara los resultados obtenidos, observándose que al evaluar cepas H<sub>37</sub>Rv estas pueden presentar diversos perfiles de sensibilidad a las sales de los

metales, al ser de ATCC diferentes<sup>69</sup>. Incluso ha sido reportado por Gorbach *et al.*, 2014, resistencia a pirazinamida por H<sub>37</sub>Rv ATCC 25618.

Tabla 10.  
MIC de sales de metales sobre aislados de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

Metal	H <sub>37</sub> Rv literatura			H <sub>37</sub> Rv presente trabajo	
	MIC	ATCC	Autor	MIC	ATCC
CuSO <sub>4</sub>	15-25 µM	6230	Speer <i>et al.</i> , 2016	35 µM	27294
ZnSO <sub>4</sub>	Mayor a 100 µM	27294	Bheemanagouda <i>et al.</i> , 2016	100 µM	27294
AgNO <sub>3</sub>	73.6 µM	25618	Pereira <i>et al.</i> , 2012	20 µM	27294

En general, fue observado que los aislados de *M. tuberculosis* que presentaban resistencia a fármacos de primera línea presentaron tolerancia a mayores concentraciones de sales de metal respecto a H<sub>37</sub>Rv, excepto para Ni en 2 aislados monoresistentes (152589 y OxPs-19).

Para resistir la potencial intoxicación por iones metálicos los microorganismos expresan un gama bombas de eflujo de metales y transportadores pertenecientes a 3 familias: familia Resistencia-Nodulación-División Celular (RND), Familia de *Facilitadores* de la *difusión* de los *cationes* y familia ATP-asas tipo P. En el genoma de *M. tuberculosis* no han sido encontrados familias de RND mientras que los transportadores de difusión de catión (Rv2025c) y ATP-asas tipo P (CtpA-J, CtpV y KdpB) están presentes. Ha sido reportado que alguno de estos sistemas de eflujo son requeridos para la virulencia microbiana en varias especies bacterianas incluido *M. tuberculosis*<sup>70</sup> (Tabla. 11). Por lo cual pudieran ser relacionados estos mecanismos de eflujo de metales con las resistencias a AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> NiSO<sub>4</sub> que presentan los aislados OxPs-4, OxPs-22, OxPs-19 y 152589.

Tabla 11.  
Mecanismo de eflujo de metales en *M. tuberculosis*

Proteína	Tipo	Metal	Bibliografía
P-ATPasas	CtpJ	Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Neyrolles <i>et al.</i> , 2015 Rodríguez <i>et al.</i> , 2014
	CtpV	Cu <sup>+</sup>	
	CtpC	Zn <sup>2+</sup>	
	CtpA	Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup>	
	CtpB	Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup>	
Metalotioleinas	MymT	Cu <sup>2+</sup>	Shi <i>et al.</i> , 2015
		Ni <sup>2+</sup>	
		Zn <sup>2+</sup>	
Porinas	MspA	Cu <sup>2+</sup>	Neyrolles <i>et al.</i> , 2015 Speer <i>et al.</i> , 2016
	MctB		

Las sales que presentaron los mejores resultados sobre H<sub>37</sub>Rv, cepa sensible a fármacos de primera línea, fueron: AgNO<sub>3</sub> y CuSO<sub>4</sub> con MIC de 20 y 35 µM, respectivamente.

En cuanto a las cepas mono-resistentes las sales que presentaron los mejores resultados, fueron: AgNO<sub>3</sub> y CuSO<sub>4</sub> sobre OxPs-4 (resistente a RIF), con MIC de 25 y 200 µM, AgNO<sub>3</sub> y NiSO<sub>4</sub> sobre OxPs-19 (resistente a STR), con de MIC de 25 y 140 µM, y AgNO<sub>3</sub> y NiSO<sub>4</sub> sobre 152589 (resistente a ISO), con de MIC de 25 y 160 µM, respectivamente.

Las sales de AgNO<sub>3</sub> y NiSO<sub>4</sub> presentaron mejores efectos de inhibición sobre OxPs-22 (multifarmacorresistente), 40 y 200 µM, respectivamente.

Se sabe que el cobre es capaz de participar en la Reacción de Fenton con el peróxido de hidrogeno, un producto endógeno de la respiración aeróbica, para generar radicales de hidroxilo<sup>71</sup>. Los radicales de hidroxilo reaccionan con muchas biomoléculas incluyendo, el DNA, los lípidos de membrana y enzimas generando daños a las células en *M. tuberculosis*. Por otra parte la toxicidad del níquel es debida a que este desplaza otros cationes que funcionan como cofactores en las enzimas, y debido a esto bloquean su actividad<sup>72</sup>.

En general, los mejores resultados se obtuvieron con las sales de AgNO<sub>3</sub>, tanto para la cepa de referencia (H<sub>37</sub>Rv) como para los aislados mono-resistentes y multifarmacorresistente, siendo las MIC 20, 25 y 40 µg/ml, respectivamente. Ha

sido reportado que la plata interrumpe múltiples procesos celulares en las bacterias, donde se incluye formación de enlaces disulfuro, homeostasis del hierro e interrupción del metabolismo, estos cambios conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno e incremento en la permeabilidad de la membrana, lo cual lleva a la muerte de la célula<sup>73</sup>.

#### 4.5 Pruebas combinatorias

Al igual que los procedimientos para evaluar la susceptibilidad individual de los fármacos, existen pruebas para determinar el efecto de sus combinaciones. Para ello, uno de los métodos de laboratorio más utilizados es el tablero de damas o checkerboard<sup>74</sup>.

Las sales que mostraron mejor actividad inhibitoria (en ensayos independientes) y el fármaco al que dicho aislado había sido resistente (Tabla 12), fueron combinados mediante ensayos checkerboard. Con la finalidad de encontrar una combinación que por debajo de la MIC del fármaco o de las sales de metal o de ambos, consiguiera inhibir a *M. tuberculosis*.

Tabla 12.  
Metales con mayor inhibición sobre aislados de *M. tuberculosis*

Aislado	Fármaco al que presenta resistencia (MIC)	Metales con mayor inhibición (MIC)
H <sub>37</sub> Rv	Sensible a Fármacos	
OxPs-4	RIF 2.0 µg/ml	AgNO <sub>3</sub> 25 µM CuSO <sub>4</sub> 200 µM
OxPs-19	STR 4.0 µg/ml	AgNO <sub>3</sub> 25 µM NiSO <sub>4</sub> 140 µM
152589	ISO 0.25 µg/ml	AgNO <sub>3</sub> 25 µM NiSO <sub>4</sub> 160 µM
OxPs-22	STR 4.0 µg/ml ISO 1.0 µg/ml RIF 2.0 µg/ml ETA 8.0 µg/ml	AgNO <sub>3</sub> 40 µM NiSO <sub>4</sub> 200 µM

Las sales de metal AgNO<sub>3</sub> y CuSO<sub>4</sub> presentaron mayor efecto de inhibición sobre OxPs-4 (resistente a RIF), por lo cual los ensayos checkerboard evaluados fueron RIF y AgNO<sub>3</sub>, RIF y CuSO<sub>4</sub>. AgNO<sub>3</sub> y NiSO<sub>4</sub> tuvieron mayor efecto de inhibición sobre OxPs-19 (resistente a STR) por lo que los ensayos checkerboard

evaluados fueron STR y  $\text{AgNO}_3$ , STR y  $\text{NiSO}_4$ .  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NiSO}_4$  tuvieron mayor efecto de inhibición sobre 152589 (resistente a ISO) por lo que los ensayos checkerboard evaluados fueron ISO y  $\text{AgNO}_3$ , ISO y  $\text{NiSO}_4$  (Figura 20).

Las sales de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NiSO}_4$  presentaron mejores efectos de inhibición sobre OxPs-22 (multifarmacorresistente), por lo que los ensayos checkerboard evaluados fueron STR y  $\text{AgNO}_3$ , STR y  $\text{NiSO}_4$ , ISO y  $\text{AgNO}_3$ , ISO y  $\text{NiSO}_4$ , RIF y  $\text{AgNO}_3$ , RIF y  $\text{NiSO}_4$ , ETA y  $\text{AgNO}_3$ , ETA y  $\text{NiSO}_4$  (Figura 21).



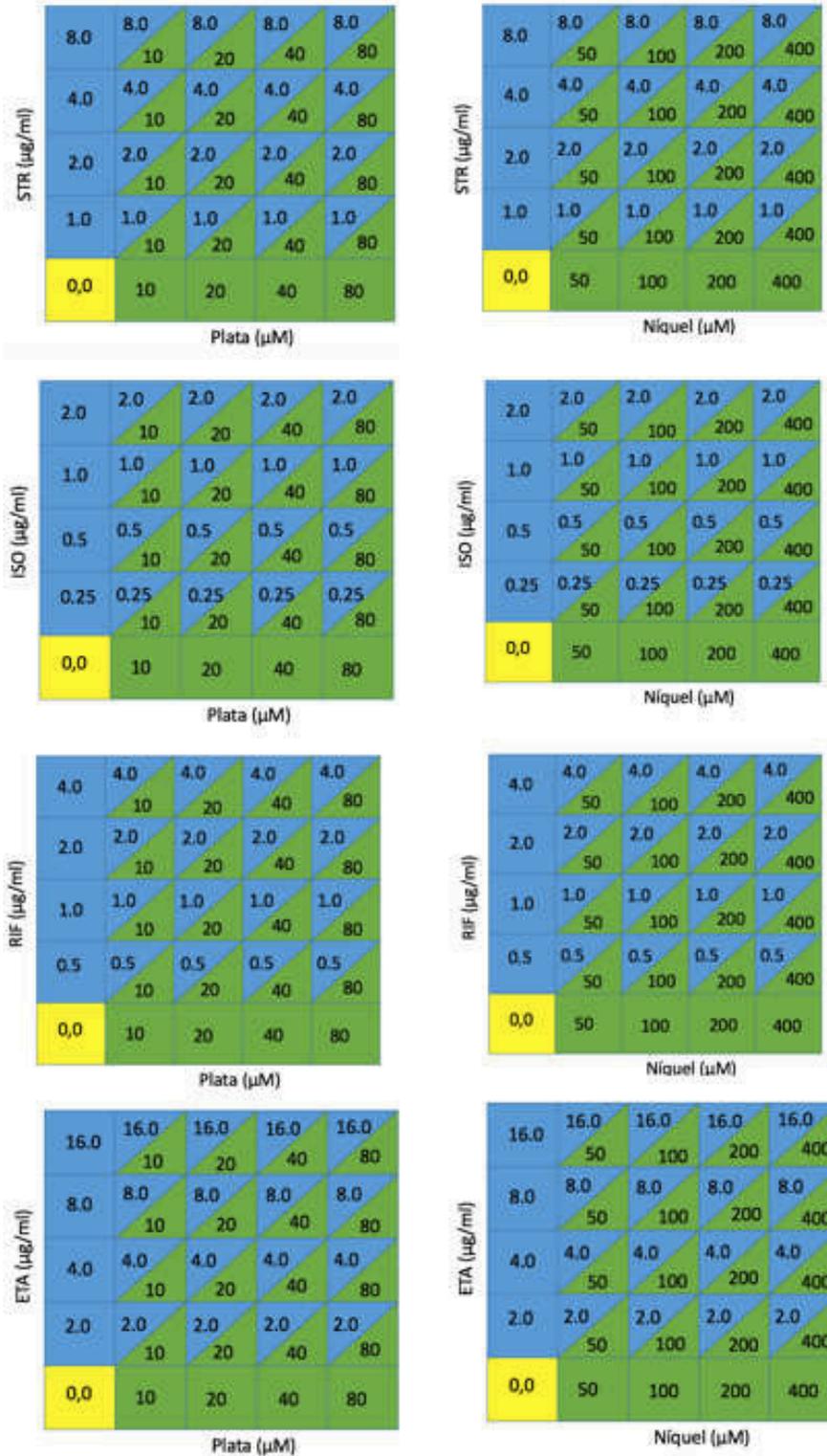


Figura 21. Esquema de ensayos checkerboard realizados en OxPs-22. El recuadro azul corresponde a pocillos con fármaco, el recuadro verde corresponde a pocillos con sales de metal, los recuadros azul-verde corresponden a combinaciones, el recuadro amarillos corresponde a 0

metal y 0 fármaco. Los números dentro de cada recuadro corresponden a las concentraciones de fármaco y sales.

Los resultados obtenidos para el aislado OxPs-22, cepa que corresponde a perfil de multifarmacoresistencia, se observan en la Figura 22, la cual muestra que no hubo inhibición de la viabilidad celular al ser combinados los metales con los fármacos.

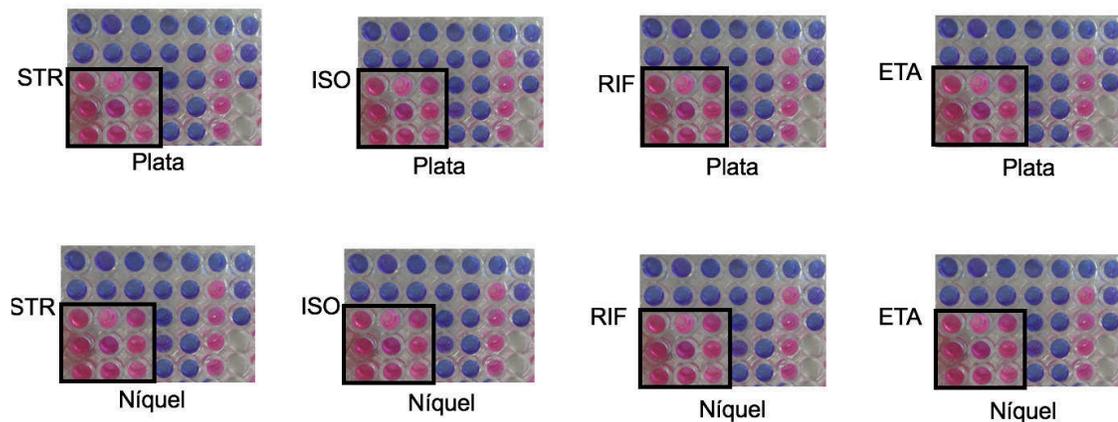


Figura 22. Ensayos checkerboard en OsPs-22.  
Recuadros negros muestran el área combinatoria de interes

Los resultados obtenidos para los aislados OxPs-4 ,OxPs-19 y 152589, cepas que corresponden a perfil de monoresistencia a fármacos de primera línea, se observan en la Figura 23, la cual muestra que no hubo inhibición de la viabilidad celular al ser combinados los metales con los fármacos para los aislados OxPs-4 ,OxPs-19. Mientras que la combinación ISO y plata mostró inhibir la viabilidad celular al disminuir a la mitad la cantidad de ISO y plata, respectivamente, a la que son activos individualmente, esto para la cepa 152589.

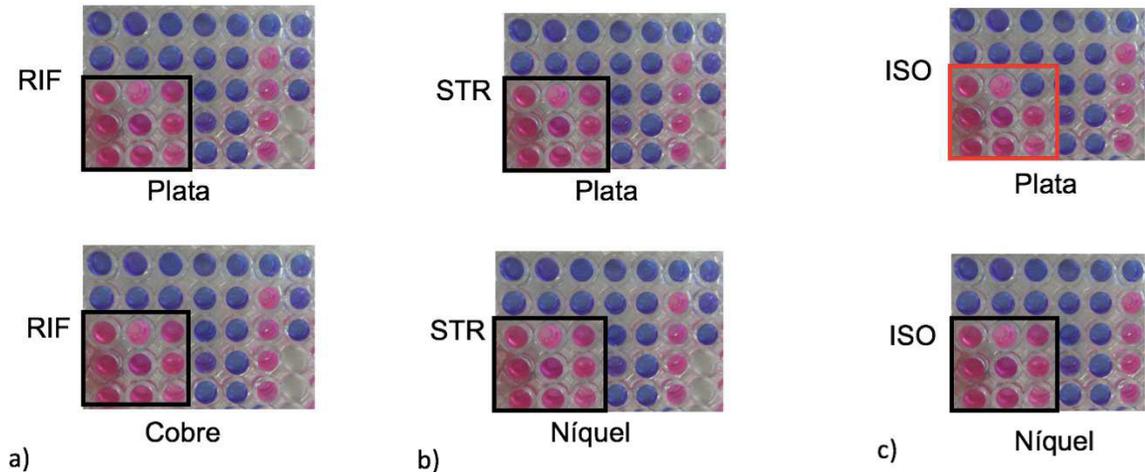
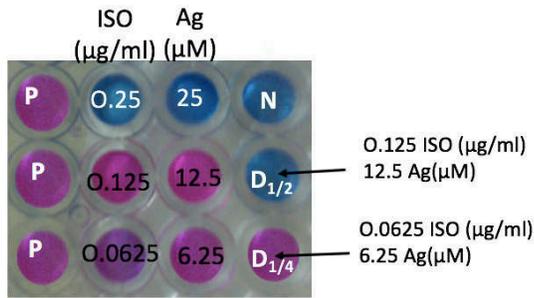


Figura 23. Ensayos checkerboard a) OxPs-4 b) OxPs-19 c) 152589  
 Recuadros negros muestran área combinatoria de interes. Recuadro rojo muestran área combinatoria ISO-Ag que logró inhibir la viabilidad celular, al disminuir la concentración al 50% de MIC por la cual son activos la ISO y la Ag individualmente.

Se sabe que la plata afecta la permeabilidad de la membrana bacteriana, mientras que la isoniacida es un fármaco que necesita ser activado por una catalasa de la bacteria, la forma activa actúa inhibiendo la síntesis de ácido micólico en la pared de la micobacteria<sup>75</sup>. Desde hace más de 50 años se estudian cuidadosamente los mecanismos de la acción combinada; sin embargo, no todos están esclarecidos. El mecanismo por el cual la combinación ISO y plata tiene efecto en la viabilidad celular del aislado 152589 el cual es resistente a ISO no está dilucidado.

La combinación ISO-plata presento efecto al disminuir a la mitad la MIC de ISO y Ag a la que son activos individualmente en el aislado 152589, pero no se observó el mismo comportamiento al diluir a la cuarta parte la MIC a la que son activos. Esta misma metodología fue llevada a cabo para H<sub>37</sub>Rv. Observándose que ambas cepas mostraron el mismo comportamiento (Figura 24).

**Combinación ISO-Plata sobre 152589**



**Combinación ISO-Plata sobre H<sub>37</sub>Rv**

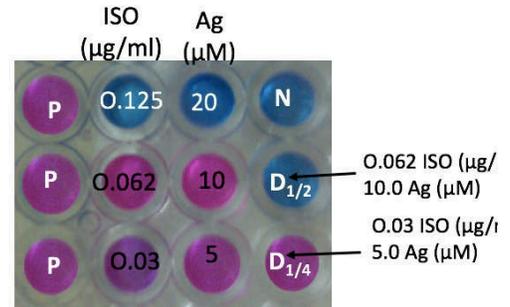


Figura 24. Combinación isoniacida-plata sobre 152589 y H<sub>37</sub>Rv  
ISO= isoniacida, Ag= plata, P= control de crecimiento positivo, N=control de crecimiento negativo,  $D_{1/2}$  = dilución  $1/2$  de la MIC  $D_{1/4}$  = dilución  $1/4$  de la MIC

La interpretación de los resultados se realizó a través del cálculo del índice de la concentración fraccionaria inhibitoria ( $\sum\text{CFI}$ ) según la siguiente fórmula:

$$\sum \text{CFI} = \frac{\text{CMI de A}_1 \text{ en combinación con A}_2}{\text{CMI A}_1 \text{ solo}} + \frac{\text{CMI de A}_2 \text{ en combinación con A}_1}{\text{CMI A}_2 \text{ solo}}$$

Se consideró: sinergismo si  $\sum \text{CFI} < 0,5$

adición si  $\sum \text{CFI} = 1$

antagonismo si  $\sum \text{CFI}$  está entre 2 ó 4

Tomando como referencia los criterios propuestos por Berenbaum *et al.*, 2007 y señalados posteriormente por Eliopoulos *et al.*,

Se realizaron los cálculos necesarios de  $\sum\text{CFI}$  para H<sub>37</sub>Rv y 152589 mostrados en la Tabla.13. Obteniendo que para ambas cepas el efecto es considerado aditivo y no sinérgico como se había planteado en la hipótesis. Los efectos en la actividad combinada de dos antimicrobianos pueden ser:

- a) Adicción= la actividad de los dos antimicrobianos es aproximadamente la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.
- b) Sinergismo: la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente mayor que la adicción de las actividades de los dos antimicrobianos separados.
- c) Antagonismo: la actividad de los dos antimicrobianos juntos es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados<sup>76</sup>.

Tabla 13.  
Combinación ISO-plata sobre *M. tuberculosis*

	MIC ISO	MIC Ag	Combinación ISO-Ag		$\Sigma$ CFI
152589	0.25 µg/ml	25 µM	0.125 µg/ml	- 12.5 µM	1
H <sub>37</sub> Rv	0.125 µg/ml	20 µM	0.062 µg/ml	- 10.0 µM	1

Berenbaum *et al.*, 2007 mencionan que la demostración del sinergismo entre los tratamientos a evaluar requiere que el efecto de la combinación sea significativamente mayor que el resultado individual de cada uno, lo cual equivale a que la CMI de ambos fármacos disminuya en la combinación al menos 2 diluciones (1/4)<sup>77</sup>. Lo cual no ocurre con los resultados obtenidos de la  $\Sigma$ CFI de H<sub>37</sub>Rv y 152589.

Cabe destacar que aunque no se haya observado efecto sinérgico en combinación ISO-Ag, la disminución de la dosis de ISO al combinarse con Ag podría ayudar a disminuir los efectos secundarios, además de tener efecto inhibitorio de la viabilidad contra cepas resistentes a ISO.

Finalmente se evaluó si el efecto combinatorio de ISO-Ag era inhibitorio o bactericida. Debido a que la resazurina es poco tóxica para las células ya que la

resorufina se difunde al medio e inicialmente al no concentrarse al interior de la célula no induce muerte<sup>78</sup>. Esto permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero. Lo cual fue una ventaja en el uso de la técnica MABA, ya que posteriormente a la evaluación de prueba combinatoria, se tomó una muestra de la combinación ISO-Ag que había tenido efecto de inhibición de crecimiento, la cual fue colocada en medio Löwestein Jensen y Middlebrook 7H9, durante 8 semanas. No se observó crecimiento de *M. tuberculosis* posterior a la incubación, lo cual indica que el efecto de la combinación ISO-Ag fue bactericida.

## CAPITULO 5

### 5. CONCLUSIONES

Se reactivaron 12 aislados clínicos de *M. tuberculosis* del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas y *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC) como cepa de referencia, los cuales se identificaron mediante pruebas bioquímicas de producción de Niacina (+) y reducción de nitratos (+).

Se determinó la sensibilidad a ISO, RIF, EMB y STR mediante el método estándar de las proporciones (método indirecto en medio de Lowenstein-Jensen). Obteniendo 4 aislados resistentes: OxPs-4 resistente a RIF, OxPs-19 resistente a STR, 152589 resistente a ISO y OxPs-22 resistente a ISO, RIF, EMB y STR. Se determinaron las MIC para INH, RIF, EMB y STR mediante MABA. Los resultados obtenidos mediante este método fueron acordes a los obtenidos con el método de porcentaje de resistencia: OxPs-4 resistente a RIF con una MIC de 2.0 µg/ml, OxPs-19 resistente a STR con una MIC de 4.0 µg/ml, 152589 resistente a ISO con una MIC de 0.25 µg/ml y OxPs-22 resistente a STR, ISO, RIF, ETA, con MIC de 4.0 µg/ml, 1.0 µg/ml, 2.0 µg/ml y 8 µg/ml, respectivamente.

Se determinó que los aislados clínicos OxPs-19 y 152589 con perfil fenotípico de monoresistencia a STR y ISO, respectivamente, mostraron mayor resistencia a sales de AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> respecto a la cepa H<sub>37</sub>Rv, mientras que a NiSO<sub>4</sub> estos mismos aislados mostraron mayor sensibilidad que H<sub>37</sub>Rv. Los aislados clínicos OxPs-4 y OxPs-22 mostraron mayor resistencia a las sales evaluadas (AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>) respecto a la cepa H<sub>37</sub>Rv.

Se determinó que las sales que presentaron las mejores inhibiciones sobre la cepa sensible a fármacos de primera línea (H<sub>37</sub>Rv), fueron: AgNO<sub>3</sub> y CuSO<sub>4</sub> con MIC de 20 y 35 µM, respectivamente. Sobre los aislados monoresistentes las sales que presentaron los mejores resultados, fueron: AgNO<sub>3</sub> y CuSO<sub>4</sub> sobre

OxPs-4 (resistente a RIF), con MIC de 25 y 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NiSO}_4$  sobre OxPs-19 (resistente a STR), con de MIC de 25 y 140  $\mu\text{M}$ ,  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NiSO}_4$  sobre 152589 (resistente a ISO), con de MIC de 25 y 160  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Mientras que las sales de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NiSO}_4$  presentaron mejores efectos de inhibición sobre OxPs-22 (multifarmacorresistente), con MIC de 40 y 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Las sales de  $\text{AgNO}_3$ , tanto para la cepa H<sub>37</sub>Rv como para los aislados monoresistentes y multifarmacorresistente mostraron mayor inhibición bacteriana, siendo las MIC 20, 25 y 40  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

La combinación ISO-plata presentó efecto aditivo sobre *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* resistente a ISO, al disminuir al 50% la MIC a la cual presentan su efecto individualmente.

El efecto de la combinación ISO-plata que presento *M. tuberculosis* resistente a isoniacida y *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv fue bactericida.

## CAPITULO 6

### 1. BIBLIOGRAFÍA

1. Rowland J, Niederweis M. (2013). A Multicopper Oxidase Is Required for Copper Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 195 (16):3724–3733.
2. Khursheed A, Sourabh D, Ameer A, Quaiser S, Mansour S, Abdulaziz A, Javed M. (2016). Aloe vera extract functionalized zinc oxide nanoparticles as nanoantibiotics against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *Journal of Colloid and Interface Science*. 472:145–156.
3. Andries K, Vilellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T. (2014). Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Bedaquiline. *PLOS ONE*. 9(7):102-135.
4. Horvati K, Bacsa B, Szabo N, Fodor K, Balka ,Rusvai M, Kiss E. (2015). Antimycobacterial activity of peptide conjugates of pyridopyrimidine derivative against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of in vitro and in vivo models. *Tuberculosis*. 95:207-211.
5. Saifullah B, Hussein M, Hussein S, Arulselvan P, Fakurazi S. (2013). Antituberculosis nanodelivery system with controlled-release properties based on para-amino salicylate–zinc aluminum-layered double-hydroxide nanocomposites. *Drug Design, Development and Therapy*. 7:1365–1375.
6. Patil B, Taranath T. (2016). *Limonia acidissima* L. leaf mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles: A potent tool against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology*. 5:197–204.
7. Machado I, Biancolino L, Demoro B, Echeverría G, Piro O , Leite C , Pavan F. (2014). Bioactivity of pyridine-2-thiolato-1-oxide metal complexes: Bi(III),Fe(III) and Ga(III) complexes as potent anti-*Mycobacterium tuberculosis* prospective agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 87:267e273.
8. Cheon S, Cho H, Kim J, Lee J, Kim H, Park T. (2016). Recent tuberculosis diagnosis toward the end TB strategy. *Journal of Microbiological Methods* 123:51–61.
9. Hoffman A, DeStefano M, Shoen C, Gopinath K, Warner D, Cynamon M. (2013). Co(II) and Cu(II) pyrophosphate complexes have selectivity and potency against *Mycobacteria* including *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 70:589e593.

10. Coll P. (2009). Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(8):474–480.
11. Shi X, Darwin k. (2015). Copper Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Metallomics*. 7(6): 929–934.
12. Torres A, Aponte L, Soto C. (2015). CtpA, a putative *Mycobacterium tuberculosis* P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *Biometals*. 7(2): 123-128.
13. Dalecki A, Haeili M, Shah S, Speer A, Niederweis M, Kutsch O, Wolschendorf F. (2012). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(8):4835-4844.
14. Rustomjee R, Zumla A. (2015). Delamanid expanded access novel treatment of drug resistant tuberculosis. *Infection and Drug Resistance*. 8:359–366.
15. Surineni G, Yogeewari P, Sriram D, Kantevari S. (2014). Design and synthesis of novel carbazole tethered pyrrole derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 25:485–491.
16. Manning T, Plummer S, Baker T, Wylie G, Clingenpeel A, Phillips D. (2015). Development of a three component complex to increase isoniazid efficacy against isoniazid resistant and nonresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 7(3): 156-163.
17. Wells RM, Jones CM, Xi Z, Speer A, Danilchanka O. (2013) Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathogens*. 9(1):100-112.
18. Grobler A, Sierra Z, Viljoen H. (2016). Modeling nanoparticle delivery of TB drugs to granulomas. *Journal of Theoretical Biology*. 388:85–95.
19. Bajaksouzian S, visalli M, Jacobs M, Appelbaum P. (1997). Activities of Levofloxacin, Ofloxacin, and Ciprofloxacin, Alone and in Combination with Amikacin, against *Acinetobacters* as Determined by Checkerboard and Time Kill Studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 41(5):1073–1076.
20. Marra A, Lamb L, Medina I, George D, Gibson G, Hardink J, Rugg J, Van Deusen J. (2012). Effect of Linezolid on the 50% Lethal Dose and 50% Protective Dose in Treatment of Infections by Gram-Negative Pathogens in Naive and Immunosuppressed Mice and on the Efficacy of Ciprofloxacin in an Acute Murine Model of Septicemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(9):4671–4675.
21. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I.(2004). Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(1):140–143.

22. Dos Santos Lima D, do Nascimento M, Vitali L, Martinez R. (2013). *In vitro* activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46(3):299-303.
23. Djoko KY, Goytia MM, Donnelly PS, Schembri MA, Shafer WM, McEwan AG. (2015). Copper(II)-bis(thiosemicarbazonato) complexes as antibacterial agents: insights into their mode of action and potential as therapeutics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59:6444–6453.
24. Lemire J, Harrison J, Turner R. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature*. 84(5): 345-360
25. Luna-Herrera J, Martinez-Cabrera G, Parra-Maldonado R, Enciso-Moreno J, Torres-Lopez J, Quesada-Pascual F, Delgadillo-Polanco R, Franzblau S. (2003). Use of Receiver Operating Characteristic Curves to Assess the Performance of a Microdilution Assay for Determination of Drug Susceptibility of Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Clinical Microbiology*. 22:21–27
26. Stafford S, Bokil N, Achard M, Kapetanovic R, Schembri M, McEwan A, Sweet M. (2013). Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports*. 33:541-554.
27. Mandewale M, Thorat B, Shelke D, Yamgar R. (2015). Synthesis and Biological Evaluation of New Hydrazone Derivatives of Quinoline and Their Cu(II) and Zn(II) Complexes against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 8(4):112-128.
28. Rodríguez GM, Neyrolles O. (2014). Metallobiology of tuberculosis. *Microbiology Spectrum* 2(3):117-123.
29. Neyrolles O, Wolschendorf F, Mitra A, Niederweis M. (2015). *Mycobacteria*, metals, and the macrophage. *Immunological Reviews*. 264: 249–263.
30. Lemmer Y, Kalombo L, DeanPietersen R. (2015). Mycolic acids, a promising mycobacterial ligand for targeting of nanoencapsulated drugs in tuberculosis. *Journal of Controlled Release* 211:94–104.
31. Speer A, Rowland J, Haeili M, Niederweis M, Wolschendorf F. (2013). Porins Increase Copper Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 195(22):5133–5140.
32. Silveira N, Longuinho M, Leitão S, Silva R, Lourenço M, Silva P, Pinto M, Abraçado L. (2015). Synthesis and characterization of the antitubercular phenazine lapazine and development of PLGA and PCL nanoparticles for its entrapment. *Materials Science and Engineering*. 58:458–466.
33. Singh R, Nawale L, Arkile M, Wadhvani S. (2016). Phytogetic silver, gold, and bimetallic nanoparticles as novel antitubercular agents. *International Journal of Nanomedicine* 11:1889-1897.

34. Manning T, Mikula R, Wylie G, Phillips D, Jarvis J, Zhang F. (2014). Structural measurements and cell line studies of the copper-PEG-Rifampicin complex against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 25: 451–458.
35. Wolschendorfa F, Ackartb D, Shresthac T, Doveb L, Noland S, Lamichhaned G, Wang Y. (2010). Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS translocating virulence protein*. 108(4):1621–1626.
36. Neyrolles O, Mintz E, Catty P. (2013). Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3(89):1-4.
37. Stapleton B, Walker L, Logan T. (2012). Zn(II) Stimulation of Fe(II)-Activated Repression in the Iron - Dependent Repressor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. 52:1927–1938.
38. Botella H, Peyron P, Levillain F. (2011). Mycobacterial P1-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell Host & Microbe*. 10:248–259.
39. Vilchèze C, Hartman T, Weinrick B, Jacobs W. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nature Communications*. 4:1881.
40. Morones-Ramirez J, Winkler J, Spina C, Collins J. (2013). Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-negative Bacteria. *Science Translational Medicine*. 5(190):180-191.
41. Arenas R,(2015). *Dermatología: atlas, diagnóstico y tratamiento*, 6ª ED. MCGRAW-HILL, Capítulo 29.
42. Horváti K, Bacsá B, Kiss E, Gyulai G. (2014). Nanoparticle encapsulated lipopeptide conjugate of antitubercular drug isoniazid: *in vitro* intracellular activity and *in vivo* efficacy in a guinea pig model of tuberculosis. *Bioconjugate chemistry*. 7(2):119-129.
43. Pal R, Hameed S, Fatima Z. Iron Deprivation Affects Drug Susceptibilities of Mycobacteria Targeting Membrane Integrity. *Journal of Pathogens*. 20(2):456-460.
44. Iglesia A, Morbidoni R. (2006). Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniácida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Revista Argentina de Microbiología* (2006) 38: 97-109.
45. Pagliotto A, Ferracioli K, Lopes M, Baldin V. (2015). Anti *Mycobacterium tuberculosis* activity of antituberculosis drugs and amoxicillin/ clavulanate

- combination. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 20(4):123-130.
46. Silva P, Oliveira H, Silva J, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Fusco-Almeida A, Mendes-Giannini M. (2013). Microplate alamarBlue Assay for *Paracoccidioides* Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(4):1250–1252.
  47. Dalecki AG, Haeili M, Shah S, Speer A, Niederweis M, Kutsch O, Wolschendorf F. (2015). Disulfiram and copper ions kill *Mycobacterium tuberculosis* in a synergistic manner. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59:4835–4844.
  48. Wells RM, Jones CM, Xi Z, Speer A, Danilchanka O, et al. (2013) Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathogens*. 9(1):1-12
  49. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández de Larrea C, Rivas-Santiago B. (2008). Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. *Investigación Clínica*.49(3):411-441.
  50. Müller B, Dürr S, Alonso S. (2013). Zoonotic *Mycobacterium bovis* – induced Tuberculosis in Humans. *Emerging Infectious Disease*.19(6):899-908.
  51. Shojaei TR, Mohd Salleh MA, Tabatabaei M.(2014) Development of sandwich-form biosensor to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical sputum specimens. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.18(6):600-608.
  52. Mike Brennan, Cobelens F, Lanfranchi B, et al.(2011) An International Roadmap for Tuberculosis Research: towards a world free of tuberculosis. *WHO*. 1-80.
  53. Dorronsoro, I., & Torroba, L.. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 30:67-85
  54. Machado I, Marino LB, Demoro B.(2014) Bioactivity of pyridine-2-thiolato-1-oxide metal complexes: Bi(III), Fe(III) and Ga(III) complexes as potent anti-*Mycobacterium tuberculosis* prospective agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 87:267-273.
  55. Neyrolles O, Mintz E, Catty P. (2013). Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3(89):1-4.
  56. Cheon S, Cho H, Kim J, Lee J, Kim H, Park T. (2016). Recent tuberculosis diagnosis toward the end TB strategy. *Journal of Microbiological Methods* 123:51–61.

57. Brown B, Zhao, X, Chait A, Fisher LI. (2001). Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *The New England Journal of Medicine*. 345: 1583-1592
58. Fernández FA, Moreno JE, González J, Palacios JJ, (2005) *Micobacterias. Procedimientos en Microbiología Clínica. Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*. Pp 2-6
59. Borda Bossana de Texidor D., Texidor C., Domenech de Kwint M. C., Volpe de Molina E. y Pasquinelli E. (1977). Nuevo Método Sencillo y Económico para Facilitar el Cultivo del Bacilo Tuberculoso, *Revista Argentina de Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares*. 38: 18 34.
60. Collins LA, Franzeblau SG. (1997). Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 41:1004 –1009.
61. Dixit P, Singh U, Sharma P, Jain A. (2012). Evaluation of nitrate reduction assay, resazurin microtiter assay and microscopic observation drug susceptibility assay for first line antitubercular drug susceptibility testing of clinical isolates of *M. tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods* 88:122–126.
62. Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, Babst A, Hadley WK. (1995). Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 33:2324 –2327.
63. Mackay ML, Milne K, Gould IM. (2000). Comparison of method for assessing synergic antibiotics interactions. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 15:125-9.
64. Lambert RJ, Lambert R. (2003). A model for the efficacy of combined inhibitors. *Journal of Applied Microbiology*. 95:734-43.
65. Grzybowska W, Banaszczyk-Ru M, Wójcik A, Tyski S. (2004). Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined. *Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia*. 56:391-403.
66. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*. CLSI.
67. Berenbaum MC. (2007). A method for testing the synergy with any number of agents. *The Journal of Infectious Diseases*. 137:122-30.
68. Eliopoulos GM. (2009) Synergism and antagonism. *Infectious Disease Clinics of North America*. 3:399-406.
69. 12. Johnson KB, Oski FA. (1997) Evaluation and use of laboratory test. En: *Oski's Essential Pediatrics*. Lippincott-Raven Publishers. 7:649-52.
70. Grzybowska W, Banaszczyk-Ru, Tyski S. (2005). Comparison of the checkerboard and E-test methods used for the analysis of two antibiotics combination. *Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia*. 57:65-75.
71. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. (2002). Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 44:363-6.
72. Kiffer CRV, Sampaio JLM, Sinto S, Oplustil CP, Koga PCM, Arruda AC,

- (2005). In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *A. baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 52:317-22.
73. Tasaka K, Ishida A, Chinzei T. (2002). Antimicrobial activity of carbapenems and the combined effect with aminoglycoside against recent clinical isolates of *P. aeruginosa*. *The Japanese Journal of Antibiotics*. 55:181-6.
74. Snyderman DR, McDermott LA, Jacobus NV. (2005) Evaluation of in vitro interaction of Daptomycin with Gentamicin or beta-lactam antibiotics against *S. aureus* and enterococci by FIC index and timed-kill curves. *Journal of Chemotherapy*. 17:614-21.
75. Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. y Bullock, P. (2004). Comparison of Alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*. 18: 703-710.
76. Lieberman, M., Patterson, G., Moore, R. (2001). In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. *Cancer letter*. 173: 21-29.
77. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D. *et al.* (1990) . New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 82: 1107-1112.
78. Slater, K. (2001). Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 70-74.

## ANEXOS

### a) Tinción Ziehl-Neelsen

#### 1. Solución Fuscina básica 3%

##### Reactivos

Solución Fuscina básica.....3.0 g  
Alcohol etílico de 95..... 100 ml

##### Procedimiento

Disolver por agitación en un matraz aforado agregando lentamente alcohol

#### 2. Solución de Fenol

##### Reactivos

Fenol en cristales.....100 g  
Agua destilada.....100 ml

##### Procedimiento

Calentar en baño maría la disolución completa de los cristales de fenol y dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar agua destilada hasta completar 1 L y dejar reposar por 24 horas. Filtrar la solución de fenol acuoso una vez por semana.

#### 3. Solución Fucsina fenicada

##### Procedimiento

Mezclar 100 ml de solución de Fuscina al 3% con 55 ml de la solución de fenol.

#### 4. Azul de metileno 1%

##### Reactivos

Azul de metileno.....	1 g
Alcohol etílico de 95%.....	100 ml
Agua destilada.....	900 ml

##### Procedimiento

Disolver por agitación y agregar agua destilada hasta completar 1 L. Filtrar la solución.

#### 5. Ácido-Alcohol (Solución decolorante al 3%)

##### Reactivos

Ácido clorhídrico.....	30 ml
Alcohol etílico de 95.....	970 ml

##### Procedimiento

Dejar escurrir lentamente el ácido clorhídrico por las paredes del matraz que contiene los 30 ml de etanol. Agitar suavemente.

#### b) Pruebas bioquímicas

##### 1. Solución de nitrato de sodio 0.01M en buffer fosfato 0.022 M, pH7

###### 1.1 Buffer de fosfatos 0.022 M

##### Solución 1

##### Reactivos

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	3.02 g
Agua destilada.....	1000 mL

##### Procedimiento

Disolver el fosfato de potasio en agua destilada (solución 0.022 M)

## 1.2 Solución 2

### Reactivos

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>.....3.16 g

Agua destilada.....1000 ml

### Procedimiento

Disolver el fosfato de sodio en agua destilada (solución 0.022 M )

## 1.3 Solución 3

### Procedimiento

Agregar 611 ml de la solución 2 a 389 ml de la solución 1 y mezclar bien, ajustar el pH a 7

## 1.4 Sustrato de nitrato de sodio en buffer de fosfatos

### Reactivos

NaNO<sub>3</sub> .....0.85 g

Solución 3.....1000 ml

### Procedimiento

Disolver el nitrato de sodio en el buffer, esterilizar por autoclaveado a 121 °C durante 15 minutos.

## 2. Producción de niacina

### 2.1 Solución de anilina 4%

#### Reactivos

Anilina, fresca, clara, incolora.....4 ml

Etanol 95 %.....96 ml

#### Procedimiento

Mezclar la anilina con el etanol en una botella color ámbar y conservar a oscuras y en la heladera, descartar la solución si cambia a color amarillo.

Nota:

La anilina es oncogénica y penetra a través de la piel, trabajar con guantes y cuidadosamente.

La anilina cambia de color por exposición al aire y a la luz, preparar solución fresca cuando sea necesario.

## 2.2 Solución de bromuro de cianógeno 10 %

Reactivos

Bromuro de cianógeno, cristales.....5 g

Agua destilada.....50 ml

Procedimiento

Colocar los cristales de bromuro de cianógeno con el agua destilada en un vaso de vidrio, tapar y dejar bajo campana a temperatura ambiente hasta disolución de los mismos, aproximadamente 24 horas. No calentar la solución con mechero Bunsen. Colocar dentro de un frasco de colocar ámbar y mantener en el refrigerador. Calentar a temperatura ambiente para disolver cualquier precipitado formado por el enfriamiento.

Notas:

Preparar pequeñas cantidades porque el bromuro de cianógeno es volátil y pierde potencia a través del tiempo. Soluciones débiles pueden llegar a dar resultado falso-negativo.

El bromuro de cianógeno es tóxico y severo irritante de las mucosas cuando es inhalado, trabajar en ambiente ventilado cuando se prepara la solución.

En solución ácida el bromuro de cianógeno se hidroliza a ácido cianhídrico el que es extremadamente tóxico, cuando se descartan todos los tubos de la reacción, agregar previamente una solución desinfectante alcalina.

### 3. Reducción de Nitrato

#### 3.1 Solución de ácido clorhídrico

##### Reactivos

Ácido clorhídrico concentrado.....10 ml

Agua destilada.....10 ml

##### Procedimiento

Agregar lentamente el ácido clorhídrico al agua destilada, nunca a la inversa para obtener una solución 1:1. Mantener en un frasco color ámbar, en la oscuridad, en refrigeración.

#### 3.2 Solución de sulfanilamida al 0.2 %

##### Reactivos

Sulfanilamida.....0.2 g

Agua destilada.....100 ml

##### Procedimiento

Disolver la sulfanilamida en agua destilada y mantener en un frasco color ámbar, en la oscuridad, en la heladera.

#### 3.3 Solución de N-naftiletildiamina 0.1 %

##### Reactivos

naftiletildiamina.....0.1 g

Agua destilada.....100 mL

##### Procedimiento

Disolver la N-naftiletildiamina en agua destilada y conservar en frasco color ámbar en la oscuridad, en la heladera.

#### c) Medio Löwestein-Jensen

##### Reactivos

Medio Löwestein-Jensen.....37.7 g

Agua destilada.....	588 ml
Glicerol .....	12ml
Huevo.....	1000 ml

### Procedimiento

1. Suspender 37.7 g de polvo del medio en 600 ml de agua destilada, la cual contiene 12 ml de glicerol, esterilice en autoclave a 121°C por 15 min enfríe a aproximadamente 50 C.
2. Mientras tanto prepare 1000 ml de huevo mezclado perfectamente (ver nota 1)
3. Vaciar los huevos homogenizados en el matraz que contiene el medio
4. Mezclar bien agitando el matraz y dejar reposar para que las burbujas de aire contenidas en el medio asciendan a la superficie y se eliminen.
5. Mezcle la base y el huevo suavemente hasta obtener una mezcla libre de burbujas.
6. Distribuya en tubos estériles con tapón de rosca, coloque los tubos en posición inclinada y coagule a 85 C por 45 minutos. La superficie del método debe tener un color verde-azul claro.
7. Una vez a temperatura ambiente llevarlos a la cámara de cultivos a 37°C dejándolos durante 48 horas para evaluar su esterilización. Posteriormente se conservan en refrigeración a 4°C, el tiempo máximo de conservación en tales circunstancias será de dos meses.

### Nota 1:

Los huevos se limpian cuidadosamente con un cepillo, agua y jabón y se dejan pocos minutos en agua jabonosa. Se enjuagan con agua corriente y se limpian con una gasa embebida en alcohol de 70 C. Con las manos bien lavadas, quebrar los huevos uno a uno en un vaso estéril. Vaciar un litro de huevos en un vaso de licuadora y homogenizar durante algunos segundos. Todo el material debe estar estéril.

#### d) Prueba de sensibilidad a fármacos

##### 1. Preparación de soluciones madre de fármacos

En la tabla 11 se indica el tipo de solvente y la cantidad de fármaco que hay que pesar para preparar las soluciones.

Tabla 14.  
Preparación de soluciones madre de fármacos de primera línea

Fármaco	Solvente	mg de fármaco para 10 ml de solvente	concentración final del fármaco ( $\mu\text{l/ml}$ )
STR	Agua destilada	55 mg	5500
ISO	Agua destilada	20 mg	2000
RIF	Etanol al 95 %	42 mg	4200
ETA	Agua destilada	20 mg	2000

##### Procedimiento

Suspender la cantidad necesaria de cada fármaco en su respectivo solvente y mezclar. Las soluciones de los fármacos no requieren ser esterilizadas, pero hay que usar material estéril.

##### 2. Preparación de soluciones secundarias de fármacos

En la tabla 12 se detallan las diluciones secundarias requeridas a partir de la solución madre para alcanzar la concentración crítica con 1 ml de la dilución del fármaco para preparar 100 ml de medio de cultivo.

Tabla 15.  
Diluciones secundarias para alcanzar la concentración crítica

Fármaco	Disolvente de la solución madre (µl/ml)	ml de dilución para 100 ml de medio
STR	Dilución A 1:10, concentración 550 (µl/ml)	1
ISO	Dilución A 1:10, concentración 200 (µl/ml) Dilución B 1:10, concentración 20 (µl/ml)	1
RIF	Solución madre sin diluir	1
ETA	Dilución A 1:10, concentración 200 (µl/ml)	1

#### Procedimiento

Suspender la cantidad necesaria de cada solución madre en su respectivo solvente y mezclar.

### 3. Preparación de tubos con medio Löwestein-Jensen y fármacos

#### 3.1 Medio Löwestein-Jensen con STR (5.5 µl/ml)

##### Reactivos

Medio Löwestein-Jensen.....99 ml

Dilución A de STR.....1 ml

#### 3.2 Medio Löwestein-Jensen con ISO (0.2 µl/ml)

##### Reactivos

Medio Löwestein-Jensen.....99 ml

Dilución B de ISO.....1 ml

#### 3.3 Medio Löwestein-Jensen con RIF (42 µl/ml)

##### Reactivos

Medio Löwestein-Jensen.....99 ml  
Solución madre de RIF.....1 ml

#### 3.4 Medio Löwestein-Jensen con ETA (2 µl/ml)

##### Reactivos

Medio Löwestein-Jensen.....99 ml  
Dilución A de ETA.....1 ml

##### Procedimiento

1. Mezclar el medio Löwestein-Jensen con el fármaco correspondiente en condiciones asépticas
2. Distribuya en tubos estériles con tapón de rosca, coloque los tubos en posición inclinada y coagule a 85 C por 45 minutos. La superficie del método debe tener un color verde-azul claro.
3. Una vez a temperatura ambiente llevarlos a la cámara de cultivos a 37°C dejándolos durante 48 horas para evaluar su esterilidad. Posteriormente se conservan en refrigeración a 4°C, el tiempo máximo de conservación en tales circunstancias será de un mes.