



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

IMPLEMENTACIÓN Y  
ESTABLECIMIENTO DE UN PUNTO DE  
CORTE EN UN TEST DE WAYNE  
CUANTITATIVO PARA DETECTAR LA  
SUSCEPTIBILIDAD A PZA EN  
CULTIVOS MODS DE MUESTRAS DE  
ESPUTO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

EMILY MARISOL TOSCANO GUERRA

LIMA-PERÚ

2023



**ASESORA**

PhD. Patricia Sheen Cortavarría

**JURADO DE TESIS**

DR. DANIEL CLARK LEZA

PRESIDENTE

MG. DANIEL BLANCO VICTORIO

VOCAL

DR. PABLO TSUKAYAMA CISNEROS

SECRETARIO

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Luz Guerra y Bernardo Toscano, por su sacrificio, por su fortaleza y por enseñarme la perseverancia, a no rendirme y creer en mi misma. Son mi ejemplo a seguir.

A mi hermano Junior Toscano, porque es el símbolo de la fuerza y las ganas de salir adelante, porque demuestra al mundo que una discapacidad no es una incapacidad, es una oportunidad para superar lo inimaginable. Eres mi motor para seguir trabajando por ti y por mi familia.

A Arnau Bosch, porque has estado a mi lado estos años dándome ánimos y mostrándome que puedo ser más de lo que pienso que soy. Eres mi apoyo constante.

A toda mi familia, porque cada uno de ellos lucha sus propias batallas y han surgido desde abajo, con trabajo y esfuerzo. Siempre los tengo presentes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por el apoyo y el empuje para no desistir en mis metas.

A la Dra. Patricia Sheen y al Dr. Mirko Zimic, porque más que profesores han sido unos grandes mentores, no sólo para mí sino para todo el equipo. Gracias por todas las enseñanzas y el apoyo brindado.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática, por cada uno de los días en los que me brindaron su apoyo y su amistad, pero sobre todo porque sin la contribución de cada uno de ellos, este trabajo no se hubiera hecho realidad.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo se llevó a cabo gracias financiamiento del Grand Challenge Canadá (contrato 037-2014-FONDECYT), de los Fondos para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT) bajo el contrato 151-PNICP-PIAP-2015 y gracias al programa de becas de postgrado otorgado por la Fundación Cobián (2017-2019)

# IMPLEMENTACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE UN PUNTO DE CORTE EN UN TEST DE WAYNE CUANTITATIVO PARA DETECTAR LA SUSCEPTIBILIDAD A PZA EN CULTIVOS MODS DE MUESTRAS DE ESPUTO

## INFORME DE ORIGINALIDAD

4%	4%	2%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://repositorio.upch.edu.pe">repositorio.upch.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
2	<a href="http://tesis.unjbg.edu.pe">tesis.unjbg.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
3	<a href="http://repositorio.usmp.edu.pe">repositorio.usmp.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
4	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	<1 %
5	<a href="http://repositorio.ufsm.br">repositorio.ufsm.br</a> Fuente de Internet	<1 %
6	<a href="http://www.slideshare.net">www.slideshare.net</a> Fuente de Internet	<1 %
7	<a href="http://www.scielo.org.mx">www.scielo.org.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
8	<a href="http://dokumen.pub">dokumen.pub</a> Fuente de Internet	<1 %



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
2.	<i>PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN</i>	7
2.1.	<i>Planteamiento del problema</i>	7
2.2.	<i>Marco teórico</i>	9
2.3.	<i>Justificación del estudio</i>	21
2.4.	<i>Hipótesis</i>	22
2.5.	<i>Objetivos</i>	22
3.	<i>METODOLOGÍA</i>	23
3.1.	<i>Diseño de estudio</i>	23
3.2.	<i>Tamaño de la población de estudio</i>	24
3.3.	<i>Grupos de estudio</i>	25
3.4.	<i>Caracterización demográfica de las muestras</i>	25
3.5.	<i>Caracterización fenotípica de las muestras</i>	25
3.6.	<i>Ensayo MODS-Wayne para PZA</i>	28
3.7.	<i>Ensayo de susceptibilidad a PZA con el test MODS-WQ</i>	30
3.7.1.	Ensayo MODS-WQ en medio Middlebrook 7H9	30
3.7.2.	Ensayo MODS-WQ en buffer Citrato (BC)	32

3.7.3.	Estandarización de la curva de calibración de POA.	33
3.7.4.	Lectura y cuantificación de POA en muestras de MODS-WQ	35
3.8.	<i>Cultivo de M. tuberculosis para pruebas estándares</i>	35
3.8.1.	Aislamiento de M. tuberculosis en cultivo sólido	35
3.8.2.	Prueba estándar compuesta	36
4.	<i>OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES</i>	40
5.	<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</i>	41
6.	<i>ASPECTOS ÉTICOS</i>	42
7.	<i>RESULTADOS</i>	43
7.1.	<i>Características de las muestras estudiadas</i>	43
7.2.	<i>Caracterización fenotípica de las muestras</i>	45
7.3.	<i>Pruebas para calcular el estándar compuesto</i>	46
7.3.1.	Prueba de Wayne convencional	46
7.3.2.	BACTEC MGIT960 PZA	47
7.3.3.	Secuenciamiento del gen pncA	47
7.3.4.	Estándar compuesto	51
7.4.	<i>Ensayo MODS-Wayne para PZA</i>	51
7.4.1.	Sensibilidad y especificidad del MODS-Wayne para PZA	52
7.5.	<i>Ensayo MODS-WQ</i>	53
7.5.1.	Curva estándar de POA en medio 7H9 y Buffer citrato	53
7.5.2.	Resultados del MODS-WQ 7H9	54

7.5.3.	Resultados del MODS-WQ BC	55
7.6.	<i>Determinación de un punto de corte en el ensayo MODS-WQ</i>	57
7.6.1.	Sensibilidad y especificidad de MODS-WQ en medio 7H9.	57
7.6.2.	Sensibilidad y especificidad de MODS-WQ en buffer citrato.	58
7.6.3.	Contrastación de Hipótesis	59
7.6.4.	Curvas ROC del ensayo MODS-WQ	59
7.7.	<i>Comparación entre los ensayos MODS-Wayne y MODS-WQ</i>	61
7.8.	<i>Actividad enzimática y mutaciones en muestras de MODS-WQ BC</i>	66
8.	<i>DISCUSIÓN</i>	71
8.1.	<i>Características de las muestras</i>	72
8.2.	<i>Establecimiento del estándar compuesto</i>	73
8.3.	<i>Ensayo MODS-Wayne</i>	75
8.4.	<i>Ensayo MODS-WQ</i>	77
8.5.	<i>Comparación MODS-Wayne y MODS-WQ</i>	80
8.6.	<i>MODS-WQ y actividad enzimática</i>	81
9.	<i>CONCLUSIONES</i>	84
10.	<i>LIMITACIONES</i>	85
11.	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	86
12.	<i>ANEXOS</i>	

## LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1	Fármacos de primera y segunda línea aprobados por la FDA
Tabla N° 2	Concentraciones de la curva estándar de POA en medio 7H9
Tabla N° 3	Concentraciones de la curva estándar de POA en buffer citrato
Tabla N° 4	Condiciones de ciclaje para amplificación del gen <i>pncA</i>
Tabla N° 5	Características de las poblaciones de estudio MP y TBN
Tabla N° 6	Categorización de las mutaciones detectadas en el estudio
Tabla N° 7	Resumen resultados de susceptibilidad en cada prueba estándar
Tabla N° 8	Susceptibilidad a PZA final de acuerdo a las 3 pruebas estándar
Tabla N° 9	Susceptibilidad a PZA de acuerdo con MODS-Wayne
Tabla N° 10	Tabla de contingencia para calcular sensibilidad y especificidad en MODS-Wayne (MP)
Tabla N° 11	Tabla de contingencia para calcular sensibilidad y especificidad en MODS-Wayne (TBN)
Tabla N° 12	Susceptibilidad a PZA de acuerdo con el MODS-WQ
Tabla N° 13	Resumen de resultados de susceptibilidad en cada metodología
Tabla N° 14	Comparación de sensibilidad y especificidad del MODS-Wayne en dos muestras
Tabla N° 15	Valores de índice Kappa y su interpretación
Tabla N° 16	Performance comparativo del MODS-Wayne y MODS-WQ
Tabla N° 17	Sistema de determinación niveles de carga bacteriana
Tabla N° 18	Sensibilidad y especificidad por grupo BK y en el total general

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Incidencias de casos de TB en el Perú hasta el año 2019
- Figura 2 Incidencias de casos de MDR-TB en el Perú hasta el año 2019
- Figura 3 Progreso de casos de TB en tratamiento
- Figura 4 Metabolismo de la nicotinamida y pirazinamida
- Figura 5 Mecanismo de acción de la pirazinamida
- Figura 6 Distribución de mutaciones en el gen *pncA*
- Figura 7 Test de Wayne convencional en medio sólido
- Figura 8 Mecanismo de reacción en el Test de Wayne convencional
- Figura 9 Esquema del diseño del estudio
- Figura 10 Esquema de trabajo en placas de cultivo MODS
- Figura 11 Gradientes de resistencia y coloración en el MODS-Wayne cualitativo
- Figura 12 Esquema de trabajo en placas de cultivo MODS-WQ con buffer citrato
- Figura 13 Esquema de trabajo en placas de cultivo MODS-WQ en medio 7H9
- Figura 14 Esquema del cálculo de susceptibilidad con las 3 pruebas estándares
- Figura 15 Esquema de la recolección de muestras
- Figura 16 Características de la población de estudio
- Figura 17 Resultados en el Test convencional de Wayne

- Figura 18 Estructura tridimensional de la proteína pirazinamidasa y sitios activos
- Figura 19 Curva de concentración de POA en medio 7H9
- Figura 20 Curva de concentración de POA en buffer citrato
- Figura 21 Curva estándar y regresión lineal de POA en buffer citrato y 7H9
- Figura 22 Gráfica de Violín de la clasificación de muestras de acuerdo con el estándar compuesto en
- Figura 23 Gráfica de Violín de la clasificación de muestras de acuerdo con el estándar compuesto
- Figura 24 Gráfica de Violín de la clasificación de muestras de acuerdo con el MODS-WQ en buffer citrato
- Figura 25 Gráfica de Violín de la clasificación de muestras de acuerdo con el MODS-WQ en medio 7H9
- Figura 26 Curvas ROC del MODS-WQ en buffer citrato y 7H9
- Figura 27 Placas de cultivo con las variantes en buffer citrato y 7H9
- Figura 28 Relación entre el sitio de mutación y la actividad enzimática
- Figure 29. Esquema de la distribución de genotipos implicados en la resistencia a PZA.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ATP:</b> Adenosina trifosfato	<b>POA:</b> Ácido pirazinoico
<b>BC:</b> Buffer Citrato	<b>PZA:</b> Pirazinamida
<b>DST:</b> Test de susceptibilidad a drogas	<b>PZAr:</b> Resistencia a PZA
<b>INH:</b> Isoniacida	<b>PZasa:</b> Pirazinamidasa
<b>MODS:</b> Susceptibilidad a Droga mediante Observación Microscópica	<b>RIF:</b> Rifampicina
<b>MODS-PZA:</b> MODS para PZA	<b>RpsA:</b> Proteína ribosomal S1
<b>MODS-Wayne:</b> MODS-Wayne cualitativo	<b>SAF:</b> Sulfato de Amonio ferroso
<b>MODS-WQ:</b> MODS-Wayne cuantitativo	<b>TB:</b> Tuberculosis
<b>MP:</b> Muestras correspondientes al año 2016	<b>TB - MDR:</b> Tuberculosis multidrogo resistente
<b>MTB:</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<b>TBN:</b> Muestras correspondientes al año 2017
<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud	<b>UFC:</b> Unidad formadora de colonia
<b>pH:</b> Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio	<b>XDR-TB:</b> Tuberculosis extradrogo resistente

## **RESUMEN**

La pirazinamida (PZA) es una droga importante para el acortamiento del tratamiento antituberculoso, es la única que actúa sobre las micobacterias latentes. La susceptibilidad a PZA puede ser determinada evaluando: el crecimiento de la micobacteria frente a la droga (BACTEC 960), la actividad enzimática de la pirazinamidasa (PZAsa) (Test de Wayne) que detecta al ácido pirazinoico (POA) o molecularmente, identificando variantes o mutaciones presentes en el gen *pncA* que puede afectar su actividad normal. BACTEC MGIT960 ha sido la única prueba de susceptibilidad (DST) recomendada por la OMS, sin embargo, ha reportado alto índice de falsos resistentes, quizás por la dificultad de mantener un pH adecuado y controlar el inóculo cultivado. El secuenciamiento conlleva un alto costo y, además, un cierto porcentaje de mutaciones puede no afectar la actividad enzimática, o cepas WT manifiestan resistencia, por lo que hay otros mecanismos que estarían implicados en la resistencia. En este estudio planteamos cuantificar la producción de POA en cultivo líquido directamente de esputo luego de su incubación con PZA (MODS-WQ), a diferencia del test de Wayne convencional que se basa en la observación del color. Se usaron 264 muestras de esputo de pacientes con tuberculosis y se evaluó dos variantes del medio: caldo 7H9 y buffer citrato, ambas a pH neutral. La variante en buffer citrato identificó correctamente el 92.6% de los aislados resistentes y el 95.6% de los aislados sensibles, usando como *gold* estándar las tres DST mencionadas. La variante en 7H9 identificó 81.3% resistentes y 77.2% sensibles. Los resultados se obtuvieron en un promedio de 13 días.

## **PALABRAS CLAVE:**

TUBERCULOSIS, MODS, WAYNE CUANTITATIVO, ÁCIDO PIRAZINOICO.



## **ABSTRACT**

Pyrazinamide (PZA) is an important drug for shortening anti-tuberculosis treatment as it is the only one that acts on latent mycobacteria. Susceptibility to PZA can be determined by evaluating the growth of mycobacteria against the drug (BACTEC 960), the enzymatic activity of pyrazinamidase (PZAse) through the Wayne Test, which detects pyrazinoic acid (POA) or molecularly, identifying variants or mutations present in the *pncA* gene that can affect its normal activity. The BACTEC MGIT960 has been the only susceptibility test recommended by the WHO, however, it has reported a high rate of false resistance, perhaps due to the difficulty of maintaining an adequate pH and controlling the amount of cultured inoculum. Sequencing carries a high cost, and, in addition, a certain percentage of mutations may not affect their enzymatic activity, or WT strains show resistance, so there are some mechanisms that are not well studied that would be involved in resistance. In this study we propose to quantify the production of POA in liquid culture directly from sputum after its incubation with PZA (MODS-WQ), unlike the conventional Wayne test that is based on the observation of color. 264 sputum samples from tuberculosis patients were used to evaluate two medium variants: 7H9 broth and citrate buffer, both at neutral pH. The variant in citrate buffer correctly identified 92.6% of the resistant isolates and 95.6% of the sensitive isolates, using the three mentioned DSTs as the gold standard. The 7H9 variant identified 81.3% resistant and 77.2% sensitive. Results were obtained in an average of 13 days.

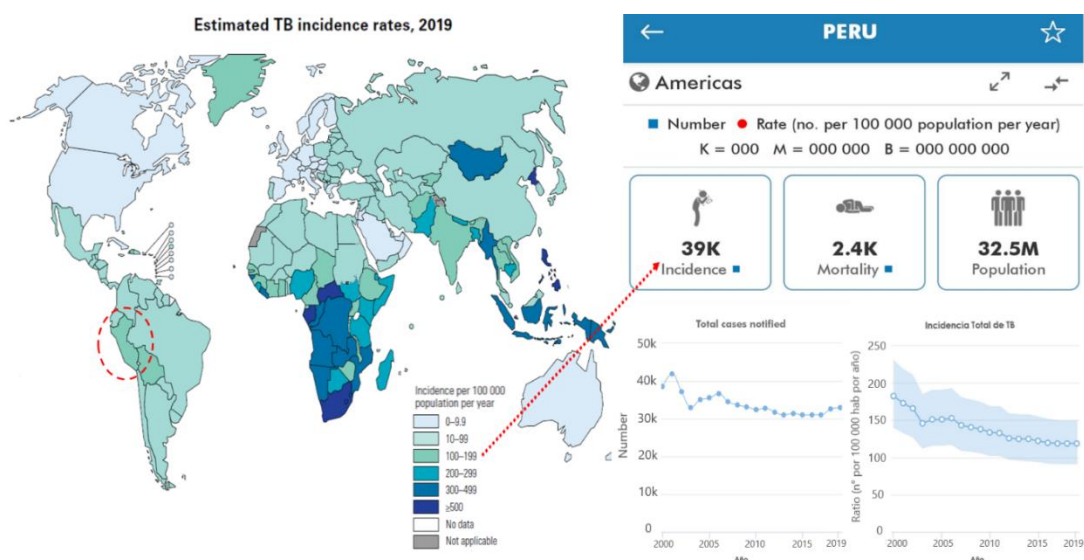
## **KEY WORDS:**

TUBERCULOSIS, MODS, QUANTITATIVE WAYNE, PYRAZINOIC ACID.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial. En 2018 la cifra estimada de muertes por TB fue de 1,5 millones según la OMS (1). Hasta la fecha, su erradicación sigue siendo un reto para la comunidad médica y científica (2) cuyos avances para controlarla se han visto mermados por el continuo incremento de sus variantes multidrogo-resistente (MDR-TB) y extradrogo-resistente (XDR-TB) (3,4).

En el Perú esta enfermedad es considerada como uno de los problemas de salud pública de mayor trascendencia social y económica debido a que el 66% de los casos corresponde a la población económicamente activa (PEA). Cada año más de 30000 peruanos se enferman con TB y se estima una tasa de incidencia de 134-119 desde el año 2010 (5) (**Figura 1**).

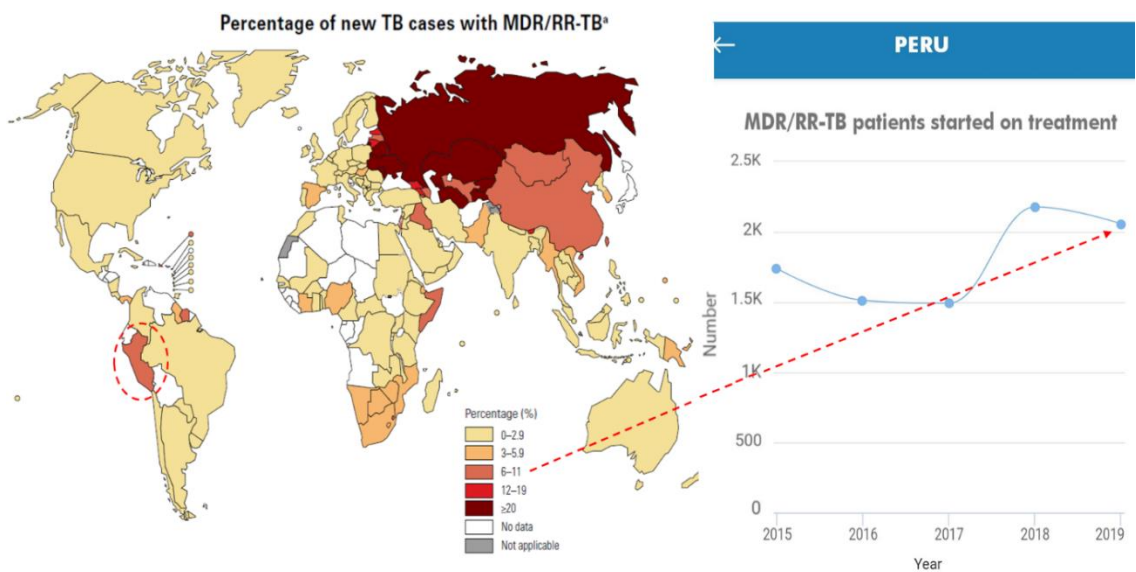


**Figura 1.** Incidencia total de casos de tuberculosis en el Perú desde el año 2000 hasta el 2019. Izquierda muestra incidencia en 2019. Derecha, muestra incidencia desde el 2000. *Fuente OMS Tuberculosis Report 2020*

Aunque los esfuerzos por erradicar la enfermedad han tenido sus frutos, la aparición de cepas MDR y XDR están dificultando su eliminación. Las tasas de incidencias de TB-MDR, si bien parecían disminuir entre el 2012-2014, nuevamente se encuentran en aumento y se han mantenido desde el 2018 (5,6) (**Figura 2**).

Hasta el año 2016 se han estimado 490 mil casos en el mundo y en el Perú, tan solo en el 2015, se registraron 1366 casos de TB-MDR y 106 casos de TB-XDR (6,7).

En ese sentido los estudios de los mecanismos de resistencia a los antibióticos de primera línea como rifampicina, isoniazida, estreptomycin, pirazinamida y etambutol son una prioridad para el avance en su erradicación.



**Figura 2.** Incidencia total de casos de tuberculosis multidrogoresistente en el Perú desde el año 2015. En la Figura de la derecha los resultados se muestran desde el 2000. Fuente OMS Tuberculosis Report 2020

Los actuales regímenes terapéuticos para la TB resistente tienen poca eficacia y tolerabilidad, lo cual resulta en un tratamiento inadecuado, con tasas de éxito del 54% y 30% para TB-MDR y TB-XDR, respectivamente (8). Esto, revela la necesidad urgente de mejorar el acceso tanto al diagnóstico como al tratamiento efectivo para todas las formas de resistencia. Por ello, el esfuerzo ha recaído en desarrollar Pruebas de Susceptibilidad Rápida (PSR) para detectar resistencia. Estas PSR se pueden clasificar como pruebas fenotípicas (pDST) y genotípicas (gDST). Algunas de ellas, recomendadas por la OMS, tales como: GeneXpert MTB/RIF, LineProbe Assays (9) y Genotype® MTBDRplus (10,11) y el BACTEC MGIT 960 system (9). Sin embargo, sus costos pueden superar los \$68.75 en instrumentos e insumos por muestra en laboratorios privados, mientras que con financiamiento público podría estimarse entre los \$20-30 (12,13). Ante la necesidad de pruebas económicamente accesibles, se han desarrollado métodos más económicos y de fácil implementación en países en vías de desarrollo, tales como el test de Nitrato Reductasa (Griess) (14) y MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility), desarrollado en el Perú por Caviedes *et al.* (15), los cuales han tenido buena acogida en laboratorios de diagnóstico de América Latina (16–18).

No obstante, estos métodos han sido dirigidos principalmente a detectar resistencia a rifampicina e isoniazida (Rif-Iso MDR), ambos, fármacos de primera línea. La resistencia a estas drogas se genera principalmente por mutaciones en los genes *rpoB* (90 – 95%) para el caso de rifampicina y los genes *katG/fabG1* (50 – 97%), para isoniazida (19) Sin embargo, estos métodos son caros y podrían llegar a costar hasta 20 veces el costo de la baciloscopia (20).

La pirazinamida (PZA), es una prodroga que se convierte en ácido pirazinoico (POA), mediante la acción de la pirazinamidasa (PZAsa). Este fármaco de primera línea es altamente eficaz para eliminar micobacterias en estado latente, lo que ha reducido la duración del tratamiento de 9-12 meses a solo 6 meses en pacientes sensibles (21) y pacientes Rif-Iso MDR (22). Además, el uso de PZA se ha asociado con una menor mortalidad en pacientes susceptibles a esta droga, pero con una mortalidad significativamente mayor en aquellos resistentes a PZA(23) Esto subraya la necesidad de establecer un diagnóstico rutinario de Resistencia a PZA (PZAr) para determinar el pronóstico del paciente y permitir un tratamiento de segunda línea más efectivo y más corto. En la actualidad, las pruebas pDST para PZA se basan en evaluar el crecimiento en cultivo de la micobacteria. Tienen ventajas tales como su bajo costo y relativo corto tiempo (~3 semanas) de resultado, sin embargo sus desventajas podrían ser mayores: la dificultad para calibrar la cantidad de inóculo lo que imprecisa el resultado, posible contaminación con otras cepas bacterianas, lo que ha resultado en un ratio de error del 10-15% (24), asimismo, se requiere que el medio se encuentre entre 5.5-6.5 de pH, para activar a PZA, pero un porcentaje de los aislados no resisten esta acidez y se inhiben, además si se trabajan con grandes inóculos el pH aumenta y se crean falsos resistentes (25). El sistema de detección automatizado Bactec MGIT 960 (Sparks, MD) ha superado algunos de estos problemas y es el único método pDST recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para PZA. Sin embargo, este método es caro y aún produce una alta tasa de resultados de falsa resistencia (26). Otras se basan en la evaluación de la actividad enzimática de la PZAsa, decodificada por el gen *pncA*. Entre ellas tenemos al test de Wayne y al

secuenciamiento genético. Este último se basa en la presencia de variantes genéticas en el gen *pncA*, que se encuentran en la mayoría (70-97%) de los aislados clínicos resistentes a la PZA, ya sea en la región promotora o en la secuencia de codificación(27,28), Sin embargo, el alto costo y la falta de representatividad, así como la ausencia de un patrón de mutaciones claramente asociadas a la resistencia, debido a la variabilidad de mutaciones y linajes, son desafíos significativos (29).

Por otro lado, el test de Wayne es un ensayo colorimétrico que detecta, como marcador de susceptibilidad, al POA. Es un test cualitativo y relativamente barato, que se realiza a partir de cepa pura aislada, requiere incubación prolongada a 37°C hasta que se observe el crecimiento, además es visual y subjetiva (30). Utiliza el reactivo sulfato de amonio ferroso (SAF) para detectar el POA, generando un complejo ferroso que produce un cambio de color a rojizo(31). Este ensayo se basa en la actividad enzimática de la PZasa, si esta enzima transforma adecuadamente la PZA y la convierte en POA, el aislado de MTB será *sensible*, por el contrario, si la enzima no realiza esta actividad por alguna mutación o factor inhibidor, el aislado será *resistente*.

En un afán por mejorar este tipo de pruebas, Alcántara *et al.*(32) propusieron combinar el test de Wayne y el método MODS para determinar PZAr, detectando POA directamente en el sobrenadante de los cultivos de esputo a través del cambio de color, esto ha representado una ventaja puesto que la mayoría de pruebas requieren aislar previamente a la micobacteria, incrementando el tiempo de detección. Este ensayo resultó ser altamente sensible y específico (92.7% y 99.3%, respectivamente); sin embargo, la lectura de los resultados es todavía subjetiva.

Es por todo ello, que se necesita considerar una prueba que tenga la ventaja de ser medida directamente de los sobrenadantes, pero de forma objetiva y cuantitativa.

En este trabajo proponemos adaptar la prueba MODS-Wayne hacia un nivel cuantitativo a partir de las muestras de esputo de pacientes con tuberculosis confirmada, lo que supondría una ventaja en tiempo de diagnóstico, evitando pre-aislamientos y cultivos en medio sólido que aumentan el tiempo de crecimiento y el tiempo para la detección; asimismo la definición de resistencia no va a depender del criterio personal sino del análisis de los resultados cuantitativos.

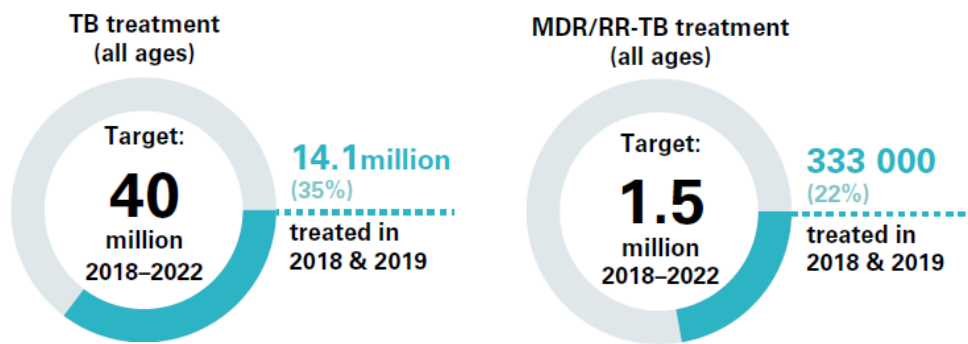
## 2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1. *Planteamiento del problema*

La multiresistencia a fármacos representa un problema para el manejo y control de la Tuberculosis a nivel mundial y para la salud pública, sobre todo en los países con bajos recursos y deficientes políticas de vigilancia(33). Cada año, aproximadamente el 80% de los pacientes en todo el mundo carecen de acceso a tratamientos efectivos para la TB-MDR y que en peores instancias, no reciben diagnóstico adecuado (5). La detección temprana de MDR-TB permite establecer esquemas de tratamiento oportunos, ya que promueve la recuperación eficaz de los pacientes y evita el desarrollo de nuevas variantes resistentes a los fármacos(34).

La resistencia a pirazinamida, representa en la actualidad alrededor del 60% de los casos de TB-MDR y muestra una prevalencia estimada del 16.2% de los casos totales de TB, en el mundo (35). Aunque existen algunas pruebas de susceptibilidad a PZA que en la actualidad se consideran estándares, tales como el sistema automatizado BACTEC MGIT960, o el secuenciamiento del gen *pnca*, estas, presentan dificultades que obstaculizan su uso masivo. Costos excesivos, difícil interpretación, baja reproducibilidad o poca sensibilidad y especificidad, son algunos de los factores que dificultan el uso de las pruebas de susceptibilidad a PZA a gran escala, lo cual repercute en la falta de acceso a tratamientos tanto para la TB sensible como la resistente (**Figura 3**).





**Figura 3.** Progreso global del número y porcentaje de personas con tuberculosis que se encuentran en tratamiento entre 2018 y 2019. (Fuente OMS Tuberculosis Report 2020)

Incluso para el ensayo automatizado BACTEC MGIT960 (prueba estándar de la OMS) se ha reportado un índice considerable de falsos resistentes (5,26).

La prueba de Wayne ha sido largamente utilizada a nivel mundial y sobre todo en países en vías de desarrollo, debido a su facilidad de manejo, bajo costo y requerimientos mínimos de equipamiento de laboratorio, aunque es empleada como una prueba estándar en el diagnóstico, no se encuentra recomendada por la OMS, probablemente por la disparidad en resultados, existen estudios que arrojan hasta 100% de sensibilidad mientras que otros no alcanzan ni el 50%, resultando en forma global 87% de sensibilidad conjunta (36). Esta variabilidad en los resultados está dada principalmente por la subjetividad que conlleva la naturaleza visual del ensayo.

El diseño de pruebas de susceptibilidad para PZA que brinden resultados en poco tiempo con una sensibilidad y especificidad considerables y que sean de fácil acceso al paciente, constituye un punto de investigación importante.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Tuberculosis**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que se transmite a través del aire cuando una persona contagiada tose o estornuda. El agente infeccioso es la micobacteria denominada *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta generalmente a los pulmones y en menor proporción otros órganos como los riñones y el cerebro. *Mycobacterium tuberculosis* fue descubierto en el año 1882 por Robert Koch, fecha a partir de la cual las intervenciones terapéuticas en los llamados sanatorios para Tuberculosis empezaron a tener auge a lograr resultados positivos. Pero no es hasta mediados del siglo XX cuando las primeras drogas antituberculosas empiezan a convertirse en tratamientos realmente efectivos (37).

### **2.2.2. Terapia antituberculosa**

Los primeros ensayos efectivos contra la tuberculosis se dieron en el año 1944 con el descubrimiento de la estreptomina (37). Ya en los años 50's las drogas tales como la isoniazida en 1951, etambutol en 1961 y rifampicina en 1966 comenzaron su uso como tratamientos de primera línea contra la TB, sin embargo, la duración del tratamiento podía llegar entre los 18-24 meses. Es gracias a la introducción de la PZA que se descubre que en combinación con INH y RIF el tratamiento podría acortarse hasta los 6 meses (39). En la actualidad el tratamiento de esta enfermedad tiene una duración de 6-9 meses en cepas susceptibles. Los 10 fármacos utilizados comúnmente aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (39) , son los siguientes (**Tabla N°1**):

<b>Tabla 1. Fármacos de primera y segunda línea aprobados por la FDA</b>	
<b>PRIMERA LÍNEA</b>	<b>SEGUNDA LÍNEA</b>
Isoniazida	Cicloserina
Rifampicina	Etionamide
Etambutol	Levofloxacin*
Pirazinamida	Moxifloxacin*
Rifapentina	Gatifloxacin*
Rifabutin*	Ácido p-aminosalicílico
	Estreptomina
	Kanamicina
<b>*Aún no aprobados por la FDA</b>	

Entre los medicamentos no aprobados por la FDA, las fluoroquinolonas se utilizan de para tratar a pacientes intolerantes a algunos de los fármacos de primera línea. La rifabutina es útil para el tratamiento de pacientes que toman simultáneamente fármacos que pueden interactuar con otras rifampicinas. Kanamicina, fármaco aminoglucósido se utiliza en el tratamiento de pacientes con tuberculosis causada por organismos resistentes a fármacos.

La isoniazida (INH), rifampina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) se consideran antituberculosos de primera línea y constituyen el núcleo del tratamiento. Rifabutina y rifapentina también pueden ser considerados agentes de primera línea en situaciones específicas. La estreptomina (SM) se consideraba anteriormente un agente de primera línea y, en algunos casos, todavía se utiliza en el tratamiento inicial. Sin embargo, su uso ha disminuido debido a la prevalencia creciente de resistencia. Los medicamentos restantes se reservan para situaciones como la intolerancia a los medicamentos o la resistencia (39)

### **2.2.3. Resistencia farmacológica**

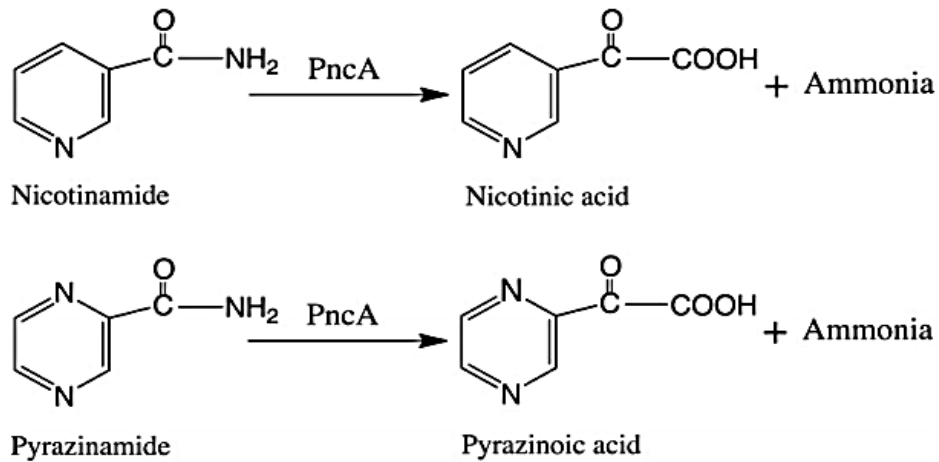
La resistencia farmacológica es un principal problema de salud pública que ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias y tratamientos para contrarrestar su evolución. La principal forma de resistencia viene dada a través de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) e indels (inserciones y deleciones) en genes que codifican las proteínas targets de los fármacos o enzimas que los catabolizan. Sin embargo, otras formas de adquisición de resistencia como: 1) la dificultad del fármaco para acceder a la proteína diana debido a la baja permeabilidad la pared celular de la mycobacteria, 2) modificaciones de los fármacos por algunas enzimas de MTB, 3) la existencia de bombas de eflujo en las membranas de MTB que eliminan los fármacos que pudieron ingresar a la célula, 4) Adaptación fenotípica al fármaco relacionada con un estado de latencia y crecimiento lento, han sido descritas (40)

Por lo tanto, existen diversas formas y factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia farmacológica, no obstante, el avance en nuevas técnicas moleculares y genéticas, tales como la transcriptómica o de asociaciones de genoma completo están permitiendo dar nuevos alcances en el tema.

### **2.2.4. Pirazinamida**

La pirazinamida (PZA) es una droga de primera línea para el tratamiento de todas las formas de tuberculosis. Se cree que el fármaco ejerce la mayor actividad contra la población de organismos latentes o semidormantes dentro de los macrófagos o en el entorno ácido de los focos caseosos o zonas necróticas (CDC 2003).PZA es una amida derivada del ácido pirazina-2-carboxílico y análogo de la

nicotinamida(41). Fue descubierta en 1936 pero su propiedad antituberculosa no fue descubierta sino hasta 1952 (**Figura 4**).



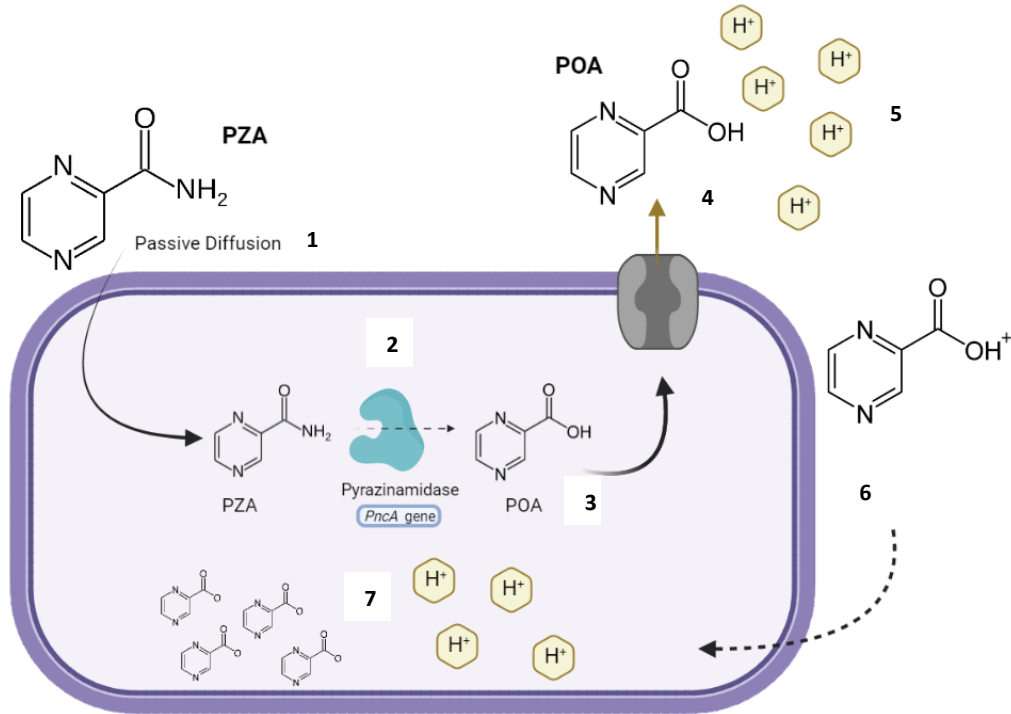
**Figura 4.** Metabolismo de nicotinamida y pirazinamida. Ambos compuestos análogos son metabolizados por la enzima decodificada por el gen *pncA*, cuyo producto resulta el ácido nicotínico y el ácido pirazinoico, respectivamente.

#### 2.2.4.1. Mecanismo de acción

PZA es una prodroga cuya forma activa es el POA, producto metabólico de la enzima PZasa, codificada por el gen *pncA* (**Figura 5**) (42). PZasa es una enzima monómera de 20,89 kDa que requiere iones  $Fe^{2+}/Mn^{2+}$  como cofactores en el sitio de coordinación de la His71, His51 y Asp49 (42) aunque presenta preferencia por el ion  $Fe^{2+}$  y una conformación bucle en el residuo His57 que está directamente involucrado en la coordinación del ion  $Fe^{2+}$ , en su estructura cristal(43).

El ciclo de acción de PZA es ingresar al interior de los bacilos por difusión pasiva, convertirse en POA, y luego ser expulsado a través de bombas de eflujo hacia el exterior de la célula. Una vez en el extracelular, si el pH es menor a 6, una proporción de POA es protonado (HPOA) y fácilmente ingresa a través de la membrana. El HPOA transporta protones hacia el interior de la bacteria, y esto

puede causar la acidificación del citoplasma inhibiendo enzimas vitales, colapsando el potencial de membrana e inhibiendo la síntesis de proteínas y ARN (44).



**Figura 5.** Mecanismo de acción más ampliamente aceptado de la pirazinamida.

1) PZA ingresa al citoplasma micobacteriano. 2) es metabolizado por la PZAsa, 3) se produce POA, 4) el cual es liberado hacia el extracelular, 5) que se protona en el medio bajo en pH. 6) el POA protonado, entra en la micobacteria. 7) los protones se liberan del POA y acidifica el medio citosólico inhibiendo e inactivando al microorganismo. *Creación en Biorender.com*

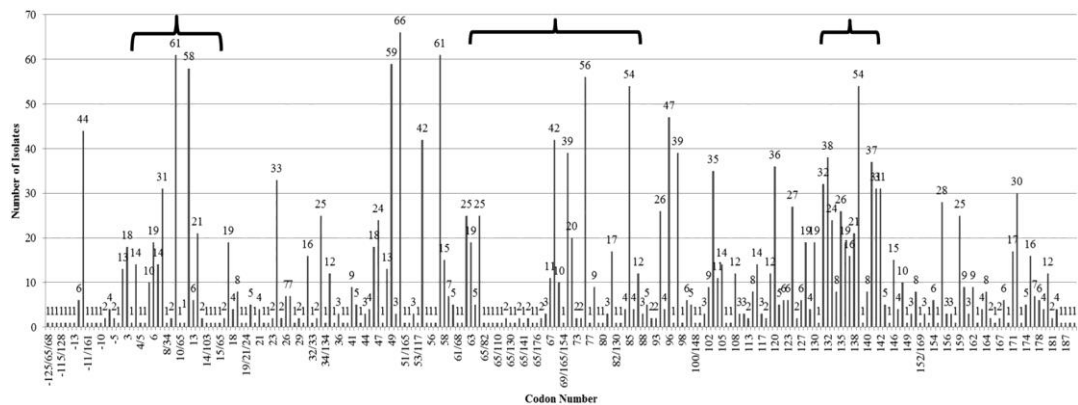
#### 2.2.4.2. Mecanismo de resistencia

##### ***Mutaciones en pncA***

Ya en la década de los 60's se había relacionado la resistencia farmacológica a la pérdida de la actividad enzimática de la PZA, sin embargo, no fue hasta los 90's

cuando se demostró que la mutación en el gen *pncA*, causaba directamente resistencia(45)

En la actualidad, las mutaciones en el gen *pncA* son la principal causa de resistencia a PZA (PZA<sub>r</sub>) en *M. tuberculosis* (46). Sin embargo, a diferencia de rifampicina e isoniazida, las mutaciones en *pncA* no son específicas y por lo tanto no pueden predecir la susceptibilidad con alta precisión y sensibilidad(47). Aunque existen mutaciones que han causado mayor repercusión sobre la actividad enzimática de la PZasa, tales como, H51R, D49N, que involucran el sitio de unión al cofactor (Fe+2 y Zn+2) o T135P, D12A, D12G y F94L, que involucran al sitio activo (48), se han determinado una gran variedad de mutaciones asociadas a PZA<sub>r</sub> a lo largo del marco abierto de lectura (ORF) y en su promotor putativo (47), que no solo se encuentran agrupadas en los *hot spots* sugeridos por Zhang y Mitchison a los comienzos de la década del 2000(49), sino que se encuentran distribuidas a lo largo del gen (**figura 6**).



**Figura 6.** Distribución de mutaciones a lo largo del gen *pncA*. A lo largo del gen se puede observar la frecuencia de diferentes mutaciones desde la región promotora hasta las bases downstream. En Brackets se encuentran las regiones con mayor frecuencia de mutaciones.

### ***Mutaciones en rpsA, panD y ClpC1***

Aunque es aceptado que la protonación del POA y la posterior acidificación de medio intracelular bacteriano, es el principal mecanismo de acción, la exacta diana del POA es aún motivo de estudio. Y es que se ha revelado que algunos aislados resistentes a PZA no conllevan mutaciones en *pncA*, pero sí en *rpsA*, *panD* y más recientemente *ClpC1*(50). *rpsA* es una proteína ribosomal implicada en la iniciación de la traducción, reconocimiento del RNA mensajero y en la trans-traducción(51). Más de 15 mutaciones en esta proteína han sido relacionadas a PZAr (52), sin embargo, solo la delección  $\Delta$ Ala438, presente en la cepa DHM44, ha sido consistentemente asociada a resistencia. Inicialmente, se pensó que POA se unía a *rpsA* inhibiendo la trans-traducción, sin embargo, recientemente se ha reportado que no existe interacción entre *rpsA* WT y POA(53,54). Por otro lado, algunos aislados no presentan mutaciones ni en *pncA* ni en *rpsA*. En la cepa *M. canetti*, naturalmente resistente a PZA, se encontraron mutaciones en el gen *panD*, y en ese mismo estudio, se aislaron 5 muestras de *M. tuberculosis* PZA-resistentes con mutaciones en este gen (55), que codifica una aspartato descarboxilasa, implicada en la síntesis de  $\beta$ -alanina, precursor en la biosíntesis de CoA, necesaria para la supervivencia y patogénesis *in vivo*(56). A diferencia de *rpsA*, POA sí interacciona con *panD* y la inhibe de manera competitiva(57), sin embargo, la inhibición de *panD*, también se puede dar a través de su degradación, en la que participa el complejo proteolítico ClpC1-ClpP. Se ha demostrado que la unión de POA a *panD* activa e incrementa su degradación a través de este complejo (58), y que algunas mutaciones presentes en la proteína ClpC1, encargada del desplegamiento proteico (*unfoldase*), estrían confiriendo, aunque en menor medida, resistencia a PZA(50).



### *Otros mecanismos*

Otro mecanismo de resistencia es el déficit de flujo de POA hacia el medio extracelular a través de bombas de eflujo. La eficiencia de las bombas de eflujo, concentración de PZA en el medio y actividad enzimática de PZasa, son los principales factores que modulan la velocidad de eflujo de POA. Zimic *et al.* encontraron que existe una fuerte correlación entre las cepas resistentes a PZA y el eflujo de POA en un rango de 0-5 ng de POA/minuto, mientras que las cepas susceptibles presentaban eflujo de POA en un rango entre 5-15 ng de POA/minuto (59). Por lo tanto, el déficit de eflujo de POA hacia el exterior sería un mecanismo importante en la PZAr.

#### **2.2.4.3. Métodos fenotípicos de diagnóstico de Resistencia**

##### **A. BACTEC MGIT 960**

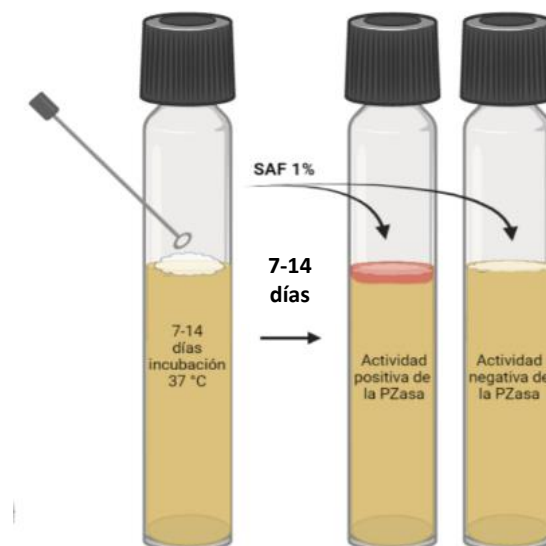
Es un sistema de cultivo automatizado que se basa en la detección de fluorescencia que aumenta con el crecimiento de la micobacteria en un medio líquido (Middelbrook 7H9). Cada tubo contiene medio 7H9 modificado con un compuesto fluorescente inhibido por el oxígeno presente en el medio. Cuando la micobacteria prolifera, incrementa su consumo de oxígeno y con ello aumenta la fluorescencia.

El sistema ha sido estandarizado y evaluado para isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. En el caso de PZA, se utiliza a una concentración de 100 µg/mL en un pH 5.9 y se realiza en un rango de 4 a 21 días. No obstante, sus ventajas, este sistema ha sido respaldado por la OMS sólo para su uso con RIF e INH, debido probablemente a la baja consistencia y frecuentes falsos positivos que ha presentado el BACTEC (35).

## B. Test de Wayne

El Test de Wayne, desarrollado en 1974 por Lawrence G. Wayne, fue inicialmente diseñado para detectar la presencia de micobacterias y diagnosticar la enfermedad utilizando la actividad de la PZasa para detectar POA libre producido(31). Posteriormente, se ha utilizado principalmente para identificar la resistencia a la pirazinamida mediante la misma actividad de la PZasa.

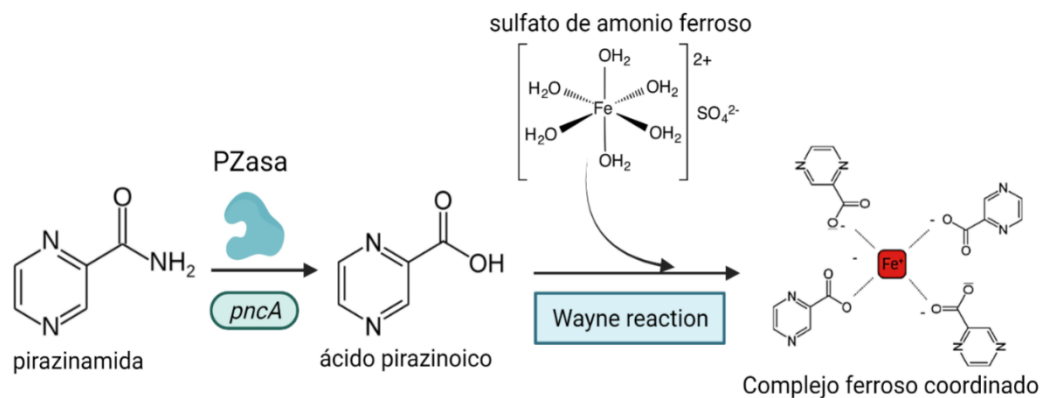
El ensayo se realiza en un tubo (15mL) con medio Agar-Dubós conteniendo PZA (100 µg/mL). Luego, se inocula una muestra suficiente de *M. tuberculosis* previamente cultivada no más de 21 días. El tubo con el inóculo se incuba a 37 °C entre 7-14 días. Finalizado este periodo, se añade sulfato de amonio ferroso (SAF) a una concentración final de 1% y se deja incubando por 4 horas a 4 °C. Finalmente se debe observar la formación de una banda rojiza en el agar, lo cual indica no solo la presencia de la micobacteria sino la actividad normal de la PZasa (**Figura 7**).



**Figura 7.** Test de Wayne convencional. La muestra de esputo del paciente se cultiva en medio agar sólido por 7-14 días, hasta su evaluación cualitativa.

*Creación en Biorender.com*

Bioquímicamente, lo que sucede es que la PZA al ingresar en la micobacteria es metabolizada por la PZasa, y se convierte en POA. Una vez producido el POA, este es liberado hacia fuera de la micobacteria y se acumula en el medio agar. Al transcurrir el tiempo de incubación, se añade el SAF (1.0%) y este compuesto reacciona con el POA generando un complejo ferroso coordinado que se visualiza en color rojizo. (Figura 8)



**Figura 8.** Mecanismo de acción del Test de Wayne o reacción de Wayne. Creación en Biorender.com

### C. MODS

El método conocido por sus siglas MODS (Microscopic observation broth- drug susceptibility) en inglés, es un método rápido y de bajo costo desarrollado por Caviedes *et al.* en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para detectar no solo la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* sino la susceptibilidad frente a drogas como la isoniazida y rifampicina (15). Esta técnica representa una ventaja frente al cultivo sólido, pues el crecimiento de las micobacterias se detecta de manera temprana en el cultivo líquido simplemente utilizando un microscopio de luz invertida. El método ha logrado alcanzar una sensibilidad del 98% en la detección de resistencia a RIF e INH, lo cual supera métodos como el cultivo en Lowenstein-Jensen (84%) y al cultivo automatizado MBBacT (BacTAlert) (89%) y una rapidez

de detección que se observa desde las 2 primeras semanas (17). Una de las desventajas de este método es el requerimiento de alta capacitación para detectar el característico tipo de crecimiento de la micobacteria la cual se observa en forma de cordones y puede variar entre pacientes debido a la carga bacteriana de cada individuo. Además, el MODS para detectar PZAr (MODS-PZA), requiere pHs ácidos que pueden inhibir la viabilidad de la micobacteria y arrojar resultados cuestionables.

#### **D. MODS-Wayne**

Esta es una metodología cualitativa, adaptada a partir del ensayo MODS para PZA (MODS-PZA), en la cual, no se evalúa el crecimiento bacilar, sino la producción de POA en el medio líquido. Con este método, estandarizado por Alcántara *et al.* (32) se observa el color formado por la reacción entre el SAF y el POA liberado por las micobacterias, es decir, la reacción de Wayne. Este ensayo que resultó ser altamente sensible y específico (92.7% y 99.3%, respectivamente), tiene la ventaja de usar el test de Wayne en medio líquido y disminuir el tiempo de detección a 10 - 16 días. Sin embargo, no deja de ser subjetivo.

#### **2.2.4.4. Métodos moleculares de diagnóstico de resistencia**

##### **A. Secuenciamiento del gen *pncA***

La actividad de esta enzima es fundamental para que la PZA pueda transformarse en POA. Sin embargo, si esta enzima es objeto de algún tipo de modificación o cambio conformacional, que afecte su sitio activo o la afinidad con sus cofactores (60) su actividad se puede ver disminuida y por consiguiente la acción del fármaco.

Se ha estimado que entre el 83-93% de PZAr está asociada a mutaciones en el gen *pncA*, no solo existen una o algunas mutaciones a las que se atribuyen PZAr, en realidad existen muchas mutaciones a lo largo del marco abierto de lectura y de los promotores del gen, lo cual hace que una simple PCR no sea un método ideal para detectar PZAr. (61) Es por ello que el secuenciamiento por Sanger es considerado el método más adecuado ya que podemos detectar todas las mutaciones a lo largo del gen *pncA*. Sin embargo, es costoso y requiere cierto nivel de experiencia.

### **B. Genoscholar PZA-TB LPA**

El test Genoscholar PZA-TB LPA es un Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) recomendado para PZA en la última guía del año 2021(62). Este es un ensayo de sonda lineal (LPA *assay*) basada en la detección de un fragmento (sonda) de 700 pares de bases que representa el gen *pncA wild type* y diferentes mutaciones, que se encuentra unido a una tira de membrana. Cuando los amplicones de *pncA* de las muestras se hibridizan con la sonda resulta un color morado. La ausencia de unión con la sonda *wild type* indica la presencia de una mutación. La primera versión del ensayo contenía 47 sondas, que cubrían el promotor *pncA* y el marco de lectura abierto. La actual versión contiene 48 sondas, que cubren el promotor, el marco de lectura abierto y tres sondas (*pncA* 16, 17 y 35).

La OMS ha aceptado que existe data limitada sobre su eficacia en el diagnóstico, sin embargo, han detallado que puede alcanzar un 81.2% de sensibilidad y un 97.8% de especificidad. Respecto a su costo-efectividad tampoco tiene datos definitivos, aunque describen que el costo de los kits podrían estar alrededor de US\$16 por muestra y el equipo automatizado MultiBlot disponible por US\$ 14 000(63).

### 2.3. *Justificación del estudio*

En el Perú cada año se logra diagnosticar entre 1500 y 2000 casos de TB multidrodrogo-resistente, cuya medida esta referida a la resistencia a rifampicina e isoniazida, medicamentos de uso extensivo. Sin embargo, la resistencia causada por pirazinamida ha venido siendo subestimada, con hasta un 20% de casos en pacientes no-MDR (64), lo cual hace imprescindible considerar a la pirazinamida cómo un fármaco esencial en la vigilancia de la resistencia. Sin embargo, la falta de pruebas de susceptibilidad que sean precisas, de fácil acceso y rápidas, dificulta su vigilancia. Es por ello que, con este estudio, se plantea desarrollar una prueba de susceptibilidad que sea a) **directa**, es decir, que se pueda realizar directamente desde los cultivos de esputo, para reducir el tiempo de diagnóstico, b) **exacta**, al ser cuantitativo y no cualitativo, c) **de fácil acceso**, al tener bajos costos de aplicación que le puedan permitir se usado en laboratorios de todo el mundo.

Con estas consideraciones se podría contrarrestar las dificultades que presentan las técnicas que se usan en la actualidad, tal y como el Test de Wayne, el cual es barato pero subjetivo, el test MIGHT 960, el cual es más preciso, pero de altos costes. Asimismo, se busca mejorar alternativas como el MODS, el cual ha mostrado resultados fiables pero con inóculos pre-cultivados y requiere pH ácido que podría inhibir el crecimiento bacteriano(65), o el MODS-Wayne, que a pesar de mostrar una alta sensibilidad y especificidad(32), no ha sido validada en otros estudios y mantiene la subjetividad del Test de Wayne, lo cual implica el surgimiento resultados incongruentes ya que depende del observador.

Por ello, planteamos el desarrollo de una alternativa al MODS-Wayne que sea cuantitativa y de bajo coste, pero sobre todo que no dependa de un observador.

#### **2.4. Hipótesis**

La variante cuantitativa del MODS-Wayne (MODS-WQ), usando un punto de corte establecido determinará la susceptibilidad PZA a partir de cultivos MODS de muestras de esputo con una sensibilidad superior a 75%.

#### **2.5. Objetivo**

Implementar y establecer un punto de corte en el MODS-WQ para detectar la susceptibilidad a PZA directamente de muestras de esputo.

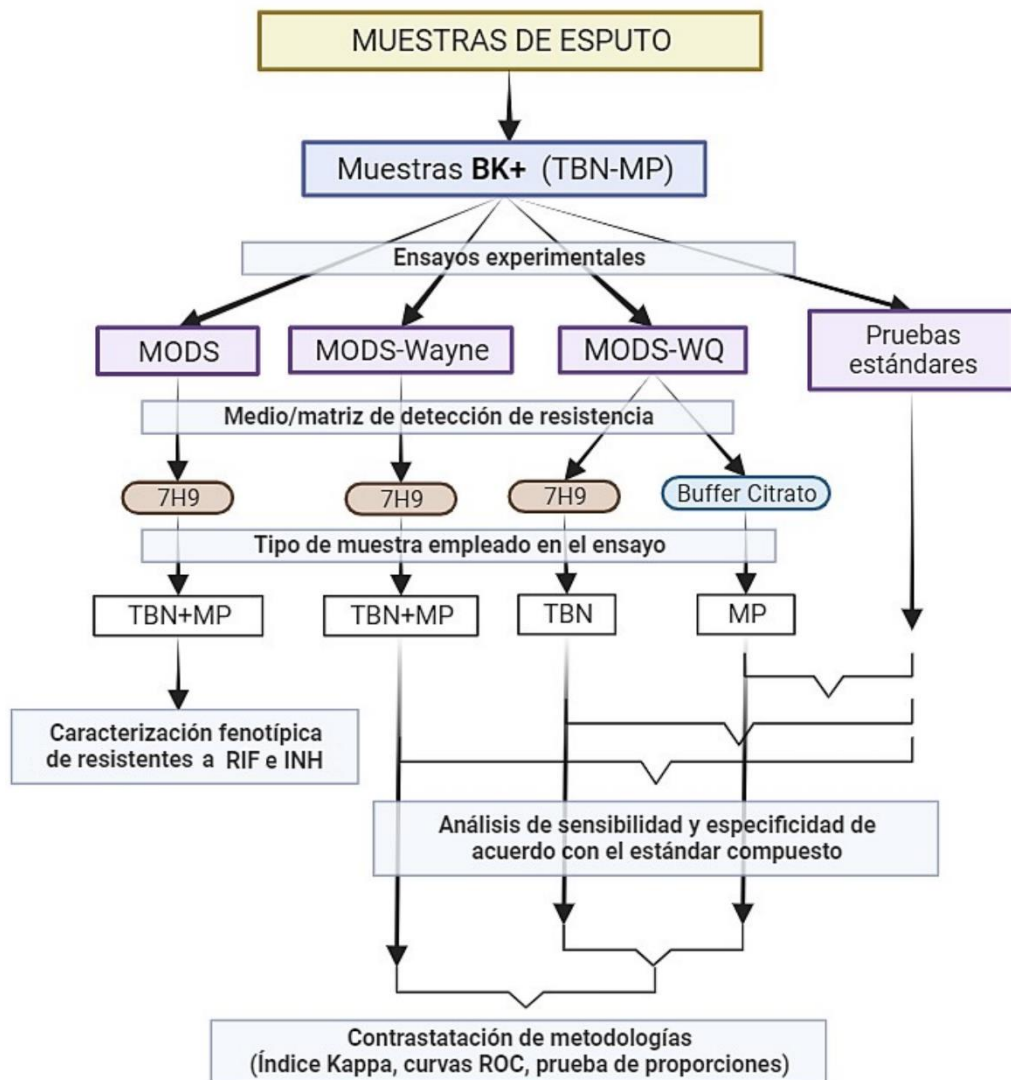
Objetivos específicos:

- ❖ Cuantificar el POA producido por las muestras y determinar un punto de corte cuantitativo en dos matrices: buffer citrato y 7H9.
- ❖ Determinar la sensibilidad y especificidad de las metodologías desarrolladas con buffer citrato y 7H9.
- ❖ Evaluar el efecto de las mutaciones en *pncA* en el POA producido por las muestras.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Diseño de estudio

El estudio ha sido de carácter descriptivo. La evaluación de la hipótesis se realizó mediante la comparación de los datos obtenidos en los grupos de estudio. En el esquema siguiente se detalla el proceso del estudio desde la recolección hasta los análisis (**Figura 9**).



**Figura 9.** Esquema de trabajo durante el estudio. Recolección de muestras, descontaminación, caracterización fenotípica y contrastación de dos metodologías: MODS-Wayne y MODS-WQ para PZA a través de un estándar compuesto. *Creación en Biorender.com*



### 3.2. Tamaño de la población de estudio

Las muestras fueron remanentes de muestras de esputo recolectadas de manera aleatoria entre el año 2015-2018 del Hospital Nacional Dos de Mayo, Hospital Nacional Cayetano Heredia y el Laboratorio de Referencia Regional de Tuberculosis de la Dirección Regional de Salud del Callao, para el estudio “Determinación de resistencia a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* mediante la detección de ácido pirazinoico utilizando tmRNA y nanopartículas magnéticas a partir de muestras de esputo” (Código SIDISI: 64196).

**Tamaño de muestra:** el tamaño de muestra se calculó según la siguiente fórmula:

$$N = \frac{pqz^2}{d^2}$$

Donde:

$p$  = Sensibilidad requerida para el diagnóstico

$q$  = 1- $p$

$Z^2$  = nivel de confianza (1.96)

$d^2$  = Margen de error

$$N = \frac{0.7(0.3)1.96^2}{(0.08)^2}$$

$$N = 126$$

Este tamaño obtenido, fue considerado como el tamaño mínimo con el que se puede representar significativamente a la población de estudio. Sin embargo, en este estudio se logró coleccionar mayor cantidad de muestras, las cuales se detallan en la sección de resultados.

### **3.3. Grupos de estudio**

Los remanentes obtenidos fueron recolectados en dos periodos diferentes. Las muestras codificadas con el código MP fueron recolectadas entre los años 2015 y 2016, mientras que aquellas colectadas entre los años 2017 y 2018, fueron codificadas como TBN. Para este estudio se consideraron las muestras MP del año 2016 y las muestras TBN del año 2017. El ensayo MODS-WQ se realizó bajo dos condiciones o variantes:

- A)** Reacción de Wayne en buffer citrato (MODS-WQ BC)
- B)** Reacción de Wayne en medio 7H9 (MODS-WQ 7H9)

El grupo de muestras codificadas como MP fueron trabajados bajo la condición A (MODS-WQ BC), mientras que las obtenidas posteriormente, TBN, fueron trabajadas bajo la condición B (MODS-WQ 7H9).

### **3.4. Caracterización demográfica de las muestras**

Debido a la naturaleza anónima de las muestras, los únicos datos básicos que se obtuvieron a partir de los centros de salud fueron los datos de edad, sexo y tratamiento, sin embargo, en algunos casos esta información no se pudo obtener, por lo cual quedaron indicadas como N.D.

### **3.5. Caracterización fenotípica de las muestras**

Antes de ser cultivadas, las muestras de esputo fueron descontaminadas para mucolisar la muestra y eliminar la flora comensal presente.

### **3.5.1. Descontaminación de muestras**

Las muestras fueron descontaminadas de acuerdo con el protocolo planteado por Kubica y Kent (32). Cada muestra fue mezclada con una solución 2 % NaLc-NaOH en una relación equivolumétrica 1:1, e incubada a temperatura ambiente durante 15 min (vórtex cada 5 min durante 20 segundos). Posterior a la digestión con NaLc-NaOH se adicionó 10 mL de buffer fosfato pH 6.8. Se homogenizó por inversión y centrifugó (Heraeus X1R Centrifuge Thermo-Scientific, USA) a 3000 g durante 15 min. Finalmente, el pellet se suspendió en 15 mL de medio 7H9 (BD Difco, USA). Los suspendidos se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su siembra.

### **3.5.2. Baciloscopía**

Se realizó un examen de baciloscopía a partir de las muestras descontaminadas, para confirmar su positividad, siendo incluidas en el estudio final todas aquellas que resultaron positivas después de la descontaminación.

### **3.5.3. MODS-Rifampicina (MODS-RIF) y MODS-Isoniazida (MODS-INH)**

Para caracterizar la susceptibilidad a rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) de las muestras MP y TBN, se realizó la prueba de MODS con la metodología ya implementada en el laboratorio.

#### **A. Medio de cultivo para ensayo MODS**

Las muestras descontaminadas fueron cultivadas en medio 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y una mezcla antibiótica PANTA (polimixina B, azlocidina, ácido nalidíxico, trimetoprim y anfotericina B)(66).

### B. Ensayo MODS

En una placa de 24 pocillos se utilizaron 4 pozos por muestra: Pozo control, pozo para RIF (Sigma USA), otro pozo para INH (Sigma USA) y un último pozo para PZA, la cual se añadirá en el ensayo posterior (**Figura 10**). A continuación, se añadieron 900  $\mu$ L de la muestra descontaminada a cada pozo y 100uL de medio 7H9 enriquecido, 100  $\mu$ L de RIF (10  $\mu$ g/mL) y 100uL de INH (4  $\mu$ g/mL), respectivamente. Las concentraciones finales de las drogas fueron 1  $\mu$ g/mL y 0.4  $\mu$ g/mL, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 37°C entre a 7 a 21 días, dependiendo del crecimiento de la micobacteria en los pozos controles.

### C. Lectura de placas

La detección del crecimiento se realizó por observación microscópica utilizando un microscopio invertido, siguiendo el protocolo estandarizado del laboratorio. En un medio líquido, la micobacteria crece inicialmente en forma de pequeñas comas o espirales, posteriormente desarrolla microcolonias (UFC) en forma de cordones que luego muestran un desarrollo irregular conglomerado (67). Un cultivo fue considerado positivo cuando se identificó al menos dos UFCs en el pozo control. Si no se observó crecimiento se repitió la lectura cada dos días desde el día 7 hasta el día 21, luego de lo cual un cultivo fue considerado negativo. Los pozos con INH y

RIF fueron leídos el mismo día que el pozo control fue determinado como positivo en crecimiento. Las muestras positivas en crecimiento que también crecieron en presencia de INH y RIF fueron considerados como MDR-TB. Aquellas muestras con crecimiento en presencia de INH o RIF fueron consideradas monoresistentes. Las muestras con ausencia de crecimiento en INH y RIF fueron consideradas sensibles.

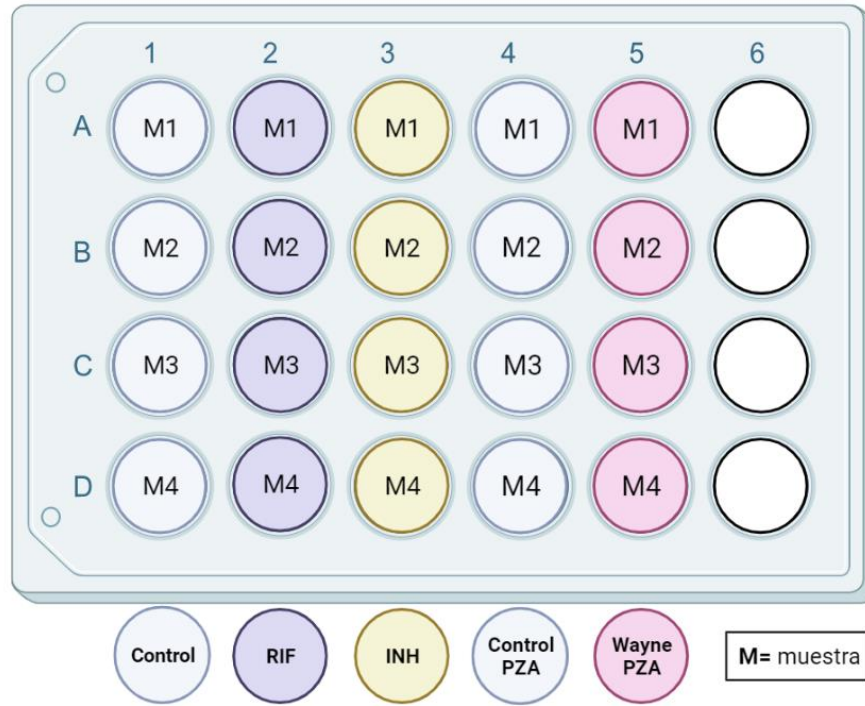
### **3.6. Ensayo MODS-Wayne para PZA**

Para determinar el fenotipo de susceptibilidad a PZA de las muestras, se realizó el método MODS-Wayne cualitativo (MODS-Wayne) desarrollado por Alcántara *et al.* (32), tanto para las muestras MP como las TBN. Con estos resultados se comparó el desempeño de la variante cuantitativa que hemos desarrollado en este estudio. Tanto MODS-Wayne como el MODS-WQ fueron modelados frente al estándar compuesto (combinación de 3 pruebas estándares de referencia)

#### **A. Ensayo MODS-Wayne**

Este ensayo se realizó conjuntamente con los ensayos de MODS para RIF e INH, en la misma placa de 24 pozos. Se utilizaron dos pozos por muestra, el pozo control PZA (PZA-C) y el pozo Wayne (PZA-Wayne), el esquema se puede observar en la **Figura 10**. Se añadieron 900  $\mu$ L de descontaminado a ambos pozos y se incubaron a 37° C al igual que en los ensayos MODS anteriores. Los pozos PZA-C fueron evaluados cada dos días a partir del 5to día de incubación. Cuando se observó crecimiento en el pozo control se anotó el día y después de 3 días se añadió 100  $\mu$ L

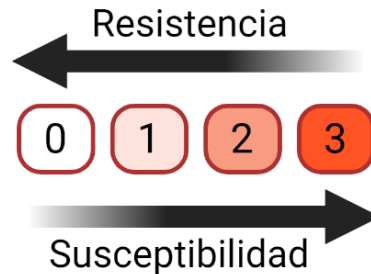
de PZA a los pozos PZA-Wayne a una concentración final de 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Luego se mantuvieron incubando 3 días más con la PZA.



**Figura 10.** Esquema de la placa de cultivo para MODS-RIF, MODS-INH y MODS-Wayne PZA. Se muestra la ubicación de las muestras control RIF y INH, control PZA y las muestras a evaluar. *Creación en Biorender.com*

Al finalizar los 3 días de incubación con PZA, se realizó la lectura colorimétrica de las muestras (sólo se consideraron las muestras cuyo crecimiento en el pozo control sea positivo). Para ello se añadió 100  $\mu\text{L}$  de 10% de SAF, en los pozos Control-PZA y en los pozos Wayne-PZA, se consideró un tiempo de reacción de 5 minutos, luego del cual se observó la formación de una suspensión rojiza en el caso de los cultivos sensibles a PZA, mientras que aquellos que no mostraban coloración, se registraron como resistentes. Debido a que la coloración observada no era uniforme

entra las muestras, se estableció un gradiente de intensidad, que iba desde 0-3, siendo 0 resistente, y 3 muy sensible (**Figura 11**).



**Figura 11.** Gradiente de coloración del medio líquido al finalizar el periodo de incubación. Se estableció 4 niveles de intensidad desde 0 (sin color) hasta 3 (rojo intenso). *Creación en Biorender.com*

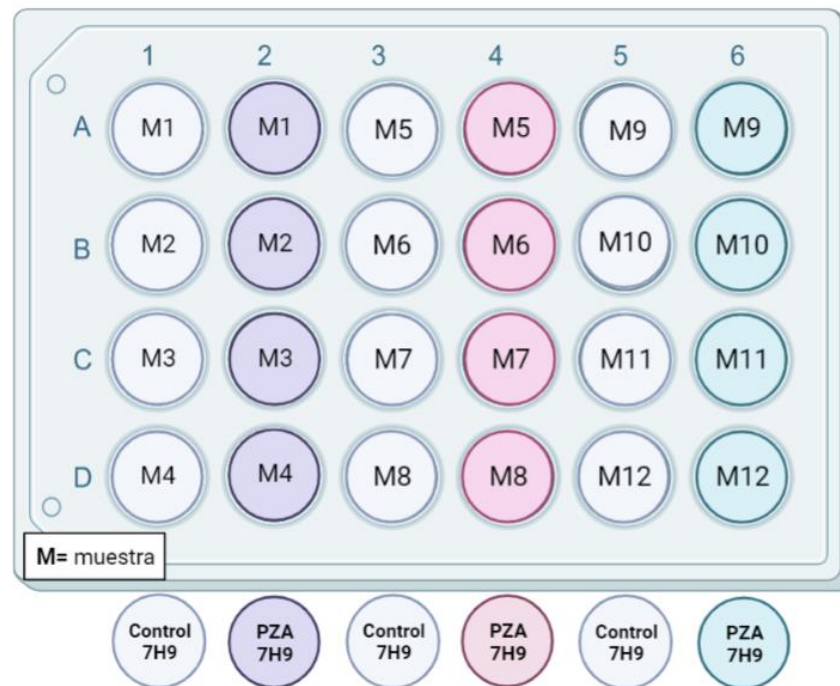
### **3.7. Ensayo de susceptibilidad a PZA con el test MODS-WQ**

Con este ensayo se propuso establecer un formato cuantitativo del MODS-Wayne, con el fin de eliminar la subjetividad del ensayo colorimétrico y así establecer un punto de corte que nos permita discriminar las muestras sensibles de las resistentes de manera más objetiva. El ensayo con el test MODS-WQ se realizó de manera similar al ensayo MODS-Wayne PZA, pero con dos variantes:

#### **3.7.1. Ensayo MODS-WQ en una matriz de Medio Middlebrook 7H9**

Para este ensayo, se trabajó con las muestras TBN ya descontaminadas y suspendidas en el medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC-PANTA. 900  $\mu$ L de las muestras descontaminadas fueron trasladadas a una placa de 24 pocillos, considerándose un pozo control (PZA-C) y un pozo tratado con PZA (PZA-WQ) (**Figura 12**). La placa se dejó incubando a 37° C y se revisó a partir del

día 5 y luego cada dos días hasta observar crecimiento en el pozo PZA-C. A partir de la fecha de crecimiento se incubó 3 días adicionales para aumentar el crecimiento. Seguidamente, añadió 100  $\mu\text{L}$  de 7H9 al pozo PZA-C y 100  $\mu\text{L}$  de PZA (8000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) al pozo WQ-PZA. Se dejó incubando por 3 días adicionales. Terminada la incubación, se añadió SAF al 10% y se consideró un tiempo de reacción de 5 minutos. La reacción entre el POA y SAF produjo una coloración rojiza cuya intensidad depende la concentración de POA producido. 500  $\mu\text{L}$  de estas muestras se trasladaron a criotubos y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior lectura. A estas muestras trabajadas en el medio 7H9, de ahora en adelante denominaremos **MODS-WQ 7H9**.

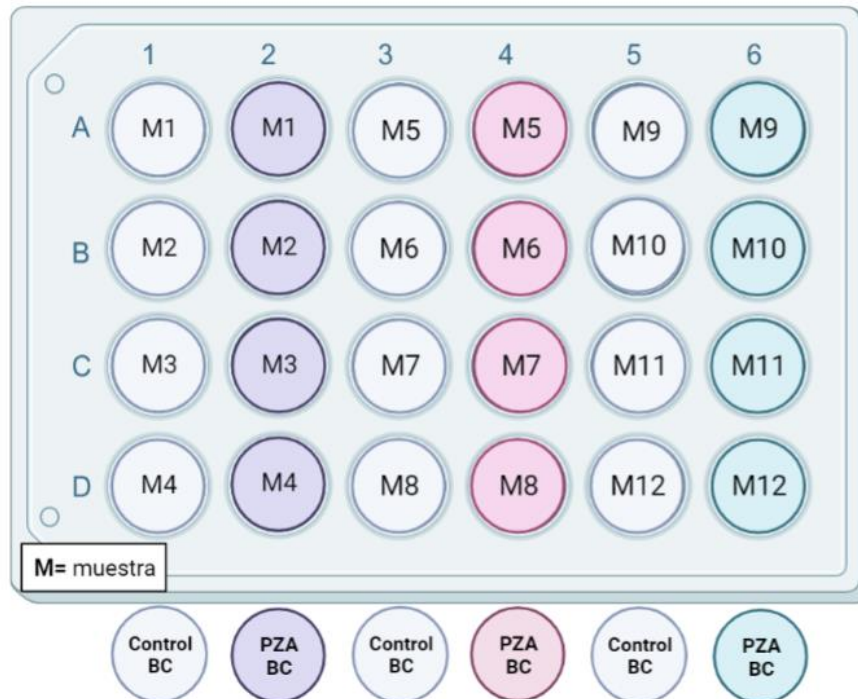


**Figura 12.** Esquema de la placa de cultivo para el ensayo MODS-WQ en matriz de medio 7H9. *Creación en Biorender.com*



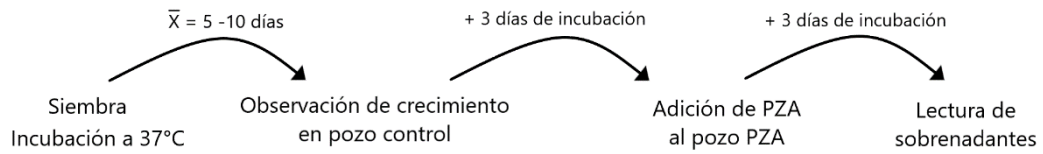
### 3.7.2. Ensayo MODS-WQ en una matriz de buffer Citrato (BC)

Para este ensayo, se trabajó con las muestras MP en una placa de 24 pocillos (Figura 12) y se siguió las mismas directrices del ensayo MODS-WQ 7H9, pero con una modificación. Luego de observar crecimiento en el pozo control, y de incubar por 3 días adicionales, las muestras fueron trasladadas a tubos de 2 mL y se centrifugaron a 13000 rpm por 1 min. El pellet resultante fue suspendido en 900  $\mu$ L de buffer citrato (pH 7.0) y trasladado nuevamente a una placa de 24 pocillos, es decir se realizó un cambio de matriz de cultivo. Luego se agregó 100  $\mu$ L de buffer citrato pH 7.0 al pozo PZA-C y 100  $\mu$ L de PZA (8000  $\mu$ g/mL) al pozo PZA-WQ. Seguidamente se incubó por 3 días más. Terminada la incubación, se añadió SAF al 10%. Finalmente, un volumen de 500  $\mu$ L fue trasladado a criotubos y almacenados a - 80°C, hasta su posterior lectura. A estas muestras trabajadas con buffer citrato, de ahora en adelante denominaremos **MODS-WQ BC**.



**Figura 13.** Esquema de la placa de cultivo para el ensayo MODS-WQ en matriz Buffer Citrato (BC). *Creación en Biorender.com*

Esquema de incubación de las pruebas MODS-WQ:



### 3.7.3. Estandarización de la curva de calibración para cálculo de concentraciones de POA.

#### A. Matriz Medio 7H9

Se prepararon diferentes concentraciones de POA desde 31.25  $\mu\text{M}$  hasta los 4000  $\mu\text{M}$  y un control basal sin POA medio 7H9, de acuerdo con la **Tabla N°2**. El orden de adición de cada reactivo fue: Primero el medio 7H9, seguidamente el stock de POA y al final SAF al 10%.

Una vez mezclados los reactivos, se centrifugó cada tubo a 14000 rpm por 2 minutos para precipitar cualquier suspensión formada en la reacción.

Los sobrenadantes fueron trasladados a una placa de 96 pocillos (100  $\mu\text{L}$ ) por duplicado para luego ser leídos al espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Ambos ensayos se realizaron por triplicado para ver la reproducibilidad del método.

#### B. Matriz Buffer Citrato

Igualmente, se prepararon diferentes concentraciones de POA, en 10 mM de buffer citrato pH 7.0 en un volumen de 500  $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf de 1.5mL, de acuerdo con la **Tabla N°3**. A estos se les agregó SAF al 10% y una vez homogenizados, fueron trasladados a una placa de 96 pocillos (100  $\mu\text{L}$ ) por duplicado para luego ser

leídos al espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Este ensayo se realizó por triplicado.

**Tabla 2. Concentraciones de la curva estándar de POA en 7H9-OADC**

<b>STOCK POA (mM)</b>	<b>VOL POA (μL)</b>	<b>VOL 7H9-OADC (μL)</b>	<b>CONC. POA final (μM)</b>	<b>SAF 10% (μL)</b>
<b>40</b>	50	400	4000	50
<b>20</b>	50	400	2000	50
<b>10</b>	50	400	1000	50
<b>5</b>	50	400	500	50
<b>2.5</b>	50	400	250	50
<b>1.25</b>	50	400	125	50
<b>0.625</b>	50	400	62.5	50
<b>0.312</b>	50	400	31.25	50
<b>0 (Agua)</b>	50	400	0	50

**Tabla 3. Concentraciones de la curva estándar de POA en Buffer citrato**

<b>STOCK POA (mM)</b>	<b>VOL POA (μL)</b>	<b>VOL Buffer citrato (10mM, pH 7.0) (μL)</b>	<b>CONC. POA final (μM)</b>	<b>SAF 10% (μL)</b>
<b>40</b>	50	400	4000	50
<b>20</b>	50	400	2000	50
<b>10</b>	50	400	1000	50
<b>5</b>	50	400	500	50
<b>2.5</b>	50	400	250	50
<b>1.25</b>	50	400	125	50
<b>0.625</b>	50	400	62.5	50
<b>0.312</b>	50	400	31.25	50
<b>0 (Agua)</b>	50	400	0	50

### **3.7.4. Lectura y cuantificación de POA en muestras de MODS-WQ**

#### **A. Matriz en 7H9**

Los sobrenadantes de las muestras en medio 7H9-OADC + SAF10%, ya centrifugadas, fueron trasladados a una placa de 96 pocillos (100  $\mu$ L) por duplicado. Fueron leídas a 450nm de longitud de onda en un espectrofotómetro, con lo cual se obtuvieron diferentes valores de absorbancia por cada concentración.

#### **B. Matriz en Buffer citrato**

Las muestras en buffer citrato, no requirieron centrifugación y se colocaron directamente en las placas de 96 pocillos (100  $\mu$ L) por duplicado. Igualmente, las lecturas se realizaron a 450nm de longitud de onda en el espectrofotómetro.

Los valores de absorbancia fueron graficados en una curva estándar y los valores de POA en  $\mu$ M fueron interpolados de la ecuación de regresión lineal derivada de la curva estándar, de acuerdo a la matriz de cultivo (Citrato o 7H9). La ecuación se calculó a través del análisis de regresión lineal simple, con el cual también se obtuvo la R cuadrada (bondad de ajuste) y los intervalos de confianza al 90%.

### **3.8. *Cultivo de M. tuberculosis para pruebas estándares***

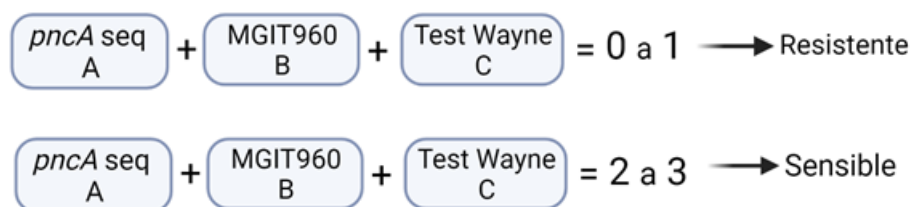
#### **3.8.1. Aislamiento de M. tuberculosis en cultivo sólido**

MTB fue aislado en agar Middlebrook 7H10 (DB Difco, USA) enriquecido con OADC a partir de 100  $\mu$ L de los pozos control del test MODS-Wayne. Estos volúmenes de cada muestra fueron sembrados por dispersión en agar 7H10 e incubados a 37°C durante 21 a 28 días El resto de volumen del cultivo del pozo

control fue almacenado a 4°C como back-up. Los cultivos en agar 7H10 fueron utilizados para la extracción de DNA genómico, el ensayo de Wayne convencional, y cultivo en BACTEC MGIT960 PZA.

### 3.8.2. Prueba estándar compuesta

Debido a la ausencia de una única prueba estándar de referencia, se trabajó con un **estándar compuesto**, basado en tres pruebas: (i) el ensayo de Wayne convencional (ii) el sistema BACTEC MGIT960 PZA y (iii) el secuenciamiento del gen *pncA*. Cuando una muestra resultó sensible en algún ensayo, se codificó como 1 (uno), mientras que las muestras con resultado resistente fueron codificadas como 0 (cero). Una vez caracterizadas todas las muestras para cada prueba estándar, se calculó el **estándar compuesto**: siendo las muestras *resistentes* aquellas que sumaron 0 ó 1, mientras que fueron consideradas *sensibles* aquellas que sumaron 2 ó 3. (**Figura 14**)



**Figura 14.** Cálculo del estándar compuesto. Si la suma de las tres pruebas resulta 0-1, la muestra es resistente a PZA, mientras que si la suma resulta 2-3, la muestra es sensible al fármaco. *Creación en Biorender.com*

#### A. Ensayo de Wayne Convencional

Una a dos asadas de cultivo de TB de 21 días fue transferida a un tubo conteniendo agar Dubos (DB Difco, USA) e incubados a 37 °C durante 7 días. Pasado los 7 días, se agregó 1 mL de 1% sulfato de amonio ferroso para revelar la producción de POA. Se permite al sulfato de amonio ferroso reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Si se forma un anillo de coloración rosácea en la superficie del medio, el cultivo es positivo a la producción de POA. Los tubos en los que no se observó la aparición de un anillo fueron puestos a 4 °C durante 3 horas, posterior a las cuales se realizó la lectura nuevamente. Aquellos tubos donde no se observó la aparición de un anillo luego de la incubación a 4 °C fueron considerados negativos para la producción de POA.

Para todos los ensayos se utilizaron como control positivo un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (sensible a PZA), como control negativo un cultivo de *M. tuberculosis* DM97; y como control de esterilidad un medio sin inóculo bacteriano.

#### B. MGIT960

A partir de cultivos de MTB en medio 7H10 de 14 días se realizó una suspensión en medio 7H9 con una turbidez comparable al tubo N° 0.5 de McFarland. A partir de esta suspensión se realizaron dos diluciones: (i) dilución 1:5, para lo cual 1 mL de la suspensión 0.5 McFarland fue disuelto en 4 mL de solución salina fisiológica, (ii) dilución 1:10, donde 0.5 mL de la suspensión 0.5 McFarland fue disuelto en 4.5 mL solución salina fisiológica.

Las muestras fueron sembradas en 2 tubos de MGIT, conforme a las instrucciones del fabricante: (i) el primer tubo fue considerado control de crecimiento, donde se sembró 0.5 mL de la dilución 1:10, y (ii) el segundo tubo fue destinado al ensayo

de susceptibilidad, en el cual se sembró 0.5 mL de la dilución 1:5 con 100 µg/mL de PZA. Los tubos fueron incubados en el equipo BACTEC MGIT960. Los resultados fueron reportados basándose en la comparación de fluorescencia entre el tubo control y el tubo con PZA, en un rango de 4 a 21 días.

### C. Secuenciamiento del gen *pncA*

El gen *pncA* fue secuenciado con el objetivo de determinar mutaciones relacionadas a resistencia a PZA tanto en la secuencia codante como en el promotor putativo (34).

#### **Extracción de DNA genómico**

Una asada de cultivo de MTB en agar 7H10 fue suspendida en 500 µL de buffer TE pH 8.0 e inactivada por calor a 80 °C durante 20 min. Al aislado inactivado, se agregó 50 µL de lisozima 100 mg/mL (Sigma, USA) y se incubó a 37 °C *overnight* en agitación. Luego se agregó 20 mg/mL proteinasa K (Invitrogen, USA) y 20 % SDS (Bio-Rad, USA) y se incubó a 65 °C durante tres horas con agitación en vórtex cada 20 min. Posteriormente, se adicionó 100 µL de CTAB-NaCl y 100 µL de 5 M NaCl (Merck, USA) y se incubó a 65 °C durante 10 min. Luego se añadió 700 µL de una mezcla 25:24:1 de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Thermo Scientific, USA) y se mezcló por inversión. La mezcla fue centrifugada a 10000 rpm durante 10 min, recuperándose la fase acuosa.

A la fracción recuperada se le agregó 700 µL de una solución 24:1 de cloroformo: alcohol isoamílico, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, recuperándose la fase acuosa. El ADN genómico fue precipitado mediante la adición de 1 mL de alcohol absoluto frío (Fisher Scientific, USA) dejándose a - 70

°C durante 30 min. Inmediatamente después, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de alcohol 70° frío.

Finalmente, se centrifugó a 13000 rpm por 1 min, el pellet fue secado a temperatura ambiente y suspendido en buffer TE. La integridad del ADN genómico fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa 0.8 %, llevada a cabo con un voltaje de 70 V durante 45 min. Como marcador se utilizó Lambda (NEB, UK). La visualización de las bandas se realizó con tinción con bromuro de etidio en transiluminador (Clever Scientific LTD, USA).

#### **Amplificación del gen *pncA***

El gen *pncA* fue amplificado con los primers P1 (5'-GTCGGTCATGTTTCGCATCG-3') y P6 (5'-GCTTTGCGGCGAGCGCTCCCA-3').

El primer P1 alinea a 105 pb *upstream* de *pncA*, en tanto que P6 alinea a 60 pb *downstream* del gen. Las reacciones de amplificación se desarrollaron utilizando 0.03 U/ $\mu$ L de Taq polimerasa (Thermo Scientific, USA) con 0.5  $\mu$ M de primers y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Las reacciones de amplificación fueron realizadas siguiendo las siguientes condiciones (**Tabla N° 4**):

<b>Tabla 4. Condiciones de ciclaje para amplificación de <i>pncA</i></b>			
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (seg.)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	94	240	1
<b>Desnaturalización</b>	94	45	
<b>Alineamiento</b>	58	60	30
<b>Elongación</b>	72	60	
<b>Desnaturalización final</b>	94	300	1



Los productos de amplificación fueron analizados en gel de agarosa 1 % para verificar la especificidad de la amplificación. La corrida se llevó a cabo a voltaje constante de 70 V durante 45 min. Se utilizó como marcador 1 Kb ladder (ThermoScientific, USA).

#### **Secuenciamiento del producto de PCR *pncA***

El producto de amplificación de los aislados clínicos y una cepa estándar sensible a PZA (*M. tuberculosis* H37Rv) fueron secuenciados por MacroGen Inc. usando los primers P1 y P6. Se evaluó la presencia de mutaciones tanto en la secuencia de *pncA* como del promotor putativo (upstream hasta la posición -30). El programa CLC *sequence viewer* fue usado para el análisis de los resultados del secuenciamiento. La secuencia wild type de *pncA* de *M. tuberculosis* H37Rv fue utilizada como referencia. Las mutaciones halladas fueron comparadas con las reportadas en la base de datos *Tuberculosis Drug Resistance Mutation Data* (35).

#### **4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Rango o categoría</b>
<b>Edad</b>	Edad de los pacientes con tuberculosis confirmada	cuantitativa	18-75
<b>Sexo</b>	Sexo de los pacientes con tuberculosis	Cualitativa dicotómica	Masculino Femenino
<b>Tratamiento</b>	Información sobre el inicio de un plan farmacológico contra la tuberculosis	Cualitativa dicotómica	Tratado No tratado
<b>Valor de susceptibilidad</b>	Identificación de la susceptibilidad a drogas como la RIF, INH y PZA	Cualitativa Dicotómica	Sensible Resistente

<b>Multidrogoresistencia</b>	Identificación de resistencia a RIF e INH	Cualitativa dicotómica	Sí No
<b>Nivel de susceptibilidad</b>	Es la escala colorimétrica que indica el grado de sensibilidad a PZA en el ensayo MODS-Wayne	Cualitativa politómica	0 1 2 3
<b>Matriz de detección</b>	Es el medio líquido en el cual los aislados se incuban con PZA hasta la detección del POA	Cualitativa dicotómica	Medio 7H9 Buffer Citrato
<b>Concentración de POA</b>	Es la cantidad de POA producido por una muestra, por volumen de medio líquido en $\mu\text{M}$	Cuantitativa	0-8000 $\mu\text{M}$
<b>Fenotipo de la muestra</b>	Identificación de mutaciones en el gen/proteína <i>pncA</i> /PZasa que conferirán o no resistencia a PZA	Cualitativa	WT Mutante

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las variables continuas se expresaron como medianas e Intervalos de confianza al 95% (IC95%), la dispersión se expresó en rangos intercuartílicos (RIC). Las comparaciones simples se llevaron a cabo utilizando test no paramétrico de Mann-Whitney siendo significativas aquellas con un  $p < 0.05$ . Para evaluar el valor predictivo o diagnóstico del ensayo MODS-Wayne cualitativo, se realizó el análisis de contingencia con datos categóricos (tabla 2x2), con el cual se calculó la sensibilidad y especificidad y los valores predictivos positivos y negativos (PPV y NPV). Para evaluar el poder diagnóstico del MODS-WQ se utilizó el modelo de regresión logística para calcular la curva ROC, la sensibilidad y la especificidad de la prueba y el área bajo la curva (AUC). En ambos ensayos, se calcularon los intervalos de confianza al 95% utilizando el test de Wilson-Brown.

La contrastación de hipótesis se realizó con el Test de proporciones de una sola muestra:

$H_0$ = El ensayo MODS-WQ para determinar la susceptibilidad a PZA no superará el 75 % de sensibilidad.

$H_1$  = El ensayo MODS-WQ para determinar susceptibilidad a PZA superará el 75 % de sensibilidad.

El grado de concordancia entre el test evaluado y el test estándar se calculó con el índice Kappa usando las tablas de contingencia 2x2 en la plataforma GraphPad QuickCalc. Las concentraciones de POA se calcularon a través de una regresión lineal simple.

Todos estos análisis fueron realizados con ayuda de GraphPad Prism 9.0.2. y STATA14. Por último, el análisis de mutaciones en la estructura 3D de proteína pirazinamidas (PDB ID: 3pl1) se realizó con el software Pymol 2.5.4 de licencia educativa.

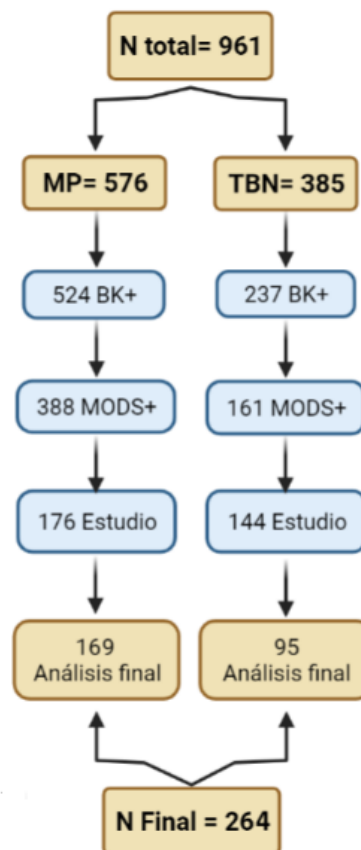
## **6. ASPECTOS ÉTICOS**

El presente trabajo es un derivado del estudio global titulado: “Determinación de resistencia a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* mediante la detección de ácido pirazinoico utilizando tmRNA y nanopartículas magnéticas a partir de muestras de esputo” (Código SIDISI: 64196). Este trabajo fue aprobado Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, bajo la categoría de revisión EXENTO (Constancia 331-34-21).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Características de las muestras estudiadas

Hasta la finalización de este estudio se recolectaron 576 muestras MP entre 2015 y 2016 y 385 muestras TBN en el año 2017 (**Figura 15**). Solo se trabajó con muestras BK positivas de los descontaminados, los cuales representaron el 91% en de las muestras MP, mientras que de las muestras TBN resultaron el 62% de las muestras. Estas muestras positivas fueron cultivadas en medio líquido para el ensayo de MODS, de las cuales 388 MP y 161 TBN resultaron con crecimiento positivo en el pozo control. Finalmente, se seleccionaron 176 muestras MP y 144 muestras TBN para estudios posteriores, de los cuales 169 MP y 95 TBN fueron los números de muestra con resultados válidos para el trabajo final.



**Figura 15.** Esquema de trabajo y recolección de las muestras para el estudio. De 961 muestras recolectadas, 264 fueron trabajadas en el estudio final.

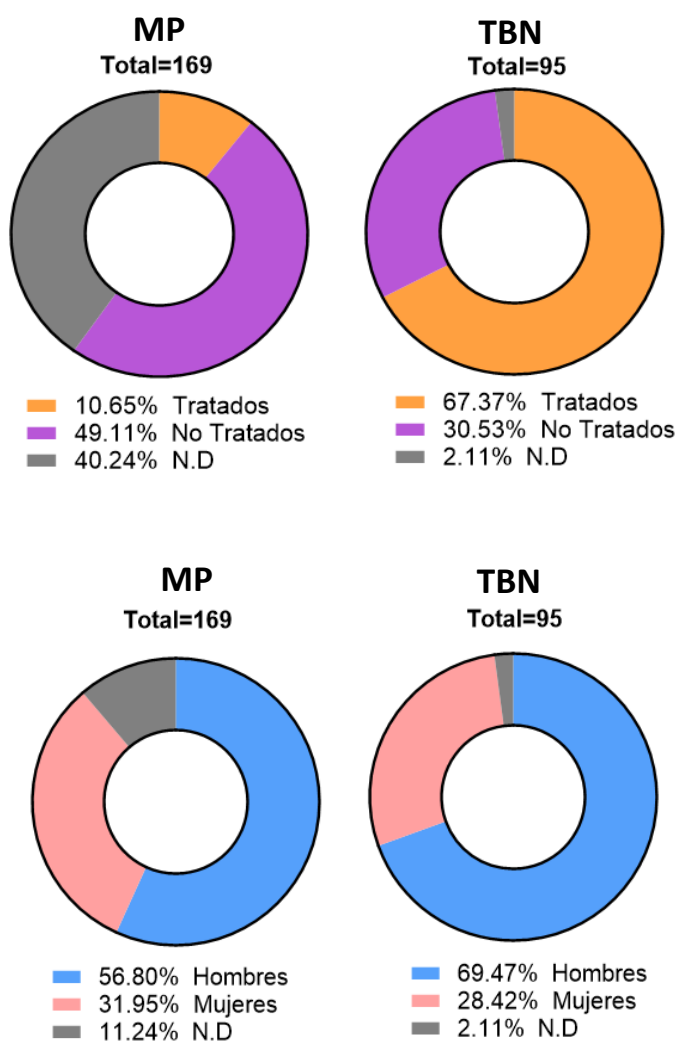
Las muestras de ambos grupos no difieren significativamente en cuanto edad y sexo, ya que, ambos grupos se encuentran representados en su mayoría por pacientes hombres, siendo en proporción el doble que mujeres (**Tabla 5, Figura 16**), sin embargo, al comparar la proporción de hombres en MP y TBN, se observa una diferencia significativa ( $p=0.048$ ), no obstante, este resultado es discutible ya que existe una proporción de la población cuyo sexo no fue determinado. Considerando sólo la población conocida de hombres y mujeres, el valor  $p$  resultante es no significativo ( $p=0.3271$ ). En cuanto a pacientes que iniciaron tratamiento y los que no, se observa que, de acuerdo con la información recopilada, en el grupo MP solo el 11.00% de pacientes había recibido tratamiento al inicio del estudio, mientras que un 40% no pudo ser determinado. En el grupo TBN, el 67.00% si lo había recibido, mientras que sólo un 2.0% no fue determinado.

**Tabla 5.** Características de las poblaciones de estudio

	<b>MP N=169</b>	<b>TBN N= 95</b>	<b>Valor <math>p</math></b>
<b>Edad (años), mediana (95%IC)</b>	36 (30-38)	29 (26-39)	0.3118
<b>Sexo, n (%)</b>			
<b>Masculino</b>	96 (57)	66 (69)	0.0486*
<b>Femenino</b>	54 (32)	27 (31)	0.5795
<b>N.D</b>	19 (11)	2 (2)	0.0081
<b>Tratamiento, n (%)</b>			
<b>No tratado</b>	83 (49)	29 (31)	0.0055
<b>Tratado</b>	18 (11)	64 (67)	0.0001
<b>N.D</b>	68 (40)	2 (2)	0.0042

Para analizar el parámetro edad se utilizó el test estadístico no paramétrico Mann-Whitney y su IC95%. Tanto el sexo como el tratamiento fueron analizados usando el test exacto de Fisher.

\*  $p$ - value considerando la población total, incluyendo los No Determinados (N.D)



**Figura 16.** Características de las poblaciones de estudio

## 7.2. Caracterización fenotípica de las muestras

Las muestras positivas en baciloscopia fueron sembradas para iniciar los ensayos de susceptibilidad a rifampicina, isoniazida y pirazinamida.

### 7.2.1. MODS-Rifampicina (MODS-RIF) y MODS-Isoniacida (MODS-INH)

De las 264 muestras trabajadas, se reportaron 78 (29.54 %), muestras con fenotipo MDR, es decir resistentes para rifampicina e isoniazida, de las cuales 52 (30.77%)

fueron MDR en el grupo MP y 26 (27.37 %) en el grupo TBN. Las muestras no-MDR (n=186, 70.45 %), están constituidas por aquellas sensibles a ambos fármacos y las muestras monoresistentes a uno solo de los fármacos. Siendo las monoresistentes a INH (n=26) un 9.8 % del total de las muestras y las monoresistentes a RIF (n=15), un 5.7 %, por lo tanto, las muestras sensibles constituyeron el 55.30 % (n=145) de las 264 muestras.

### ***7.3. Pruebas para calcular el estándar compuesto***

La susceptibilidad a PZA de cada muestra fue evaluada con 3 métodos: Wayne convencional, secuenciamiento del gen *pncA* y con la prueba fenotípica MGIT960. Tal y cómo se ha descrito en la sección de métodos, a cada método se le asignó un valor de susceptibilidad, siendo 0 si la muestra resultó resistente y 1 si resultó sensible (**Figura 13**). De esta manera, el resultado final de susceptibilidad estuvo dado por la suma de los valores en cada prueba o método.

#### **7.3.1. Prueba de Wayne convencional**

Los aislados fueron sembrados en agar solido para realizar la prueba de Wayne convencional. Se obtuvo como resultado 83 (87.4 %) aislados sensibles a PZA y 12 (12.6 %) resistentes en el grupo de TBN (n=95), mientras que en el grupo MP (n=169), 137 (81.1 %) aislados fueron sensibles y 32 resistentes (18.9 %).

En la **figura 17** se puede observar 3 muestras (2 TBN y 1 MP) en comparación con una cepa sensible (H37Rv), una cepa resistente (DM97) y un tubo control negativo (ninguna cepa).



CN: Control negativo  
 H37RV: Cepa control sensible  
 DM97: Cepa control resistente  
 TBN: código cepa grupo 7H9  
 MP: código cepa grupo Buffer Citrato

**Figura 17.** Test convencional de Wayne. Se observa en las muestras TBN 233 y MP192, la formación de coloración rojiza que indica sensibilidad a PZA. Mientras que las muestras TBN077 no muestra coloración, siendo una muestra resistente.

### 7.3.2. BACTEC MGIT960 PZA

Los aislados fueron evaluados en cultivo líquido con la prueba de BACTEC MGIT960. Se obtuvo como resultado 80 (84.2 %) aislados sensibles a PZA y 15 (15.8 %) resistentes en el grupo de TBN (n=95), mientras que en el grupo MP (n=169), 122 (72.2 %) aislados fueron sensibles y 47 resistentes (27.8 %).

### 7.3.3. Secuenciamiento del gen *pncA*

La resistencia a la pirazinamida (PZA<sup>r</sup>) se debe en gran medida a mutaciones en la enzima pirazinamidasa (*pncA*), debido a su función catalítica de transformar PZA a su principio activo (POA), pero la heterogeneidad genética (**Figura 6**) ha impedido el desarrollo de una prueba de diagnóstico molecular fidedigna.



El año 2021, la OMS creó un catálogo de mutaciones con información de 38 215 aislados con información de resultados de pDST, WGS y análisis bioinformáticos (68). De acuerdo con este catálogo, las mutaciones que se asociaron con la resistencia fenotípica a la PZA tuvieron una sensibilidad de sólo el 72.3 % (IC95 %, 70.5–74.2%), debido a la gran cantidad de posibles mutaciones de resistencia a lo largo del gen. Por otro lado, se han desarrollado herramientas bioinformáticas que pueden predecir el efecto de una mutación en la estructura 3D de la proteína (**Figura 18**). Mediante inteligencia artificial y *machine learning*, se entrenó un algoritmo capaz de predecir con precisión (80.1% correctamente clasificados) mutaciones resistentes en *pncA* (69).

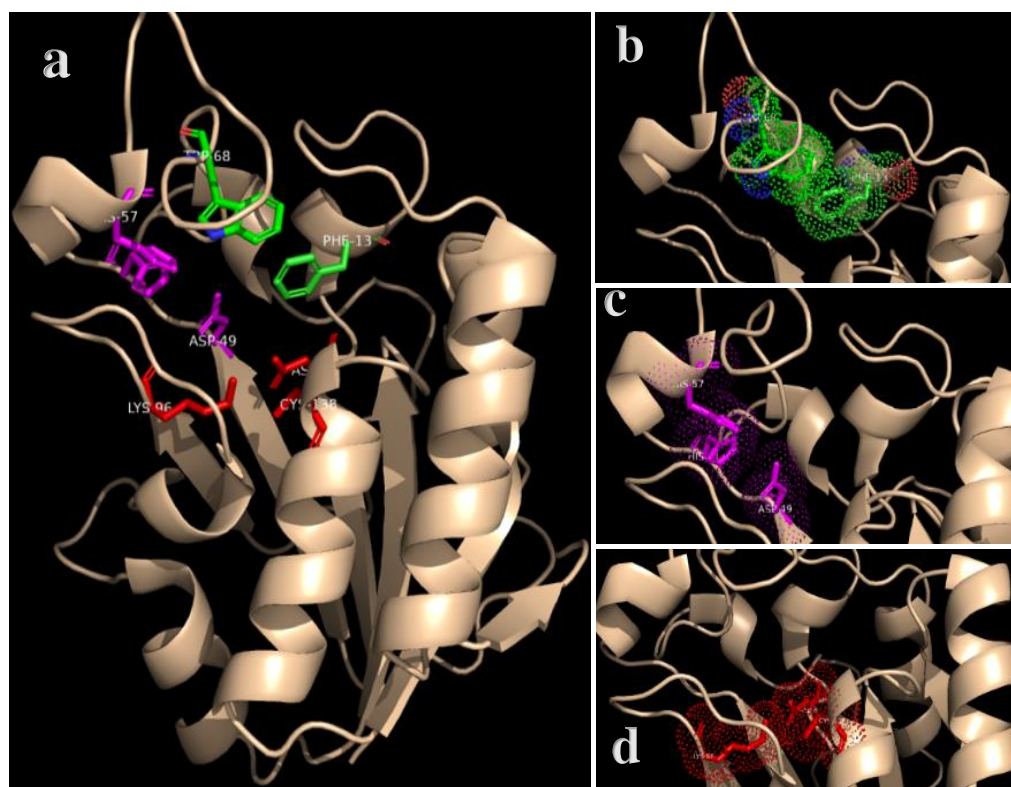
Usando la información de ambas herramientas, catálogo y algoritmo, se categorizó cada una de las mutaciones encontradas en los aislados (**Tabla N° 6**). En total se obtuvieron 187 aislados *wild type* (TBN: n=71 y MP: n= 116), es decir, que no presentaron mutación en el gen *pncA*. Estas muestras fueron clasificadas como fenotípicamente sensibles, aunque es importante mencionar que podrían existir otros factores que confieran PZA<sup>r</sup> en un aislado con actividad PZasa totalmente funcional.

En el grupo TBN se determinaron 22 cepas con mutaciones resistentes y una cepa con mutación sensible (A30T), mientras que en el grupo MP se encontraron 47 mutaciones todas ellas de tipo resistente. De las 69 mutaciones encontradas, una (1.5%) afecta al sitio promotor, 1 (1.5%) al sitio catalítico, 4 (5.8%) al sitio de unión al metal, 5 (7.3%) se encuentran en la periferia y 6 (8.7%) afectan al *core* de la enzima. De estas mutaciones, encontramos 16 puntuales, dos deleciones y una inserción. No se observaron mutaciones en el sitio de unión a PZA (PBS)

**Tabla 6.** Categorización y caracterización de las mutaciones encontradas en el estudio.

Mutación	N° Muestras		Ubicación en la enzima	Fenotipo susceptibilidad		Susceptibilidad Final
	TBN	MP		WHO	SuspectPZA	<i>pncA seq</i>
I6S	-	2	EC	Uncertain	R	R
D8E	2	2	ACS	A w RI	R	R
Q10P	-	2	EC	A w R	R	R
Q10R	2	12	EC	A w R	R	R
A30T	1	-	Periferia	-	S	S
K48T	3	6	EC	Uncertain	R	R
D49N	2	1	MBS	A w RI	R	R
H51R	-	12	MBS	A w R	R	R
H57L	3	-	MBS	-	R	R
H57R	-	1	MBS	A w R	R	R
P62S	-	1	Loop	A w RI	R	R
H71R	-	2	EC	A w R	R	R
F81S	5	2	Periferia	Uncertain	R	R
H82D	1	-	Periferia	Uncertain	R	R
V180F	3	-	Periferia	A w R	R	R
Prom A-11G	-	1	Promotor	A w R	-	R
407insA/461insA	1	-	EC	A w RI	-	R
Δ456-466	-	3	Periferia	A w RI	-	R
Δ375-389	-	1	Periferia	A w R	-	R
WT	71	116		S	S	S

EC: Core enzimático, ACS: Sitio activo catalítico, MBS: Sitio de unión al metal. R: resistente; S: sensible; Uncertain: asociación ambigua, A w R: asociado a resistencia, A w RI: asociado a resistencia intermedia



**Figura 18.** A) Estructura tridimensional de la proteína pirazinamidasa (*pncA*), se observa las tres principales regiones activas de la proteína. B) Verde: sitio de unión a PZA conformado por los aminoácidos Phe13 y Trp68. C) Púrpura: Sitio de unión al metal ( $Fe^{+}$ ) conformado por Asp49, His51 e His57. D) Rojo: Triada catalítica o sitio activo catalítico, conformada por Asp8, Lys96 y Cys138.

**Resumen de resultados de los 3 estándares utilizados:**

<b>Tabla 7. Resumen de resultados de las 3 pruebas estándares</b>						
	MP			TBN		
	Wayne	MGIT960	Secuencia	Wayne	MGIT960	Secuencia
<b>Sensible</b>	137	122	116	83	80	71
<b>Resistente</b>	32	47	48	12	15	22
<b>Total</b>	169	169	163*	95	95	93*

\* Algunas muestras no pudieron ser secuenciadas adecuadamente

### 7.3.4. Estándar compuesto

Una vez obtenido los resultados de susceptibilidad en cada una de las 3 pruebas, se procedió a calcular la susceptibilidad *compuesta* de cada aislado.

Como resultado se obtuvieron: 79 (83.2 %) aislados sensibles a PZA y 16 (16.8 %) resistentes en el grupo de TBN (n=95), mientras que en el grupo MP (n=169), 123 (72.8 %) aislados fueron sensibles y 46 resistentes (27.2 %) (**Tabla N°8**)

Los resultados del estándar compuesto se utilizaron como estándar para el cálculo de susceptibilidad y especificidad de las pruebas estudiadas.

**Tabla 8. Resultados de susceptibilidad a PZA de acuerdo con el estándar compuesto**

Fenotipo	Valor	Estándar compuesto			
		MP (169)		TBN (95)	
		n (%)	N Total (%)	n (%)	N Total (%)
Resistente	0 (%)	30 (17.8)	46 (27.2)	8	16 (16.8)
	1 (%)	16 (9.5)		8 (8.4)	
Sensible	2 (%)	10 (5.9)	123 (72.8)	10	79 (83.2)
	3 (%)	113 (66.9)		69 (72.6)	

### 7.4. Ensayo MODS-Wayne para PZA

La reacción del MODS-Wayne se clasificó con una escala del 0 al 3, siendo positiva o sensible si se observó una coloración rojiza (1, 2 ó 3) y si no se observa coloración (0), la reacción fue negativa o resistente. Durante la ejecución de este ensayo se observó la posible contaminación de 5 aislados con coloraciones rojizas muy fuertes

que discrepaban de su resultado Wayne en medio sólido. Estos aislados fueron eliminados del análisis. El número de muestras por cada escala se observa en la **Tabla N° 9.**

**Tabla 9. Resumen de los resultados de susceptibilidad a PZA de acuerdo con MODS-Wayne.**

Fenotipo	Escala	MODS-Wayne			
		MP (164)		TBN (95)	
		N (%)		N (%)	
<b>Resistente</b>	0 (%)	41 (24.26)	41 (24.26)	15 (15.79)	15 (15.79)
	1 (%)	17 (10.06)		42 (44.2)	
<b>Sensible</b>	2 (%)	40 (23.67)	128 (75.74)	28 (29.47)	80 (84.21)
	3 (%)	66 (42.01)		10 (10.53)	

#### 7.4.1. Sensibilidad y especificidad del MODS-Wayne para PZA

Las muestras fueron agrupadas en sensibles y resistentes, pero esta vez de acuerdo con el estándar compuesto. Con estos resultados, se construyó una tabla de contingencia 2x2 para determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo MODS-Wayne con las muestras MP (**Tabla N°10**) y las muestras TBN (**Tabla N°11**)

Muestras MP	Resistentes	Sensibles
	Std. compuesto	Std. compuesto
Resistentes coloración	36	5
Sensibles coloración	5	118

Muestras TBN	Resistentes	Sensibles
	Std. compuesto	Std. compuesto
Resistentes coloración	10	5
Sensibles coloración	6	74

Con estos datos se calculó una sensibilidad del 87.8% (IC95% 0.7446 - 0.9468, Wilson-Brown test) y una especificidad de 95.9% (IC95% 0.9084 - 0.9825) en el grupo MP, mientras que en TBN se obtuvo 62.5% (IC95% 0.3864 - 0.8152, Wilson-Brown test) de sensibilidad y 93.7% de especificidad (IC95% 0.8603 – 0.9727).

## 7.5. Ensayo MODS-WQ

### 7.5.1. Curva estándar de POA en medio 7H9 y Buffer citrato

Con las diferentes concentraciones de POA (**Figura 19 y 20**) y las absorbancias (Abs) obtenidas, se realizó un análisis de regresión lineal para predecir la ecuación lineal general de la recta y de esa manera interpolar las concentraciones de POA en  $\mu\text{M}$ .



**Figura 19.** Curva estándar con 8 concentraciones de POA en medio 7H9



**Figura 20.** Curva estándar con 8 concentraciones de POA en Buffer Citrato

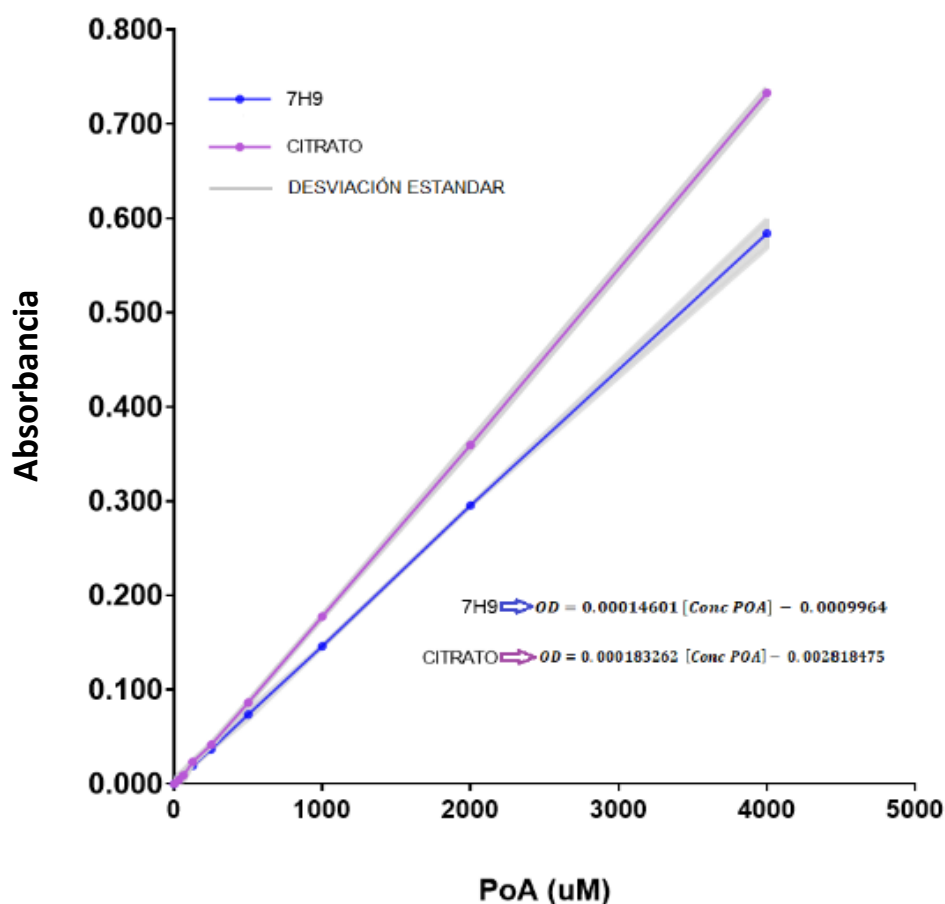
La fórmula para calcular la concentración de POA ( $\mu\text{M}$ ) en 7H9, fue la siguiente:

$$Abs = 0.00014601 [Conc POA] - 0.0009964$$

La ecuación para calcular la concentración de POA ( $\mu\text{M}$ ) en Buffer citrato, fue la siguiente:

$$Abs = 0.000183263 [Conc POA] - 0.002818475$$

**Curva estándar para PoA en dos matrices de cuantificación**

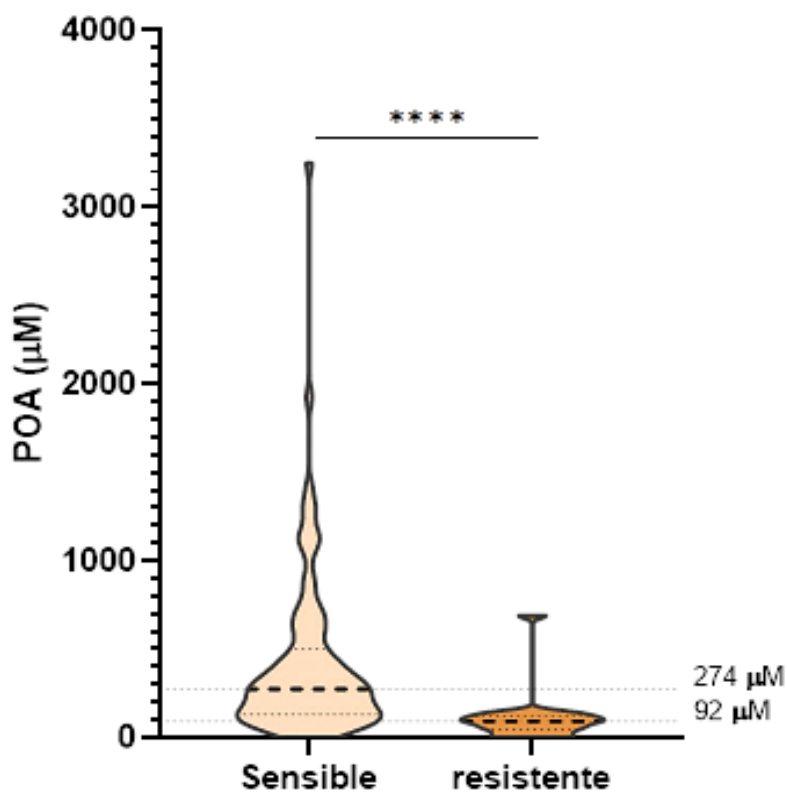


**Figura 21.** Curvas estándar de ácido pirazinoico disueltas en dos tipos de matrices. Matriz de Medio 7H9: curva resultado de 3 repeticiones y sus respectivas desviaciones estándar.

### 7.5.2. Resultados del MODS-WQ 7H9

Las muestras (TBN) trabajadas en la matriz de 7H9, fueron agrupadas en sensibles y resistentes de acuerdo con el estándar compuesto. La concentración mediana en el grupo de los sensibles fue de 274  $\mu\text{M}$ , mientras que en el grupo de los resistentes fue de 92  $\mu\text{M}$  (**Figura 22**), aunque no se observa una fuerte discriminación de los

grupos, la prueba Mann-Whitney arrojó un  $p < 0.0001$ . La dispersión en el grupo de los resistentes resultó ser menor que en el grupo de los sensibles (Sensibles:  $RIC = 373.3 \mu\text{M}$ ) (Resistentes:  $RIC = 77.95 \mu\text{M}$ ). (RIC= Rango Intercuartílico)



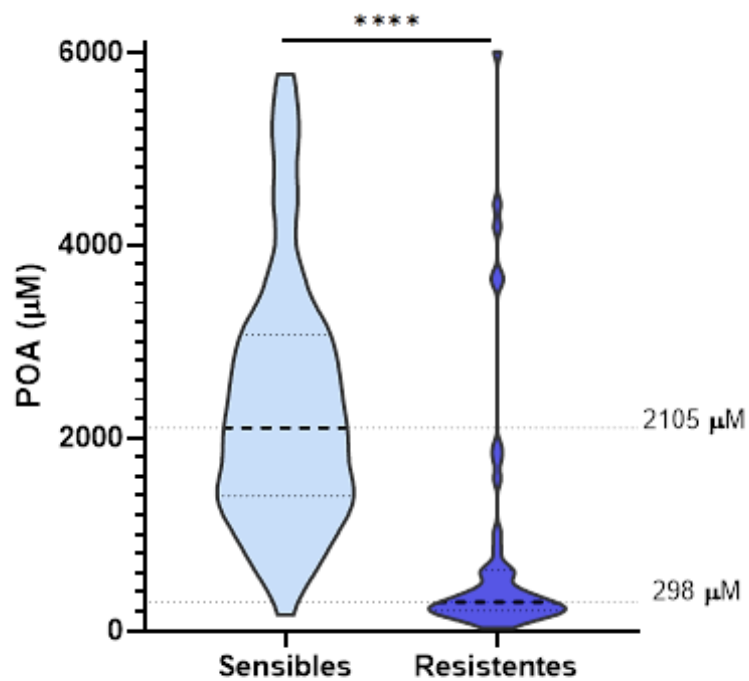
**Figura 22.** Gráfica de Violín de la clasificación de las muestras TBN de acuerdo con la prueba estándar compuesta y los valores de POA en  $\mu\text{M}$  obtenidos con el MODS-WQ 7H9. Se muestran las medianas de cada grupo, siendo  $274 \mu\text{M}$  para las muestras sensibles y  $92 \mu\text{M}$  para las resistentes.

### 7.5.3. Resultados del MODS-WQ BC

Las muestras (MP) trabajadas en la matriz BC fueron agrupadas en sensibles y resistentes de acuerdo con el estándar compuesto. La concentración mediana en el grupo de los sensibles fue de  $2105 \mu\text{M}$ , mientras que en el grupo de los resistentes



fue de 298  $\mu\text{M}$  (**Figura 23**), lo cual indica una buena discriminación de los grupos con un  $p < 0.0001$  (Mann-Whitney test). Sin embargo, la dispersión en ambos grupos resulta bastante amplia (Sensibles:  $RIC = 1672 \mu\text{M}$ ; resistentes  $RIC = 1383.3$ ) debido a que algunos aislados del grupo MP mostraron sospecha de contaminación observándose un crecimiento y una coloración rojiza irregular que inicialmente en el ensayo MODS-Wayne cualitativo no se había observado.

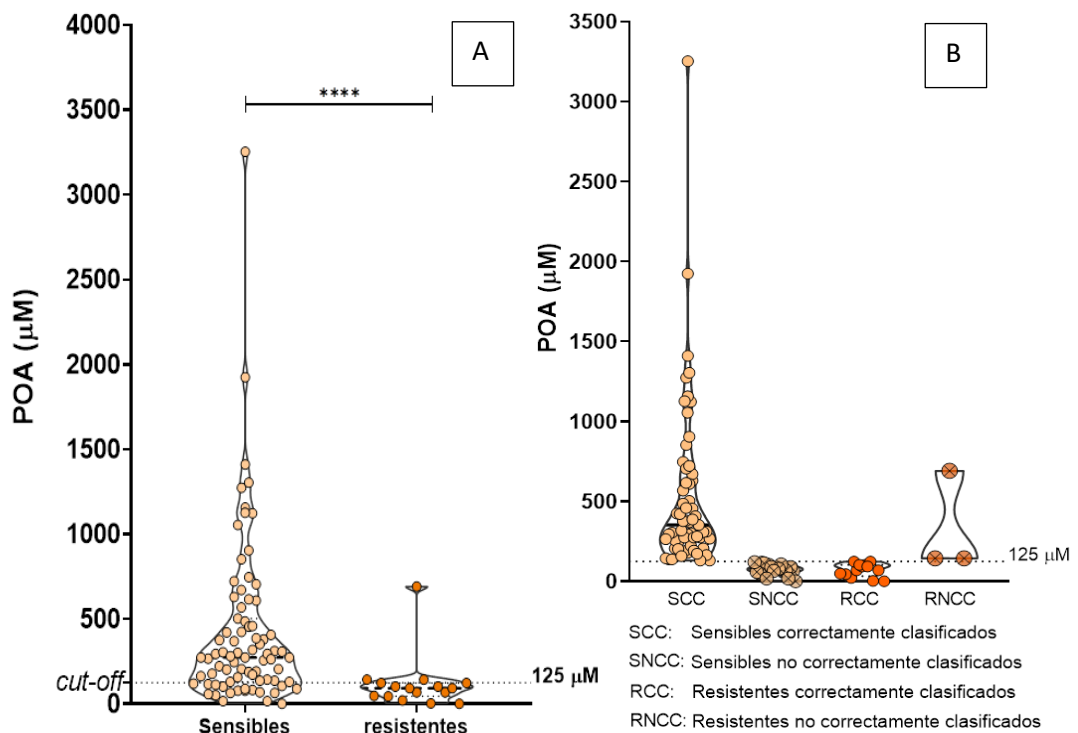


**Figura 23.** Gráfica de Violín de la clasificación de las muestras MP de acuerdo con la prueba estándar compuesta y los valores de POA en  $\mu\text{M}$  obtenidos con el MODS-WQ BC. Se muestran las medianas de cada grupo, siendo 2105  $\mu\text{M}$  para las muestras sensibles y 298  $\mu\text{M}$  para las resistentes. En el grupo de las resistentes se observa la presencia de muestras con valores extremos altos.

## 7.6. Determinación de un punto de corte en el ensayo MODS-WQ

### 7.6.1. Sensibilidad y especificidad del ensayo MODS-WQ en medio 7H9.

Una vez obtenidos los grupos de sensibles y resistentes en las muestras con medio 7H9, se procedió a realizar el cálculo de la curva ROC, con lo cual se pudo determinar un *cut-off* de 126.70  $\mu\text{M}$  con una sensibilidad una sensibilidad de 81.25% (IC95% 56.99% - 93.41%) y una especificidad de 77.22% (IC95% 66.83% - 85.07%), con un área bajo la curva de 82.28% (IC95% 71.28% - 93.28%) (**Figura 24**).

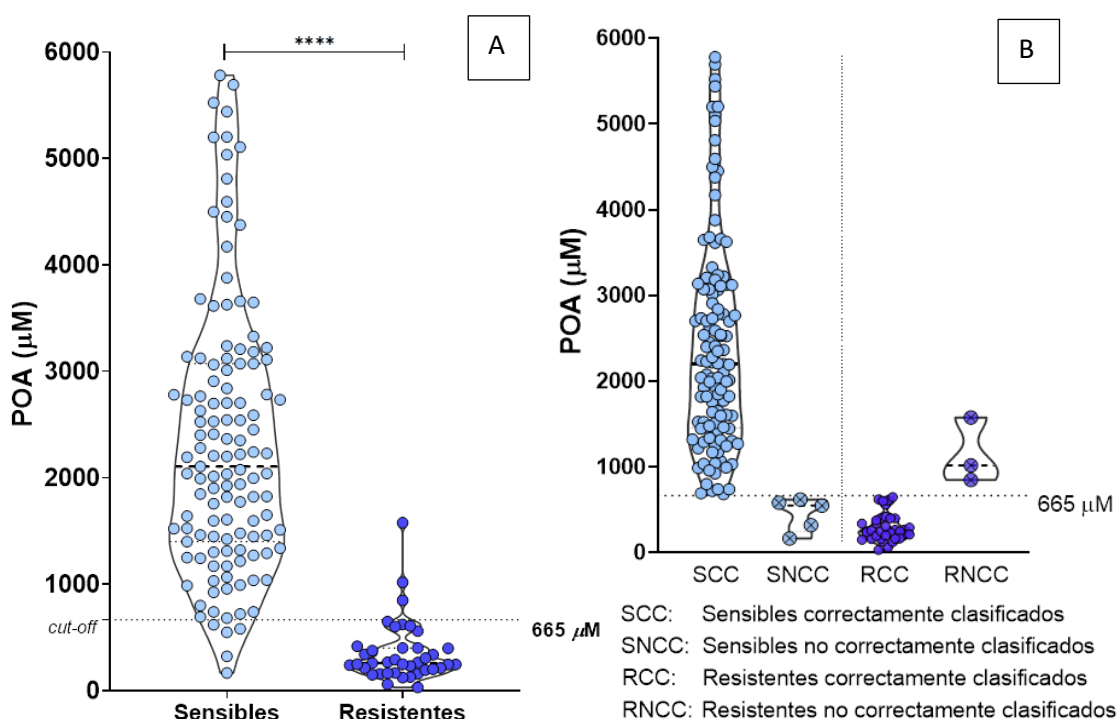


**Figura 24.** Gráfica de Violín de clasificados de acuerdo al MODS-WQ 7H9.

A) se muestra el punto de corte (125  $\mu\text{M}$  a partir de los datos de sensibilidad y especificidad de la prueba. B) Muestras correcta e incorrectamente clasificadas tomando en cuenta el punto de corte.

### 7.6.2. Sensibilidad y especificidad del ensayo MODS-WQ en buffer citrato.

Para este análisis eliminamos los 7 aislados con sospecha de contaminación (MP313, MP389, MP398, MP417, MP437, MP456 y MP496). Una vez establecidos los grupos de sensibles y resistentes en las muestras con buffer citrato se procedió a realizar el cálculo de la curva ROC, con lo cual se pudo determinar un *cut-off* de 664.7  $\mu\text{M}$  con una sensibilidad de 92.31% (IC95% 79.68% – 97.35%) y una especificidad del 95.93% (IC95% 90.84% -98.25%). El área bajo la curva ROC fue de 97.57% (IC 95% 95.30% – 99.84%) y un  $p < 0.0001$  (**Figura 25**).



**Figura 25.** Gráfica de Violín de clasificados de acuerdo al MODS-WQ BC. A) se muestra el punto de corte (665  $\mu\text{M}$  a partir de los datos de sensibilidad y especificidad de la prueba. B) Muestras correcta e incorrectamente clasificadas tomando en cuenta el punto de corte.

**Tabla 12. Resumen de resultados de susceptibilidad a PZA de acuerdo con MODS-WQ según los puntos de corte en BC (grupo MP) y 7H9 (grupo TBN)**

Fenotipo	MODS-WQ			
	Cutoff ( $\mu$ M)	MODS-WQ BC (162)	Cutoff ( $\mu$ M)	MODS-WQ 7H9 (95)
<b>Resistente</b>	< 665	41 (25.3)	<127	31 (32.6)
<b>Sensible</b>	>665	121 (74.7)	>127	64 (67.4)

### 7.6.3. Contrastación de Hipótesis

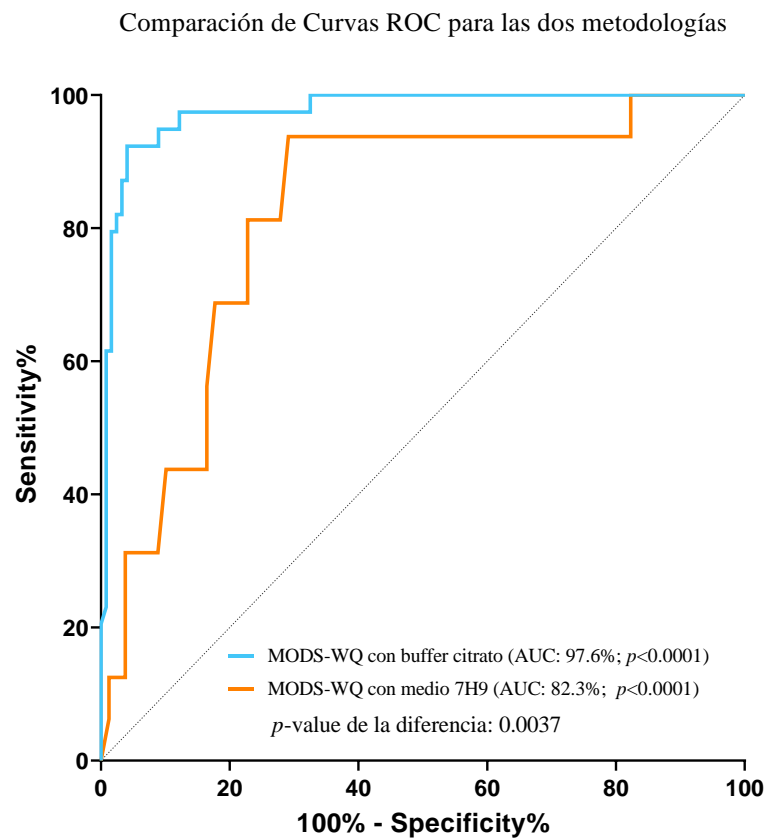
Para probar si las sensibilidades arrojadas por el MODS-WQ 7H9 y MODS-WQ BC fueron significativamente mayores a la sensibilidad base (75.0%), se realizó el test de proporciones en STATA. El test MODS-WQ en 7H9 no arrojó diferencia significativa ( $p=0.5637$ ), por lo que se aceptó la hipótesis nula. Sin embargo, el test MODS-WQ BC, arrojó un  $p=0.0126$ , es decir es significativamente mayor al 75%, con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

### 7.6.4. Curvas ROC del ensayo MODS-WQ en las matrices Buffer citrato y medio 7H9

El área bajo la curva ROC (AUC) nos puede indicar el valor diagnóstico de una prueba, mientras más cercano a 1 (100%) es el área, presenta más capacidad discriminatoria entre pacientes con y sin enfermedad. Se realizó la comparación entre el AUC del ensayo en BC *versus* el ensayo en 7H9. Se obtuvo una diferencia significativa entre ambas áreas ( $p=0.0037$ ), se observa que el ensayo MODS-WQ

BC, presenta un AUC: 97.57%, significativamente mayor que el AUC del ensayo en matriz 7H9 (AUC: 82.30%).

Ambos ensayos presentan una buena performance, sin embargo, el ensayo con MODS-WQ BC es más exacto.



**Figura 26.** Curvas ROC obtenidas con las dos variantes de MODS-WQ: MODS-WQ BC y MODS-WQ 7H9

## 7.7. Comparación entre los ensayos MODS-Wayne y MODS-WQ

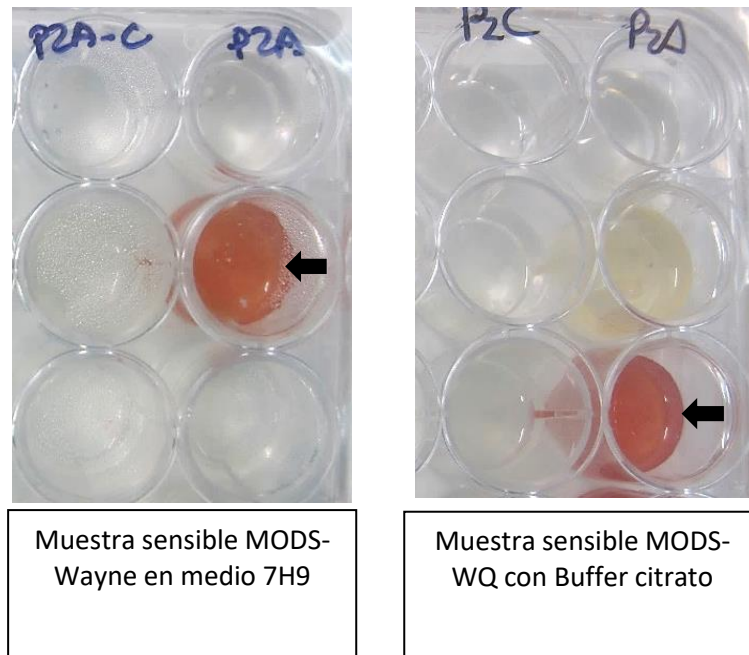
### 7.7.1. Resumen de susceptibilidad en cada una de las pruebas fenotípicas

**Tabla 13. Resumen de resultados de susceptibilidad a PZA según 3 metodologías**

Fenotipo	Estándar compuesto		MODS-Wayne		MODS-WQ	
	MP	TBN	MP	TBN	MP-BC	TBN-7H9
<b>Resistente</b>	46	16	41	15	41	31
<b>Sensible</b>	123	79	123	80	121	64

### 7.7.2. Comparación de ensayos MODS-Wayne y MODS-WQ

El ensayo MODS-WQ (cuantitativo) cuya matriz fue el buffer citrato (BC) presentó una mejor performance como ensayo diagnóstico que el ensayo bajo la matriz de medio 7H9, esto probablemente debido a micropartículas del medio de cultivo 7H9 que pudieron permanecer después de la centrifugación e interferir con la lectura al espectrofotómetro. En el ensayo MODS-Wayne de tipo cualitativo, el cual se realiza propiamente en medio 7H9, la visualización del color no se ve interferida por las micropartículas del medio, por lo que se puede realizar una lectura (aunque subjetiva) sin problema en este medio (**Figura 27**).



**Figura 27.** Placas con muestras trabajadas con las dos variantes de MODS-Wayne y MODS-WQ. Las muestras con matriz 7H9 presentan un aspecto más turbio, mientras que las muestras trabajadas en buffer citrato se observan más nitidez.

El ensayo MODS-Wayne se realizó en dos grupos de muestras diferentes, MP y TBN, cada uno fue evaluado con observadores distintos. Se pudo constatar que, aunque la especificidad no varió significativamente, la sensibilidad disminuyó considerablemente con el segundo observador (**Tabla N° 14**). Para valorar el desempeño del MODS-Wayne respecto al estándar compuesto (grado de concordancia), se calculó el índice Kappa (Ki) (**Tabla N° 15**).

**Tabla 14. Comparación de sensibilidad y especificidad en dos grupos de muestras mediante el MODS-Wayne**

Método	Grupo	Sensibilidad	Especificidad	Observador
MODS-Wayne	MP	87.8%	95.9%	1
	TBN	62.5%	93.7%	2

**Tabla 15. Valores de índice Kappa y su interpretación de acuerdo al esquema de Altman\*.**

Índice Kappa	Grado de concordancia
<b>0.0</b>	Ninguna concordancia
<b>&lt;0.20</b>	Pobre
<b>0.21-0.40</b>	Justa
<b>0.41-0.60</b>	Moderada
<b>0.61-0.80</b>	Buena
<b>0.81-0.99</b>	Muy buena
<b>1.00</b>	Concordancia perfecta

\*Obtenido de la plataforma web QuickCalc de GraphPad  
<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa2/>

El ensayo MODS-Wayne con las muestras del grupo MP arrojó un grado de concordancia importante con un índice kappa (Ki) de 0.83, mientras que con las muestras TBN el grado de correlación con el estándar fue de solo 0.57, indicando una moderada concordancia.



Respecto al MODS-WQ BC, este obtuvo también un importante grado de concordancia con un índice kappa ( $K_i$ ) de 0.87. Como era de esperarse, el grado de correlación entre el estándar y el MODS-WQ 7H9, fue ligeramente moderado ( $K_i=0.43$ ), nuevamente debido probablemente a la interferencia óptica generada por el tipo de muestra (**Tabla N° 16**).

Esto estaría indicando que el ensayo MODS-WQ BC presenta un desempeño ligeramente mayor que el MODS-Wayne, con un  $K_i = 0.87$  en comparación con el  $K_i=0.83$ .

Además del índice kappa, se utilizó el test de proporciones para evaluar qué tan significativamente diferentes eran los ensayos MODS-Wayne y MODS-WQ en cuanto a su sensibilidad, es decir su desempeño. Se compararon el MODS-Wayne realizado en las muestras TBN y el MODS-WQ 7H9 (realizado en las mismas muestras), el resultado arrojó un  $p= 0.2382$ , de la misma manera, se compararon el MODS-Wayne en muestras MP y el MODS-WQ BC, y se obtuvo un  $p= 0.5022$ .

Estos resultados nos indican que, en términos generales, estas metodologías son similares en cuanto su desempeño, en embargo, si consideramos el factor reproducibilidad, sería más probable que los valores sensibilidad y especificidad no varíen entre laboratorios cuando se trabaja con pruebas cuantitativas que cualitativas(70,71) ya que se elimina el componente subjetivo.

**Tabla 16. Performance comparativo de cada metodología MODS-Wayne y MODS-WQ con sus variantes en BC y 7H9**

Método/Muestra	Sensibilidad [95% CI]	Especificidad [95% CI]	PPV	NPV	Ki	
<b>MODS-WQ</b>	<b>MP-BC</b>	<b>0.923 [0.797-0.974]</b>	<b>0.959 [0.908-0.983]</b>	<b>0.88</b>	<b>0.98</b>	<b>0.87</b>
	TBN-7H9	0.813 [0.569-0.934]	0.772 [0.668-0.851]	0.42	0.95	0.43
<b>MODS-Wayne</b>	<b>MP</b>	<b>0.878 [0.745-0.947]</b>	<b>0.958 [0.901-0.983]</b>	<b>0.88</b>	<b>0.95</b>	<b>0.83</b>
	TBN	0.625 [0.387-0.815]	0.937 [0.860-0.973]	0.67	0.93	0.57

Se observan las medidas de exactitud (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo PPV, valor predictivo negativo NPV) e intervalos de confianza, por cada tipo de test evaluado.

### ***7.8. Relación entre la producción de POA y mutaciones en PZAsa en muestras resistentes de MODS-WQ BC***

Una de las ventajas de cuantificar el nivel de POA producido y no solo determinar la resistencia de forma cualitativa (MODS-Wayne), es que se pueden establecer niveles de resistencia y correlacionarlo con la actividad enzimática, ya que los niveles de POA producidos son un reflejo de dicha actividad de la enzima. Sheen *et al.* (48), explicaron la ruta causal del fenotipo binario de resistencia:

Mutaciones *pncA* → actividad de PZasa → Nivel de resistencia → Fenotipo Sí/No.

Ya que todas las muestras presentan el mismo volumen y tiempo de reacción, se puede utilizar la concentración de POA ( $\mu\text{M}$ ) producida por cada muestra como indicador indirecto de la actividad enzimática, sin embargo, es importante conocer el efecto de la cantidad de bacilos sobre los niveles de POA cuantificados. En nuestro trabajo establecimos niveles de carga (1; 2; 3) de acuerdo con la baciloscopía (BK) y realizamos un análisis de estratificación por grupo de carga bacilar para determinar si tenían un efecto significativo en la producción de POA.

#### **7.8.1. Análisis estratificado de la sensibilidad y especificidad por grupo de carga bacilar.**

Una manera válida de verificar que las cargas bacilares no afectaron significativamente los niveles de POA cuantificados en las muestras es calculando la sensibilidad y especificidad en cada grupo o nivel de carga bacilar y compararla con las obtenidas en el grupo general sin estratificar. La carga bacteriana fue medida de acuerdo al conteo de los bacilos en la coloración Ziehl Neelsen o más conocido como coloración BK (Bacilo de Koch) (**Tabla N°17**). La sensibilidad obtenida en

cada grupo fue comparada con la sensibilidad global que se obtuvo en MODS-WQ BC. Las muestras se dividieron en tres grupos (**Tabla N°17**)

<b>Tabla 17. Sistema de determinación niveles de carga bacteriana</b>	
<b>Grupo BK</b>	<b>Interpretación</b>
<b>BK1 (+)</b>	10-99 BAAR* en 100 campos microscópicos
<b>BK2 (++)</b>	1-10 BAAR por campo, en 50 campos microscópicos
<b>BK3 (+++)</b>	Más de 10 BAAR por campo, en 20 campos microscópicos
*BAAR= Bacilos resistentes al alcohol ácido o ácidosresistentes	

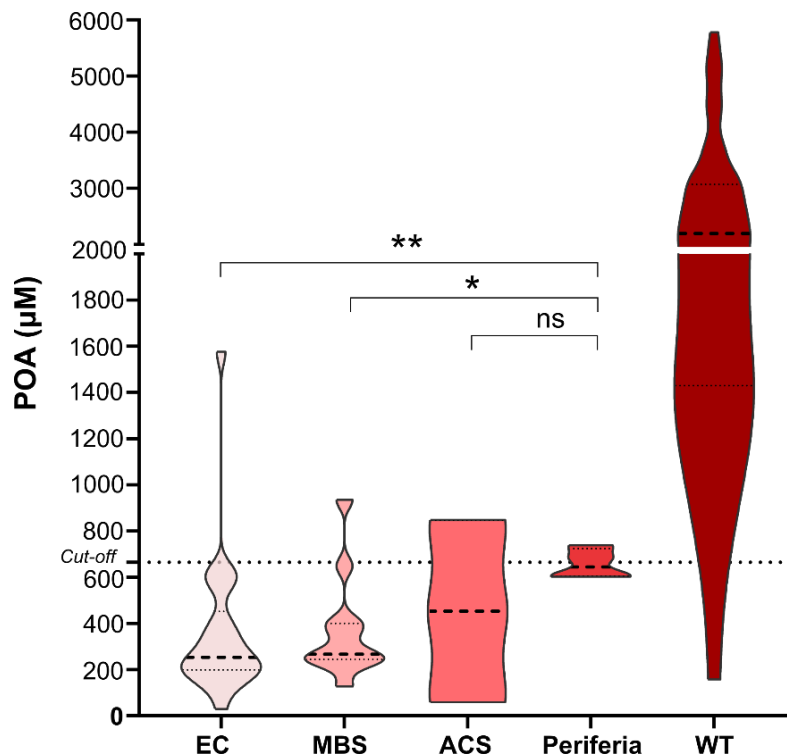
La sensibilidad y especificidad en cada grupo BK se calculó de la misma manera que para el total de muestras, usando como referencia el estándar compuesto. Los resultados se encuentran en la **Tabla N°18**.

<b>Tabla 18. Sensibilidad y especificidad por grupo BK y en el grupo total general en muestras evaluadas con el MODS-WQ en BC</b>			
<b>Nivel de carga</b>	<b>Sensibilidad [95% CI]</b>	<b>Especificidad [95% CI]</b>	<b>valor <i>p</i>*</b>
<b>BK1</b>	0.933 (0.702-0.996)	0.967 (0.833-0.998)	0.8974
<b>BK2</b>	0.923 (0.667-0.996)	0.914 (0.776-0.970)	0.9999
<b>BK3</b>	0.929 (0.685-0.996)	0.983 (0.908-0.999)	0.9468
<b>General</b>	0.923 (0.797-0.974)	0.959 (0.908-0.983)	-
* Valor <i>p</i> de la diferencia entre el grupo BK y el grupo total general. El valor <i>p</i> se calculó con Test de proporciones (proporción de sensibilidad en el grupo BK versus proporción de sensibilidad general) Se consideró un $p < 0.05$ , como significativo.			

Las sensibilidades de los subgrupos BK y la sensibilidad global de las muestras fueron estadísticamente similares ( $p>0.05$ ), es decir, independientemente del nivel de BK (1, 2 ó 3), la proporción de muestras resistentes (sensibilidad) con valores de POA entre 0 – 665  $\mu\text{M}$  (punto de corte), supera el 90.0 % (correctamente clasificados de acuerdo al estándar compuesto), al igual que la proporción obtenida sin estratificar. Por lo tanto, la variación en la carga bacteriana no tiene un efecto estadísticamente significativo en la cantidad de POA cuantificada ya que más del 90 % de las muestras resistentes producen POA en el rango menor a 665  $\mu\text{M}$ .

### 7.8.2. Relación entre niveles de POA y mutaciones en *pncA*

Por lo tanto, dado que poseemos datos de mutaciones y su localización en la enzima y la concentración de POA ( $\mu\text{M}$ ) por cada muestra o aislado, se procedió a analizar la relación entre ambos parámetros. Para el análisis no se tomó en cuenta las deleciones ni la mutación en el sitio promotor de la enzima. (Figura 28.)



**Figura 28.** Comparación entre la localización de la mutación en PZAsa y la producción de POA. Gráfico de Violín: se observa la distribución de los valores de POA en cada sitio de mutación y su respectiva mediana, así como en muestras WT. El *cutoff* del MODS-WQ (665  $\mu\text{M}$ ) se muestra en línea puntuada EC: Core enzimático, N=22; MBS: Sitio de unión al metal N= 11; ACS: Sitio activo catalítico, N= 2; Periferia: N=4, WT: *Wild type*, N= 116. Prueba de Mann-Whitney, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , ns: no significativo

La Figura 28 muestra la relación entre los valores de POA producidos y la localización de las mutaciones en PZAsa (**Figura 28**). Las zonas fueron: **Core enzimático** (EC), sitio ubicado en el centro y cercano a los sitios activos de la enzima; **sitio de unión al metal**, (MBS), que corresponde a los aminoácidos His57, His51 y Asp49; **sitio activo catalítico** (ACS) correspondiente a los aminoácidos Asp8, Lys96 y Cys138; y por último **la periferia**, que corresponde a las zonas externas y lejanas de los sitios activos. No se encontraron mutaciones en el sitio de unión a PZA (Phe13 y Trp68). Las mutaciones presentes en el EC (I6S, Q10P, Q10R, K48T y H71R, número de aislados=22), arrojaron una mediana de producción de POA de 252.7  $\mu\text{M}$ , las mutaciones presentes en el MBS (D49N, H51R, H57R, n=11), una mediana de 266.4  $\mu\text{M}$ , solo una mutación fue detectada en el ACS (D8E), presente en dos aislados, cuyos valores de POA fueron muy distantes 59  $\mu\text{M}$  y 847  $\mu\text{M}$  (mediana: 453  $\mu\text{M}$ ), por último, en la periferia (P62S, F81S, n=4) se obtuvo una mediana de 644.3  $\mu\text{M}$ . La mediana de la producción de POA en muestras WT, fue 2195  $\mu\text{M}$ , lo cual indica que mutaciones en EC y MBS,

disminuyen la producción de POA en 88.5 % y 88 %, respecto a las WT. Mientras que las mutaciones en periferia, la disminuye en un 70.6 %

Asimismo, la observación de que la mayoría de las mutaciones independientemente de su ubicación generan una producción de POA por debajo de  $665\mu\text{M}$ , es decir por debajo del punto de corte (*cut-off*), indica que las mutaciones tienen un efecto en la actividad enzimática pero no es un efecto drástico, ya que persiste esta actividad en términos de producción de POA, esto se puede evidenciar con la mutación K48T en EC, ya que esta mutación está descrita como mutación con fenotipo “incierto” según la OMS, pues en algunos casos se ha descrito en cepas sensibles.

En particular podemos ver que, en la periferia, las mutaciones tienen un efecto leve en la actividad enzimática, ya que la mediana de la concentración de POA resulta  $644.30\mu\text{M}$ , cercano al punto de corte, por el contrario, aquellas mutaciones presentes en el *core* de la enzima parecen tener un efecto más grave, arrojando una mediana de  $252.5\mu\text{M}$ , incluso menor que las mutaciones presentes en el sitio catalítico y el sitio de unión al metal. Para determinar si existe diferencia significativa entre los valores de POA producido en presencia de los diferentes tipos de mutaciones, se utilizó la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. Los resultados arrojaron que el POA producido en las muestras con mutaciones en la periferia, era significativamente más alto que en aquellas con mutaciones en las zonas del *core* y del MBS, pero no respecto a mutaciones en el sitio catalítico, debido a la baja cantidad de muestras. Es necesario añadir un número mayor de muestras para ajustar la variabilidad en los datos ya que algunos aislados arrojan un valor extremo, un aislado que porta la mutación K48T en el *core* de la enzima y otro que porta D49N en el MBS.

## 8. DISCUSIÓN

PZA es una de las drogas de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis(35,45,72–75). Tiene una especial importancia, ya que actúa sobre las micobacterias en estado latente permitiendo acortar el tiempo de tratamiento hasta los 6 meses (21). El principal problema es la falta de un diagnóstico de resistencia anticipado, lo cual deriva en un tratamiento fallido, empeoramiento del paciente y pérdidas económicas para el estado, representado un problema de salud pública(76). En este sentido, es importante determinar la susceptibilidad a PZA en etapas tempranas, para proporcionar un régimen seguro y mejorar el tratamiento. Sin embargo, aunque métodos basados en cultivo siguen siendo un *gold* estándar, estas pruebas no se ejecutan de forma rutinaria para detectar PZAr (77), debido a las dificultades que presentan, como por ejemplo, la falta de confiabilidad: ya que requieren un pH ácido y una concentración específica de oxígeno para ser efectivo, lo cual es difícil de controlar cuando se trabaja con inóculos excesivamente grandes que reducen la actividad de la Pirazinamida. Esto puede generar una falsa resistencia o que las cepas no crezcan a este pH (73,78). Adicionalmente, los diferentes mecanismos de resistencia y su variabilidad debido a la coexistencia de bacterias fenotípicamente distintas (heteroresistencia), sensibles y resistentes en una misma población (79,80), contribuyen a la limitación de estas pruebas.

El ensayo de MODS-WQ se desarrolló con la idea de eliminar la subjetividad de métodos cualitativos como el test convencional de Wayne, o el MODS-Wayne. Esta variante cuantitativa contempla la cuantificación de POA en medio líquido y con ello, se determinó un valor de POA que actúe como punto de corte y permita segregar los valores que correspondan a cepas sensibles de los que corresponden a



cepas resistentes, sin la necesidad de tener que recurrir solo al criterio del observador. Para desarrollar esta variante se tomó como base el uso de medio líquido que proporciona un crecimiento más rápido y un pH neutro, que no interfiere con el crecimiento de la micobacteria.

### **8.1. Características de las muestras**

Si bien es cierto, el estudio no contempló la estratificación de las muestras, lo cual hubiese sido un punto importante para la comparación objetiva de los grupos MP y TBN trabajados, se observó que ambos grupos de muestras MP y TBN, aunque obtenidas en diferentes periodos, no mostraron diferencias significativas en cuanto a proporción de hombres y mujeres en cada grupo, el porcentaje de hombres en MP fue de 57% mientras que en TBN fue de 69%, así mismo el porcentaje de mujeres en MP y TBN fueron prácticamente las mismas siendo 32% y 31% respectivamente. Cabe destacar que en el 11% de las muestras (n=19) del grupo MP no pudo determinarse el sexo, por lo que inicialmente la diferencia en proporción de hombres resultó ligeramente significativa con un valor  $p$  de 0.04. En cuanto a los tratamientos, este aspecto si fue heterogéneo entre ambos grupos, se observó que el doble de pacientes habían iniciado tratamiento en el grupo TBN (67%), mientras que en el grupo MP solo un 11% había iniciado el tratamiento, esto podría tener un impacto en la carga bacilar, lo que a su vez podría influir en los resultados finales de susceptibilidad a PZA, en este sentido, es importante realizar ensayos de validación para determinar si estos factores afectan la sensibilidad y especificidad de los ensayos.

Un factor importante dentro del manejo de la TB es la detección de PZAr entre pacientes con MDR-TB, ya que se ha estimado que entre el 38 y 65% de estos casos, presentan también PZAr (35,72,81–84). En este sentido y en concordancia con estos estudios, hemos reportado en total 78 muestras MDR (INH/RIF), es decir, el 29.54% del total (n=264), de las cuales el 62.80% (n= 49) fueron resistentes a PZA (según estándar compuesto). Sin embargo, la PZAr no solo se presenta en estos casos, también puede observarse en muestras monoresistentes y muestras no-MDRs. En este estudio reportamos 62 muestras resistentes a PZA (estándar compuesto) en total (23.5%) de las 264 muestras, de las cuales 13 resultaron ser no-MDR o monoresistente (7.0%). Aunque, actualmente no se cuenta con información específica disponible sobre la prevalencia de PZAr entre todos los casos de TB en el mundo, un estudio sistemático estimó que la prevalencia de resistencia a PZA era del 16,2 % (IC del 95 %: 11,2-21,2) entre todos los casos de TB (35), con un rango estimado que variaba de 11.4% en población europea a un 21.9% en población americana, lo cual concuerda con nuestros datos del 23.5% antes mencionado. Otro estudio enfocado en población peruana también estimó los casos de resistencia a PZA dentro de casos totales de TB, pero en este caso solo estableció un 6.6% de una muestra de 3277 pacientes (83). Es necesario realizar más investigación para determinar la prevalencia de la resistencia a la PZA entre todos los casos de TB a nivel mundial.

## **8.2. Establecimiento del estándar compuesto**

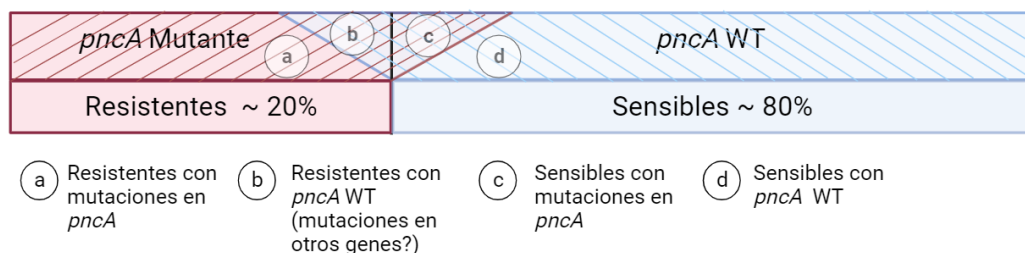
Aunque BACTEC MGIT 960 y el secuenciamiento de *pncA* han sido recomendados por la OMS desde el año 2018, para determinar susceptibilidad a PZA, este

organismo reconoce que ambos, presentan ciertas desventajas, ya que el primero está asociado a una alta tasa de resultados falsos resistentes, mientras que el segundo, aunque más fidedigno, podría no estar cubriendo todas las causas de resistencia, puesto que hay evidencia emergente de resistencia no debida a mutaciones en *pncA* (9). Por lo tanto, para establecer de manera más precisa el perfil de susceptibilidad hemos utilizado 3 pruebas: MGIT 960, secuenciamiento de Sanger para *pncA* y el test de Wayne convencional.

Con el secuenciamiento, se encontraron 47 cambios en *pncA* en las muestras MP y 23 en las TBN. En MP, las 47 variantes fueron reconocidas como resistentes. La mayoría de aislados presentaron mutaciones en el EC (n=24) y en los sitios activos (MBS y ACS), con 16 mutaciones en total y solo 6 en la periferia. Las mutaciones se distribuyen a lo largo del gen aunque con mayor frecuencia cerca a los sitios activos (*core*), en concordancia con otros estudios, en los que no existe un solo hot spot asociado a resistencia sino a lo largo del todo el gen.(47,85).

Aunque la mayoría de los aislados con mutaciones resistentes, coincidieron con un fenotipo final resistente, existieron algunas discrepancias. Amplia data confirma que entre el 70% y 90% de las cepas resistentes a PZA presentan mutaciones en el gen *pncA* y su promotor (81,86–88) que afectan la actividad enzimática de la PZAsa, sin embargo, existe un porcentaje de resistentes que no presentan mutaciones en este gen. Esto sugiere la existencia de otros mecanismos de PZAr que aún no se conocen por completo (78) que pueden incluir mutaciones en genes como *panD* y *rpsA* o por otro lado, la presencia de cepas heteroresistentes con diferentes genotipos de susceptibilidad (81,89). Por otro lado, algunas de las mutaciones que porta el gen *pncA* no necesariamente están asociadas a la PZAr (78)

ya que no tienen un efecto real en la actividad enzimática y por lo tanto no influyen en el resultado final de resistencia, resultando en cepas sensibles (88). En la figura siguiente (**Figura 29**) podemos ver un esquema de cómo se estaría distribuyendo los genotipos implicados en el carácter resistente y sensible.



**Figura 29.** Esquema de la distribución de genotipos implicados en la resistencia a PZA. Creación en Biorender.com.

### 8.3. Ensayo MODS-Wayne

El ensayo MODS-Wayne cualitativo para detectar PZA<sup>r</sup> fue realizado con el fin de compararla con la variante cuantitativa de este estudio (MODS-WQ).

El ensayo MODS-Wayne, ha sentado las bases para el desarrollo de la variante cuantitativa presentada en este trabajo. En el estudio previo de Alcántara *et al.* (32) se utilizaron dos concentraciones de PZA como posibles puntos de corte 400 µg/mL y 800 µg/mL y se evaluaron 3 tiempos de incubación de la micobacteria, D1: hasta el día del crecimiento en el pozo control, D3: a los 3 días del crecimiento y D3: al 6to día. Se obtuvo como resultado que la concentración de 800 µg/mL en el día D3 de incubación y a 800 µg/mL se obtuvo la mejor sensibilidad y especificidad (90.91% y 98.01% respectivamente. Tomando en cuenta estos resultados, en nuestro estudio cuantitativo se trabajó con dicha concentración de 800 µg/mL y se

realizó la evaluación al día D2 de incubación tanto para el MODS-Wayne como para el MODS-WQ, con la idea de disminuir el tiempo total de resultados. Asimismo, hemos utilizado la ventaja del pH neutro tanto en medio 7H9 como en buffer citrato. En otras pruebas fenotípicas, el mantenimiento de un pH ácido es crítico para garantizar la acción de la PZA sobre la micobacteria y producir su destrucción, esto debido a que el POA debe ser protonado previamente antes de reingresar a la micobacteria (45). Métodos como el de proporciones en medio sólido o REMA (*Resazurin microtitre assay*) requieren un pH= 5.5 y trabajan con concentraciones de PZA entre 12.5 µg/mL hasta 800 µg/mL y 100 µg/mL respectivamente(90,91). Asimismo, MGIT960 y MODS también requieren de pHs ligeramente ácidos de 5.9 y 6.0 respectivamente (92–94), con el fin de evaluar la muerte bacteriana. En en los ensayos MODS-Wayne cualitativo y MODS-WQ, no se requiere pHs ácidos ya que no se evalúa el crecimiento o destrucción bacteriana sino la actividad enzimática de la PZAsa, por lo tanto, se evalúa la producción de POA en el medio.

El problema con el MODS-Wayne es que al ser cualitativo existe un grado de subjetividad del observador y esto podría impactar en el grado de reproducibilidad del método (70,71), además no permite determinar niveles de resistencia y actividad de la PZasa. En nuestro estudio se trabajó con dos tipos de muestras MP y TBN las cuales fueron evaluadas por dos observadores diferentes. Para las muestras MP obtuvimos valores de sensibilidad y especificidad similares al estudio previo (87.8% y 95.9% respectivamente) y un PPV del 88%. Sin embargo, con las muestras TBN del 2º observador, la sensibilidad disminuyó considerablemente al 62.5% mientras que la especificidad se mantuvo en 93.7%. La principal diferencia

entre el obs 1° y el obs 2° fue el número de aislados con intensidad leve 1 que fueron detectados por ambos observadores. En las muestras MP fueron detectadas tan solo el 10% como sensibles de intensidad leve, mientras que en las TBN fueron evaluadas como sensibles leve el 44% de las muestras, esto demuestra el grado de subjetividad de la prueba MODS-Wayne cualitativa, ya que un observador que no tenga la experiencia suficiente podría sobrevalorar el número de sensibles para evitar dar resultados falsos resistentes.

#### **8.4. Ensayo MODS-WQ**

El MODS-WQ, ha demostrado poder cuantificar el POA en el medio utilizando una curva estándar como referencia, directamente en el medio 7H9 o cambiando el medio por buffer citrato (BC). Con la curva ROC se pudo establecer un punto de corte para cada matriz, 127  $\mu\text{M}$  en 7H9 y 665  $\mu\text{M}$  en BC y con ello se determinó la sensibilidad y especificidad de las pruebas. Cabe destacar que estos parámetros se calcularon en el mismo grupo de muestras en el que fue determinado el punto de corte; por esta razón, para tener resultados más sólidos y confiables es recomendable determinar estos parámetros en un grupo independiente. Por otro lado, se encontraron diferencias en sensibilidad y especificidad entre ambas matrices. La mejor performance se obtuvo con la matriz de BC, con la cual se alcanzó un 92.31% de sensibilidad, 95.93% de especificidad y un PPV de 88% al día D2 de incubación. Sin embargo, con la matriz 7H9 ambos parámetros disminuyeron considerablemente (81.3% y 77.2% respectivamente) y un PPV de 42%. La principal dificultad de medir espectrofotométricamente POA directamente en medio 7H9 podría ser la presencia de suero bovino albúmina (BSA). Medios

como el 7H9, 7H10 y 7H11 contienen BSA como complemento para favorecer el crecimiento de la micobacteria(95), no obstante, podría afectar la interacción [POA-SAF] y dar resultados variables. En estudios pasados se demostró que el BSA afectaba tanto la actividad de PZA como de POA. El MIC de PZA y POA incrementaron consistentemente con la concentraciones de BSA, sin embargo este efecto fue más pronunciado para POA que para PZA (49), ya que existe mayor afinidad entre el BSA y POA a partir de 0.4% de concentración de la albúmina bovina (25). Esto nos estaría indicando que en medios como el 7H9 un porcentaje significativo de POA estaría siendo capturado por el BSA y así evitando su adecuada interacción con el hierro ( $Fe^{2+}$ ) proveniente del complejo sulfato de amonio ferroso (SAF). Por otro lado, el BSA es una proteína altamente abundante en plasma y participa en la farmacocinética y farmacodinámica de medicamentos, esto quiere decir que interactúa con una amplia gama de ligandos, en especial con cationes metálicos divalentes como el cobre y el zinc (96). BSA también presenta un alto grado de afinidad al  $Fe^{3+}$  y es capaz de unirse y solubilizarlo a pH neutro de forma similar a como lo hace la lactoferrina, en un sitio de unión cercano a residuos de triptófano (97,98). Recientemente se ha demostrado que complejos de  $Fe^{2+}$  también interaccionan con BSA en el sitio de unión II de la proteína (site II) alrededor de residuos hidrofóbicos induciendo ligeros cambios conformacionales en la proteína(99). Es así que un porcentaje de POA y SAF podrían estar interactuando con BSA disminuyendo la formación de complejos [SAF-POA] que puedan ser detectados a nivel espectrofotométrico causando resultados variables de sensibilidad y especificidad. Esta discordancia entre los resultados obtenidos con matriz 7H9 y BC se pueden observar en las áreas bajo las Curvas ROC (AUC)

calculadas para ambas matrices ya que fueron significativamente diferentes con un  $p= 0.0065$  (AUC = 82.2% y 97.6% respectivamente).

El uso de la matriz de BC conllevó mayor facilidad no solo para observación colorimétrica sino para la detección de absorbancias de manera limpia y evitando sesgos físicos del medio. En un estudio previo, Meinzen *et al.* (100), utilizaron este tipo de matriz para cuantificar POA, pero diferencia de aquel método en nuestro estudio se trabajó con muestras directas del esputo del paciente, mientras que en el trabajo mencionado utilizaron muestras previamente cultivadas en agar y mantenidas en el banco de cultivos de la UPCH. La sensibilidad y especificidad obtenida por Meinzen *et al.* alcanzó el 96.0% y 97.4% respectivamente a una concentración de PZA de 400  $\mu\text{g/mL}$  y 90.5% y 94.4% con 800  $\mu\text{g/mL}$  de PZA y con un área bajo la curva  $> 93.0\%$  para ambas concentraciones y con un tiempo de incubación con PZA de 7 días.

Aunque en nuestro estudio no alcanzamos dichos valores de sensibilidad y especificidad y nuestro tiempo de incubación con PZA fue de 3 días, hay que destacar que los resultados de este estudio se obtuvieron directamente de la muestra del paciente lo que significa una reducción en el tiempo de diagnóstico de 13.5 días promedio en comparación con el MODS-Wayne (media 19.5 días) o el Test convencional de Wayne (30-45 días)(32).

Por otro lado, el MODS-WQ, además de ser sensible, específico y de corto tiempo, supone ventajas económicas respecto al MGIT 960 o el secuenciamiento, los cuales requieren costos que pueden superar los \$68.75 en instrumentos e insumos por muestra en laboratorios privados, mientras que con financiamiento público podría estimarse entre los \$20-30 (12,13). En este ensayo no se requieren equipos



adicionales a los que ya se tienen en laboratorios especializados en tuberculosis, por lo tanto, los gastos estarían limitados a los insumos consumibles (PZA, 7H9, OADC, placas de cultivo, tubos, puntas, entre otros) los cuales podrían implicar un gasto de \$5-8 en promedio por muestra, esto supondría un ahorro del más del 50% en laboratorios de bajos recursos económicos. Asimismo, este ensayo no requeriría capacitación especializada, salvo la necesaria para cualquier laboratorio

### **8.5. Comparación MODS-Wayne y MODS-WQ**

Se realizó una comparación del desempeño del MODS-Wayne y el MODS-WQ como un ejercicio preliminar, habida cuenta que, como se mencionó en el apartado anterior, una estimación más rigurosa de los parámetros de desempeño del MODS-WQ habría requerido su evaluación con un segundo grupo de muestras. En este estudio ambas metodologías tuvieron un comportamiento semejante en todos los aspectos al analizar los resultados con las muestras MP, ya que ambos métodos arrojaron un PPV del 88%, un porcentaje de concordancia o índice *Kappa* (*Ki*) de 0.83 para MODS-Wayne y de 0.87 para MODS-WQ, así como una sensibilidad de 87.8% y 92.1% respectivamente, sin arrojar diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Sin embargo el estudio inicial (32,101) reportó porcentajes de PPV y *Ki* menores (60% y 66% respectivamente) con las mismas condiciones de este estudio, incubación hasta 3 días después del crecimiento del control (D2) y con 800  $\mu\text{g/mL}$  de PZA.

Respecto a las muestras TBN, las pruebas MODS-Wayne (62.5% de sensibilidad y 93.7% de especificidad) y MODS-WQ (81.3% y 77.2% respectivamente, *cut-off* 127 $\mu\text{M}$ ) tampoco arrojaron diferencias significativas en su performance según el test de proporciones. Aunque la variante cuantitativa tuvo mejor sensibilidad que el

MODS-Wayne, los valores de PPV y de concordancia ( $K_i$ ) con el estándar fueron muy bajos (42% y 43% respectivamente) esto probablemente debido a la dificultad de medir adecuadamente los valores de POA en medio 7H9 en las muestras TBN. Aunque, en general, ambas pruebas MODS-Wayne y MODS-WQ mostraron un buen desempeño, es importante tomar en cuenta que la variación en resultados obtenidos con el MODS-Wayne cualitativo, con las diferentes muestras: MP ( $K_i = 0.83$ ), TBN ( $K_i = 0.57$ ) y el estudio previo ( $K_i = 0.66$ ) está sometida a la subjetividad del observador, la cual puede ser eliminada utilizando la variante cuantitativa MODS-WQ. También se debe añadir que aún será necesario realizar estudios de reproducibilidad para validar nuestros resultados.

#### **8.6. MODS-WQ y actividad enzimática**

La producción de POA es un indicador indirecto de la actividad enzimática de la PZAsa (48,102,59,103) y la actividad enzimática puede verse afectada en diferente medida por mutaciones en la proteína. Por ello hemos evaluado la relación entre la localización de una mutación en la enzima y la concentración de POA producida. Se determinaron mutaciones en 4 áreas de la proteína: ACS, MBS, y EC. No encontramos mutaciones en el *pocket* de la enzima o sitio de unión a PZA. Las mutaciones presentes en el EC y el MBS resultaron tener un efecto negativo en la actividad enzimática ya que redujeron significativamente la producción de POA (252.7  $\mu\text{M}$  y 266.4  $\mu\text{M}$ , respectivamente) respecto de las mutaciones en la periferia, que produjeron una media de POA cercana al punto de corte de 665  $\mu\text{M}$ . De forma similar, Sheen *et al.* demostraron que las mutaciones H51R y D49N en el MBS causan mayor reducción de la actividad enzimática, en términos de producción de

POA(48). En ese mismo estudio se registra que las mutaciones en MBS producen una pérdida de actividad enzimática aproximadamente del 99% respecto a la media de la actividad de la cepa WT H37Rv, mientras que las mutaciones cercanas a los sitios activos (*core*), provocan una pérdida del 72% y las distantes (periferia) una pérdida del 47% de la actividad enzimática. En línea con dichos resultados, en nuestro estudio observamos que la producción de POA en muestras con mutaciones en EC y MBS, también se reduce altamente (88 %). Sin embargo, en muestras con mutaciones en periferia, la reducción alcanza un 70.6 %. Primero, hay que tomar en cuenta que en el estudio de Sheen *et al.* la producción de POA se midió directamente en las enzimas purificadas e *in vitro* lo cual permite la cuantificación directa y propia de la actividad enzimática, sin otros factores que influyen en la cantidad de POA final liberada por la micobacteria. El POA liberado por la micobacteria no sólo depende de la eficiencia enzimática sino de factores externos como la acción de bombas de eflujo que condiciona el adecuado transporte de POA hacia el exterior. Ya Zimic *et al.* demostraron que la tasa de eflujo de POA estaba fuertemente asociada a la resistencia a PZA ya que aislados resistentes presentaban bajas velocidades de eflujo, mientras que aislados sensibles altas tasas de eflujo (59) y que podía predecir la resistencia con hasta un 92.8% de sensibilidad y 100% de especificidad(76). En el estudio de Sheen *et al.* ya mencionado, se demostró que la actividad enzimática solo explicaba el 27.3% de la resistencia PZA(48) mientras que la tasa de eflujo de POA podía explicar alrededor del 51% (102). Por lo tanto, medir el POA producido por las micobacterias en el medio, explicaría mejor la susceptibilidad a PZA, que medir la actividad enzimática de forma aislada.

Con todo esto podemos inferir que la excelente capacidad predictiva del ensayo MODS-WQ en buffer citrato (ROC: 97.6%, Ki 0.87) en tan solo 13 días promedio de incubación desde que se cultiva las muestras de esputo hasta el resultado final se debe a que engloba factores como: la eficiencia enzimática y eficiencia de las bombas de eflujo, que juegan un rol en conjunto para delimitar la proporción de POA final que se detecta en el medio. Así mismo, supone una ventaja económica, lo cual es importante cuando se trata de países en vías de desarrollo con bajos recursos para sus laboratorios.

## 9. CONCLUSIONES

- En el ensayo MODS-WQ en buffer citrato se estableció un punto de corte de 665  $\mu\text{M}$  POA, que permitió obtener una sensibilidad y una especificidad significativamente superiores al 75% en un promedio de 13.5 días con las muestras evaluadas.
- En el ensayo MODS-WQ en 7H9 se estableció un punto de corte de 127  $\mu\text{M}$ , pero no permitió obtener una sensibilidad y especificidad significativamente superiores al 75% en un promedio de 13.5 días con las muestras evaluadas.
- La variante MODS-WQ en buffer citrato arrojó una sensibilidad del 92.1% y una especificidad del 95.9%. Mientras que la variante en 7H9 arrojó una sensibilidad y especificidad de 81.3% y 77.2%, respectivamente.
- Las mutaciones presentes en el sitio de unión al metal y en el *core* de la enzima, disminuyen significativamente la producción de POA en muestras evaluadas con el MODS-WQ en buffer citrato.

## 10. LIMITACIONES

- Los ensayos MODS-WQ en buffer citrato y en medio 7H9 se ejecutaron en muestras diferentes lo que podría haber añadido algunos sesgos en el análisis.
- El uso de muestras remanentes imposibilitó la realización de varias repeticiones, para validar resultados de susceptibilidad o reponer muestras contaminadas.
- Sólo se trabajó con un tiempo de incubación de 13 días en promedio, lo que evitó comprobar si un tiempo o menor o mayor de incubación podría mantener o mejorar los niveles de sensibilidad y especificidad de la prueba.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Francia; 2019 p. 297.
2. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* marzo de 2017; 58(1): E9-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432783/>
3. Wingfield T, Cuevas LE, MacPherson P, Millington KA, Squire SB. Tackling two pandemics: a plea on World Tuberculosis Day. *The Lancet Respiratory Medicine.* 1 de junio de 2020 ;8(6):536-8. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(20\)30151-X/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(20)30151-X/abstract)
4. TB Alliance. A Global Threat. Disponible en: <https://www.tballiance.org/why-new-tb-drugs/global-pandemic>
5. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Geneva; 2020.
6. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 30 de junio de 2017 ;34(2):299-310. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/2384>
7. MINSA. Situación de la Tuberculosis en el Perú y política nacional para su control. Perú; 2017.

8. Koch A, Cox H, Mizrahi V. Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Curr Opin Pharmacol.* octubre de 2018; 42:7-15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6219890/>
9. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Switzerland; 2018.
10. Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, et al. Prueba molecular Genotype® MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* . marzo de 2012;29(1):92-8. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1726-46342012000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342012000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
11. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin. Spain; 2016.
12. Puri L, Oghor C, Denkinger CM, Pai M. Xpert MTB/RIF for tuberculosis testing: access and price in highly privatised health markets. *The Lancet Global Health.* 1 de febrero de 2016 ;4(2):e94-5. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(15\)00269-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(15)00269-7/fulltext)
13. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of



mycobacteria. J Clin Microbiol. noviembre de 2000; 38(11):4167-70.  
Disponibile en: <https://doi.org/10.1128/jcm.38.11.4167-4170.2000>

14. Asencio Solis L, Sloutsky A, Stowel M. Método de nitrato-reductasa (GRIESS) para la detección rápida de la susceptibilidad a isoniacida y rifampicina. Instituto Nacional de Salud; 2012. Disponible en: <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1117>
15. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, et al. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. J Clin Microbiol. marzo de 2000;38(3):1203-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86377/>
16. Arias M F, Herrera M T. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. Revista chilena de enfermedades respiratorias. diciembre de 2016 ;32(4):254-9. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0717-73482016000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0717-73482016000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
17. Arnez-Durán RA, Ayllón-Anzaldo LA, Castro-Soto R, Lozano-Beltrán D. El Método MODS, una Alternativa para el Diagnóstico de la Tuberculosis y la Detección de Cepas Multidrogoresistentes. Revista Científica Ciencia Médica. diciembre de 2010 ;13(2):81-5. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1817-74332010000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1817-74332010000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

18. Teran R, De Waard J. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. *The Journal of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2015;26(4):310-25.
19. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. noviembre de 2009;13(11):1320-30.
20. Soares VM, Almeida IN de, Vater MC, Alves S, Figueredo LJ de A, Scherer L, et al. Genotype®MTBDRplus and Xpert®MTB/RIF in the diagnosis of tuberculosis and resistant tuberculosis: cost analysis in a tertiary referral hospital. *Rev Soc Bras Med Trop*. 7 de febrero de 2020 ;53. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/6sQTBmPbkDXcLYvBNhjdJmG/?lang=en#>
21. Steele MA, Des Prez RM. The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest*. octubre de 1988;94(4):845-50.
22. Zumla A, Chakaya J, Centis R, D'Ambrosio L, Mwaba P, Bates M, et al. Tuberculosis treatment and management--an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *Lancet Respir Med*. marzo de 2015;3(3):220-34.
23. Collaborative Group for the Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB treatment--2017, Ahmad N, Ahuja SD, Akkerman OW, Alffenaar JWC, Anderson LF, et al. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *Lancet*. 08 de 2018;392(10150):821-34.

24. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, et al. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes . 2nd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011 . (CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/>
25. Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. J Med Microbiol. enero de 2002;51(1):42-9.
26. Chedore P, Bertucci L, Wolfe J, Sharma M, Jamieson F. Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. J Clin Microbiol. enero de 2010;48(1):300-1.
27. Ramirez-Busby SM, Rodwell TC, Fink L, Catanzaro D, Jackson RL, Pettigrove M, et al. A Multinational Analysis of Mutations and Heterogeneity in PZase, RpsA, and PanD Associated with Pyrazinamide Resistance in M/XDR Mycobacterium tuberculosis. Sci Rep . 19 de junio de 2017 ;7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5476565/>
28. Sheen P, Requena D, Gushiken E, Gilman RH, Antiparra R, Lucero B, et al. A multiple genome analysis of Mycobacterium tuberculosis reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance. BMC Genomics. 11 de octubre de 2017;18:769. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4146-z>

29. Baddam R, Kumar N, Wieler LH, Lankapalli AK, Ahmed N, Peacock SJ, et al. Analysis of mutations in *pncA* reveals non-overlapping patterns among various lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports* . 15 de marzo de 2018 ;8(1):1-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-22883-9>
  
30. Wabale VR, Joshi AA, Muthaiah M, Chowdhary AS. Wayne's Assay: A Screening Method for Indirect Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* Clinical Isolates. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*. 12 de julio de 2017 ;5(1):1-9. Disponible en: <http://medcraveonline.com/JBMOA/JBMOA-05-00123.php>
  
31. Wayne G. L. Simple Pyrazinamidase and Urease Tests for Routine Identification of *Mycobacteria*. *Am Rev Respir Dis*. 1 de enero de 1974; 109(1):147-51. Disponible en: <https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/arrd.1974.109.1.147>
  
32. Alcántara R, Fuentes P, Antiparra R, Santos M, Gilman RH, Kirwan DE, et al. MODS-Wayne, a Colorimetric Adaptation of the Microscopic-Observation Drug Susceptibility (MODS) Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide Resistance from Sputum Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 de febrero de 2019 ;57(2). Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/57/2/e01162-18>
  
33. Hoffner S. Multidrug-resistant tuberculosis: The problem and some priorities in controlling it. *International Journal of Mycobacteriology*. 1 de diciembre de

2016; 5:S59. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212553116302205>

34. Van Cutsem G, Isaakidis P, Farley J, Nardell E, Volchenkov G, Cox H. Infection Control for Drug-Resistant Tuberculosis: Early Diagnosis and Treatment Is the Key. *Clin Infect Dis*. 15 de mayo de 2016 ;62(Suppl 3):S238-43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4845888/>
35. Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM, York T, Sampson SL, Streicher EM, et al. A Global Perspective on Pyrazinamide Resistance: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 28 de julio de 2015;10(7):e0133869.
36. Nasiri MJ, Fardsanei F, Arshadi M, Deihim B, Khalili F, Dadashi M, et al. Performance of Wayne assay for detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis study. *New Microbes and New Infections*. 1 de julio de 2021 ;42:100886. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297521000500>
37. Murray JF, Schraufnagel DE, Hopewell PC. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. *Annals ATS* . diciembre de 2015;12(12):1749-59. Disponible en: <https://www.atsjournals.org/doi/10.1513/AnnalsATS.201509-632PS>
38. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J Suppl*. julio de 2002;36:87s-94s.

39. Centers for Disease Control and Prevention. Treatment of Tuberculosis, American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America. MMWR. 2003;52.
40. Allué-Guardia A, García JI, Torrelles JB. Evolution of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains and Their Adaptation to the Human Lung Environment. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.612675>
41. Kolyva AS, Karakousis PC. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance. En: *Understanding Tuberculosis – New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*. Pere-Joan Cardona. INTECH Open Access Publisher; 2012.
42. Zhang H, Deng JY, Bi LJ, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis nicotinamidase /pyrazinamidase. *FEBS Journal*, 1 de febrero de 2008; 275(4):753-62. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2007.06241.x/abstract>
43. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal Structure of the Pyrazinamidase of Mycobacterium tuberculosis: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *PLoS One*. 24 de enero de 2011 ;6(1). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025910/>

44. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* noviembre de 2003;52(5):790-5.
45. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr.* agosto de 2014;2(4):MGM2-0023-2013.
46. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. pncA Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;44(3):528-32.
47. Ramirez-Busby SM, Valafar F. Systematic Review of Mutations in Pyrazinamidase Associated with Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 14 de agosto de 2015 ;59(9):5267-77. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00204-15>
48. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* marzo de 2009;89(2):109-13.

49. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1 de enero de 2003;7(1):6-21.
50. Modlin SJ, Marbach T, Werngren J, Mansjö M, Hoffner SE, Valafar F. Atypical Genetic Basis of Pyrazinamide Resistance in Mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 18 de mayo de 2021; 65(6):10.1128/aac.01916-20. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.01916-20>
51. Boni IV, Artamonova VS, Tzareva NV, Dreyfus M. Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1. *EMBO J*. 1 de agosto de 2001; 20(15):4222-32. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149162/>
52. Khan MT, Rehaman AU, Junaid M, Malik SI, Wei DQ. Insight into novel clinical mutants of RpsA-S324F, E325K, and G341R of *Mycobacterium tuberculosis* associated with pyrazinamide resistance. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 1 de enero de 2018; 16:379-87. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037018300989>
53. Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Sci Rep*. 21 de julio de 2017; 7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5522395/>



54. Vallejos-Sánchez K, Lopez JM, Antiparra R, Toscano E, Saavedra H, Kirwan DE, et al. Mycobacterium tuberculosis ribosomal protein S1 (RpsA) and variants with truncated C-terminal end show absence of interaction with pyrazinoic acid. *Sci Rep* . 20 de mayo de 2020; 10(1):8356. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-65173-z>
55. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Microbes & Infections* . 1 de enero de 2013;2(1):1-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/emi.2013.38>
56. White EL, Southworth K, Ross L, Cooley S, Gill RB, Sosa MI, et al. A novel inhibitor of Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase. *J Biomol Screen*. febrero de 2007;12(1):100-5.
57. Sun Q, Li X, Perez LM, Shi W, Zhang Y, Sacchettini JC. The molecular basis of pyrazinamide activity on Mycobacterium tuberculosis PanD. *Nat Commun* . 17 de enero de 2020; 11(1):339. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-14238-3>
58. Gopal P, Sarathy JP, Yee M, Rangunathan P, Shin J, Bhushan S, et al. Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nat Commun* . 3 de abril de 2020; 11(1):1661. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-15516-1>

59. Zimic M, Fuentes P, Gilman RH, Gutiérrez AH, Kirwan D, Sheen P. Pyrazinoic acid efflux rate in *Mycobacterium tuberculosis* is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis (Edinb)*. enero de 2012;92(1):84-91.
  
60. Nangraj AS, Khan A, Umbreen S, Sahar S, Arshad M, Younas S, et al. Insights Into Mutations Induced Conformational Changes and Rearrangement of Fe<sup>2+</sup> Ion in *pncA* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* to Decipher the Mechanism of Resistance to Pyrazinamide. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021; 8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2021.633365>
  
61. Willby MJ, Wijkander M, Havumaki J, Johnson K, Werngren J, Hoffner S, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis pncA* Mutations by the Nipro Genoscholar PZA-TB II Assay Compared to Conventional Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. enero de 2018;62(1):e01871-17.
  
62. World Health Organization. Update on the use of nucleic acid amplification tests to detect TB and drug-resistant TB: rapid communication . Geneva; 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240020269>
  
63. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva; 2021.
  
64. Juma SP, Maro A, Pholwat S, Mpagama SG, Gratz J, Liyoyo A, et al. Underestimated pyrazinamide resistance may compromise outcomes of

pyrazinamide containing regimens for treatment of drug susceptible and multi-drug-resistant tuberculosis in Tanzania. *BMC Infectious Diseases* . 7 de febrero de 2019 ;19(1):129. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3757-1>

65. Pullan ST, Allnutt JC, Devine R, Hatch KA, Jeeves RE, Hendon-Dunn CL, et al. The effect of growth rate on pyrazinamide activity in *Mycobacterium tuberculosis* - insights for early bactericidal activity? *BMC Infect Dis* . 17 de mayo de 2016;16:205. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1533-z>
66. Pérez del Molino ML, Tuñez Bastida V, García Ramos MR, Lado Lado FL. Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. *Med Integr* . 1 de marzo de 2002; 39(5):207-15. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-diagnostico-microbiologico-tuberculosis-13029946>
67. Universidad Peruana Cayetano Heredia. MODS: A User Guide. Microscopic Observation Drug Susceptibility Test. Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2008 p. 39.
68. World Health Organization. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva; 2021.
69. Karmakar M, Rodrigues CHM, Horan K, Denholm JT, Ascher DB. Structure guided prediction of Pyrazinamide resistance mutations in *pncA*. *Sci Rep* . 5

de febrero de 2020; 10(1):1875. Disponible en:  
<https://www.nature.com/articles/s41598-020-58635-x>

70. Tuval-Mashiach R. Is replication relevant for qualitative research? *Qualitative Psychology* . 2021;8(3):365-77. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1037/qap0000217>
71. Talkad P, Metoyer R. Replication and Transparency of Qualitative Research from a Constructivist Perspective . OSF Preprints; 2019. Disponible en:  
<https://doi.org/10.31219/osf.io/6efvp>
72. Alame-Emane AK, Xu P, Pierre-Audigier C, Cadet-Daniel V, Shen X, Sraouia M, et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* arises after rifampicin and fluoroquinolone resistance. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1 de junio de 2015;19(6):679-84.
73. Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide Susceptibility Testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a Systematic Review with Meta-Analyses. *Antimicrob Agents Chemother* . 10 de enero de 2011; 55(10):4499-505. Disponible en: <http://aac.asm.org/content/55/10/4499>
74. Butler WR, Kilburn JO. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 1983; 24(4):600-1. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC185381/>
75. Zhang N, Savic RM, Boeree MJ, Peloquin C, Weiner M, Heinrich N, et al. Optimizing pyrazinamide for the treatment of tuberculosis. *Eur Respir J* . julio

de 2021; 58(1):2002013. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8371453/>

76. Zimic M, Loli S, Gilman RH, Gutierrez A, Fuentes P, Cotrina M, et al. A new approach for pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Drug Resist.* agosto de 2012;18(4):372-5.
77. Havlicek J, Dachsel B, Slickers P, Andres S, Beckert P, Feuerriegel S, et al. Rapid microarray-based assay for detection of pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 1 de junio de 2019; 94(2):147-54. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889318308113>
78. Lam C, Martinez E, Crighton T, Furlong C, Donnan E, Marais BJ, et al. Value of routine whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance detection. *International Journal of Infectious Diseases.* 1 de diciembre de 2021; 113:S48-54. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971221002514>
79. Werngren J, Mansjö M, Glader M, Hoffner S, Davies Forsman L. Detection of Pyrazinamide Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021; 65(9):e00720-21. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8370246/>
80. Chung ES, Johnson WC, Aldridge BB. Types and functions of heterogeneity in mycobacteria. *Nat Rev Microbiol.* septiembre de 2022;20(9):529-41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9681535/>

81. Gu Y, Yu X, Jiang G, Wang X, Ma Y, Li Y, et al. Pyrazinamide resistance among multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates in a national referral center of China and its correlations with *pncA*, *rpsA*, and *panD* gene mutations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 de marzo de 2016; 84(3):207-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889315003880>
82. Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M, Wintjens R, Bifani P. Systematic Analysis of Pyrazinamide-Resistant Spontaneous Mutants and Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 2012; 56(10):5186-93. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3457413/>
83. Calderón RI, Velásquez GE, Becerra MC, Zhang Z, Contreras CC, Yataco RM, et al. Prevalence of pyrazinamide resistance and Wayne assay performance analysis in a tuberculosis cohort in Lima, Peru. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1 de agosto de 2017;21(8):894-901.
84. Pang Y, Zhu D, Zheng H, Shen J, Hu Y, Liu J, et al. Prevalence and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Southern China. *BMC Infectious Diseases*. 6 de noviembre de 2017; 17(1):711. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2761-6>
85. Zimic M, Sheen P, Quiliano M, Gutierrez A, Gilman RH. Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the *Mycobacterium tuberculosis*

pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*. marzo de 2010; 10(2):346-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134809002688>

86. khan MT, Malik SI, Ali S, Masood N, Nadeem T, Khan AS, et al. Pyrazinamide resistance and mutations in *pncA* among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *BMC Infectious Diseases*. 6 de febrero de 2019; 19(1):116. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3764-2>
87. Ei PW, Mon AS, Htwe MM, Win SM, Aye KT, San LL, et al. Pyrazinamide resistance and *pncA* mutations in drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Myanmar. *Tuberculosis*. 1 de diciembre de 2020; 125:102013. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979220301803>
88. Shi J, Su R, Zheng D, Zhu Y, Ma X, Wang S, et al. Pyrazinamide Resistance and Mutation Patterns Among Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Henan Province. *Infect Drug Resist*. 20 de agosto de 2020; 13:2929-41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7445508/>
89. Werngren J, Alm E, Mansjö M. Non-*pncA* Gene-Mutated but Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Why Is That? *Journal of Clinical Microbiology*. junio de 2017; 55(6):1920-7. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.02532-16>

90. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, et al. Phenotypic Characterization of *pncA* Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. septiembre de 2000; 44(9):2291-5. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.44.9.2291-2295.2000>
91. Campanerut PAZ, Ghiraldi LD, Spositto FLE, Sato DN, Leite CQF, Hiroyuki Hirata M, et al. Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 de mayo de 2011; 66(5):1044-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr057>
92. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture System II for Growth and Detection of *Mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. noviembre de 2000; 38(11):4167. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87558/>
93. Wu X, Lu W, Shao Y, Liu Q, Shi X, Wang X, et al. The indirect microscopic observation drug susceptibility assay demonstrated high concordance with the indirect MGIT method for pyrazinamide susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 de agosto de 2015; 70(8):2295-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv112>
94. Ghiraldi LD, Campanerut P a. Z, Spositto FLE, Sato DN, Leite CQF, Hirata M, et al. Evaluation of the microscopic observation drug susceptibility assay



for detection of Mycobacterium tuberculosis resistance to pyrazinamide. Clin Microbiol Infect. diciembre de 2011;17(12):1792-7.

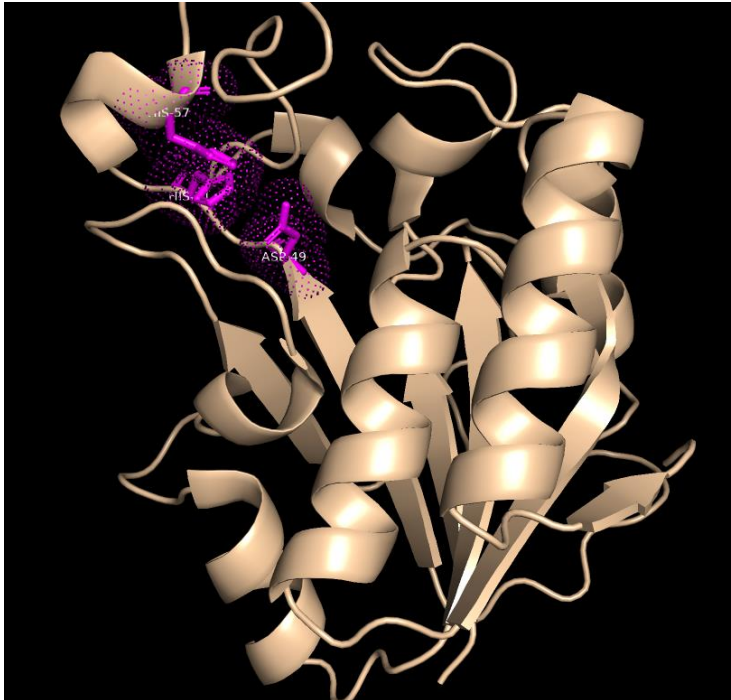
95. Lynn M, Wilson AR, Solotorovsky M. Role of bovine serum albumin in the nutrition of Mycobacterium tuberculosis. Appl Environ Microbiol . noviembre de 1979; 38(5):806-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243590/>
96. Topala T, Bodoki A, Oprean L, Oprean R. Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. Clujul Med . 2014; 87(4):215-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620676/>
97. Xu X, Zhang L, Shen D, Wu H, Liu Q. Oxygen-dependent oxidation of Fe(II) to Fe(III) and interaction of Fe(III) with bovine serum albumin, leading to a hysteric effect on the fluorescence of bovine serum albumin. J Fluoresc. enero de 2008;18(1):193-201.
98. Ueno HM, Urazono H, Kobayashi T. Serum albumin forms a lactoferrin-like soluble iron-binding complex in presence of hydrogen carbonate ions. Food Chem. 1 de febrero de 2014; 145:90-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.143>
99. Rudra S, Dasmandal S, Patra C, Kundu A, Mahapatra A. Binding affinities of Schiff base Fe(II) complex with BSA and calf-thymus DNA: Spectroscopic investigations and molecular docking analysis. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 5 de septiembre de 2016 ;166:84-

94. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142516302293>
100. Meinzen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, et al. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*. 1 de julio de 2016;99:41-6. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979215301608>
101. Alcántara R. Determinación de la susceptibilidad a pirazinamida de *Mycobacterium tuberculosis* mediante cultivo MODS de muestras de esputo [Master]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
102. Sheen P, Lozano K, Gilman RH, Valencia HJ, Loli S, Fuentes P, et al. pncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. septiembre de 2013; 93(5):515-22. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755357/>
103. Supo-Escalante RR, Médico A, Gushiken E, Olivos-Ramírez GE, Quispe Y, Torres F, et al. Prediction of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase function based on structural stability, physicochemical and geometrical descriptors. *PLOS ONE*. 31 de julio de 2020;15(7):e0235643. Disponible en:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0235643>

## 12. ANEXOS

### 1) Localización de las mutaciones del gen *pncA* en la estructura de la enzima

**MBS (Metal Binding Site):** sitio de unión al metal.



Aminoácidos:

His57

His51

Asp49

Cambios detectados:

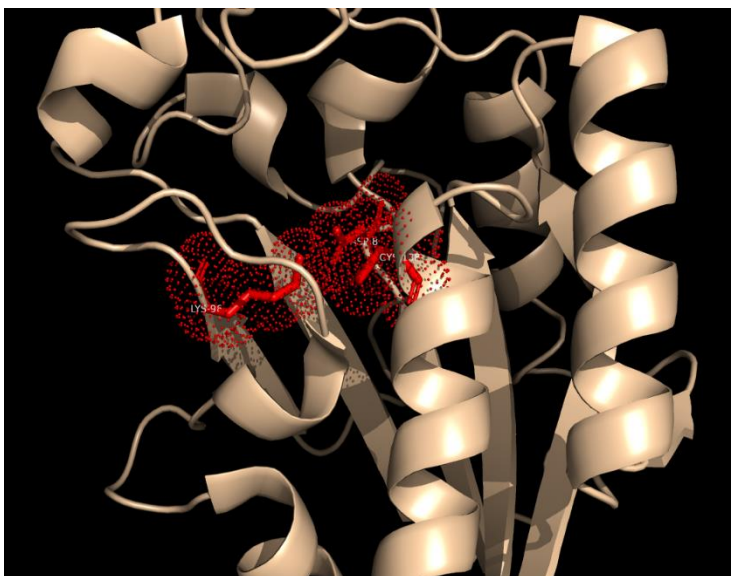
H57R

H57L

H51R

D49N

**SAC: Sitio activo catalítico**



Aminoácidos:

Asp8

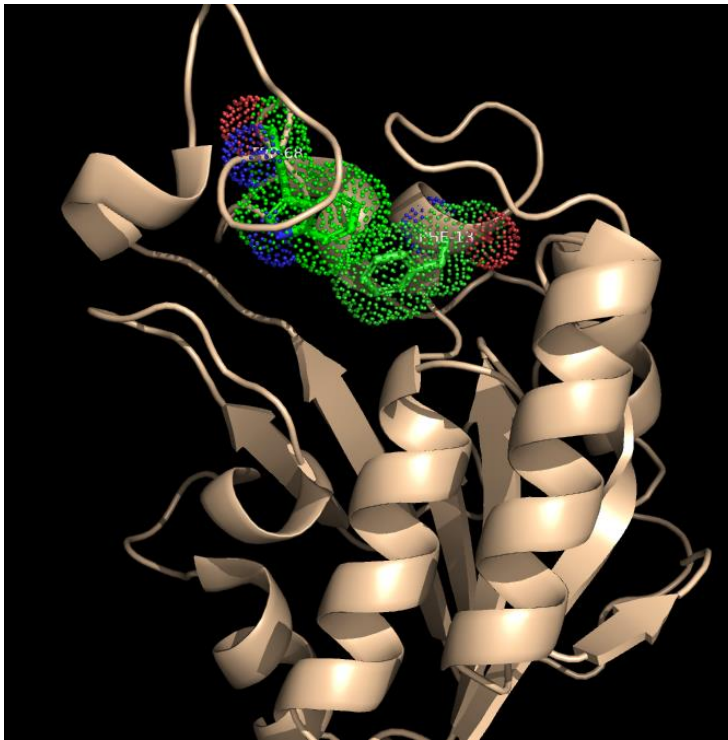
Lys96

Cys138

Cambios detectados:

D8E

PZBS (PZA Binding Site): Sitio de unión a la PZA



Aminoácidos:

Phe13

Trp68

No se encontraron cambios

CORE: Centro de la enzima, cercano a sitios activos, MBS, SAC y PZBS.

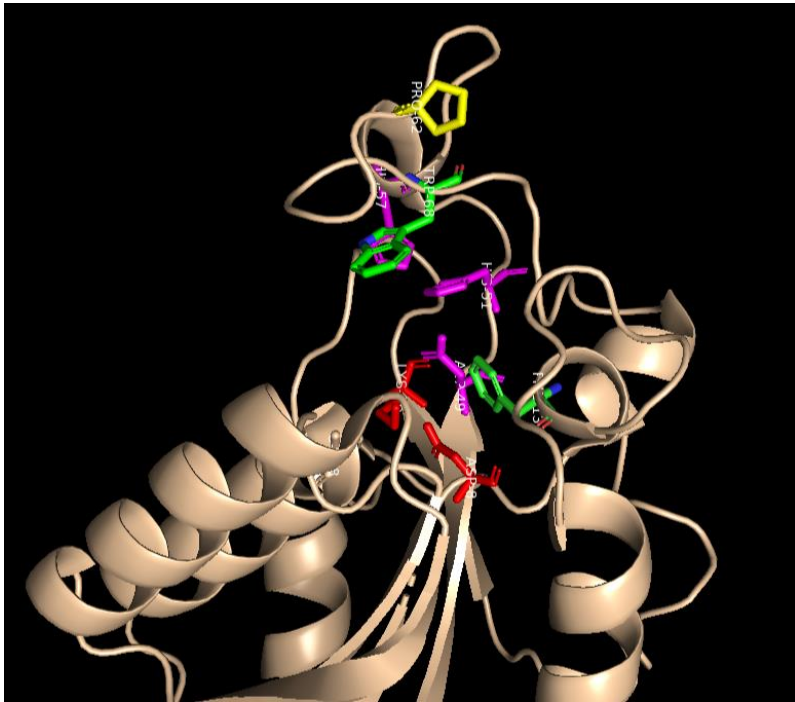


Aminoácido

H71

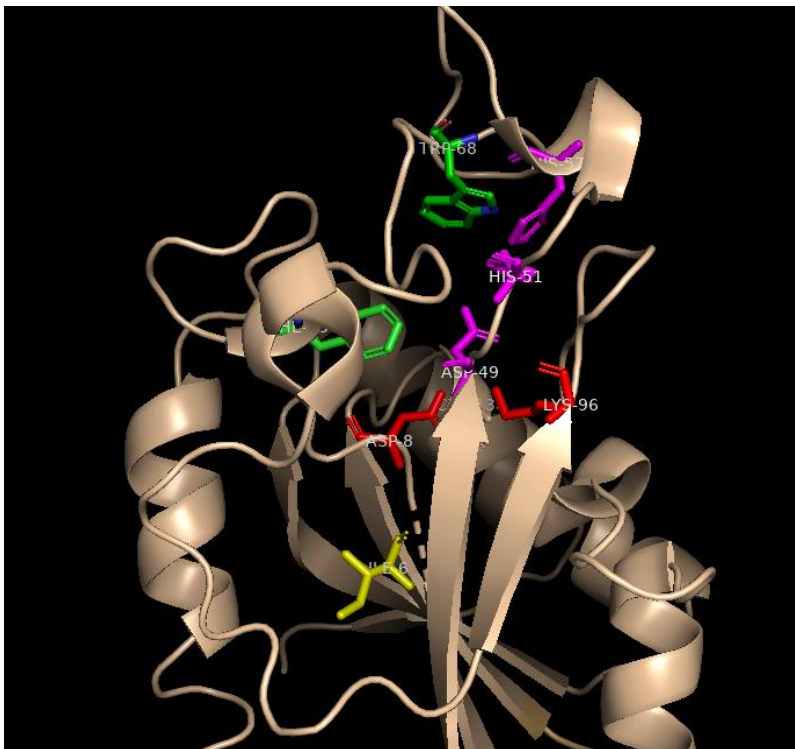
Cambios:

H71R



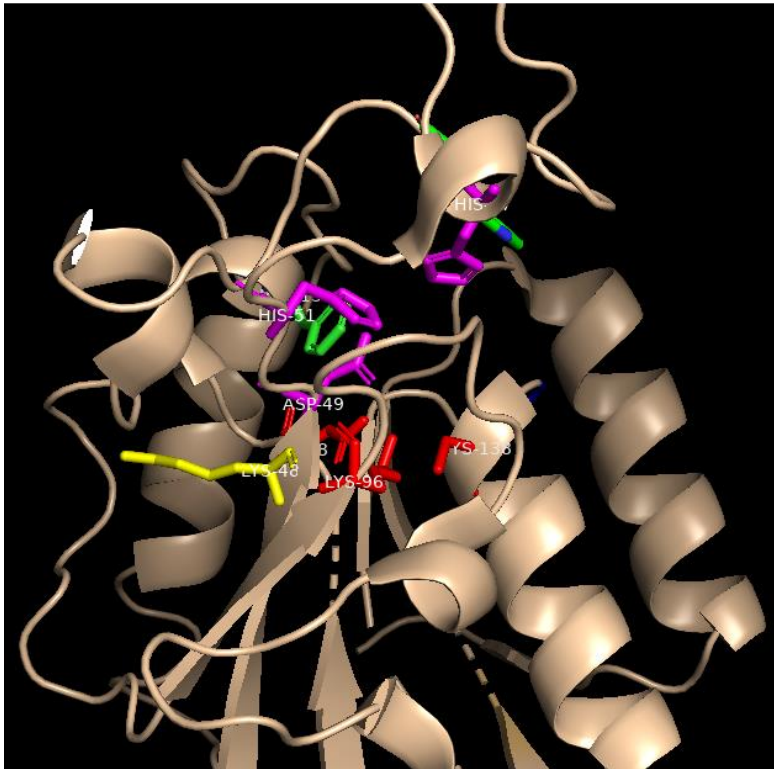
Aminoácido  
Pro62

Cambios:  
P62S



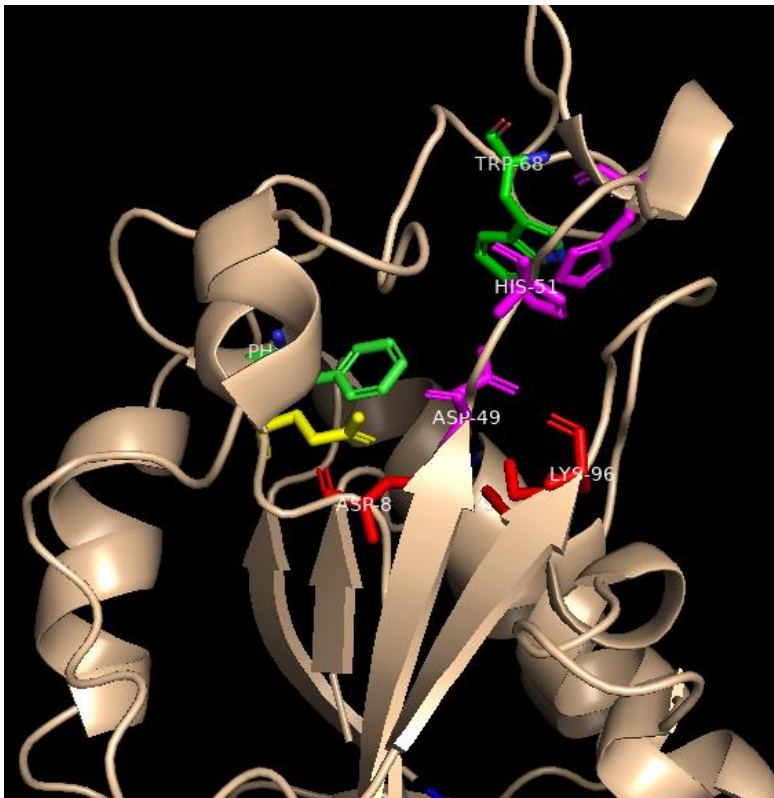
Aminoácido  
Ile6

Cambios:  
I6S



Aminoácido  
Pro62

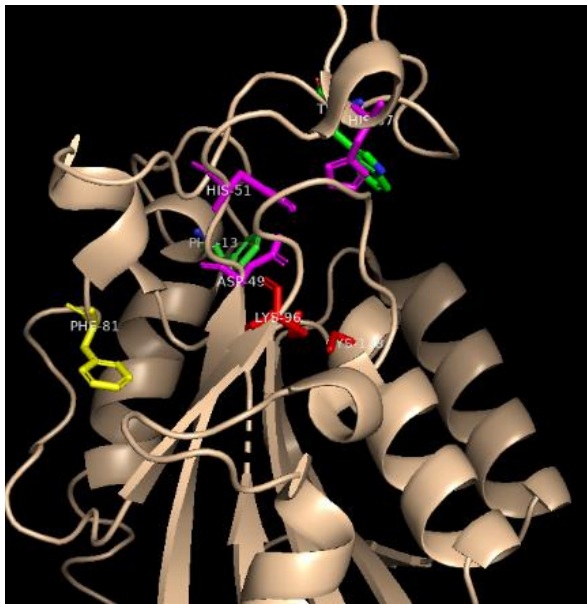
Cambios:  
P62S



Aminoácido  
Glu10

Cambios:  
Q10R  
Q10P

PERIFERIA: Zonas periférica de la enzima

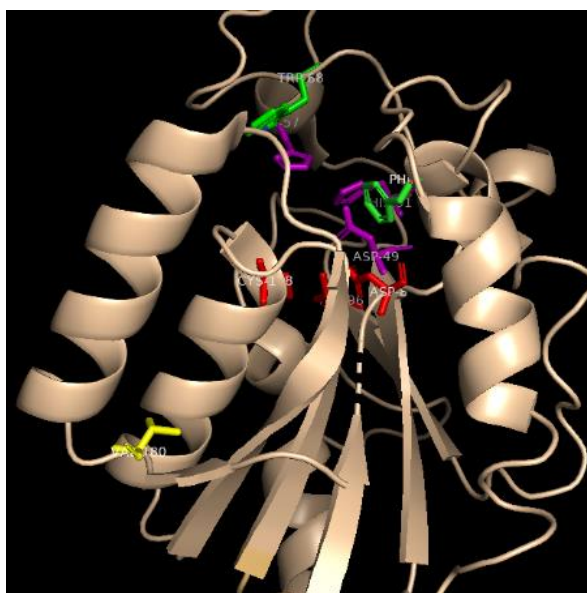
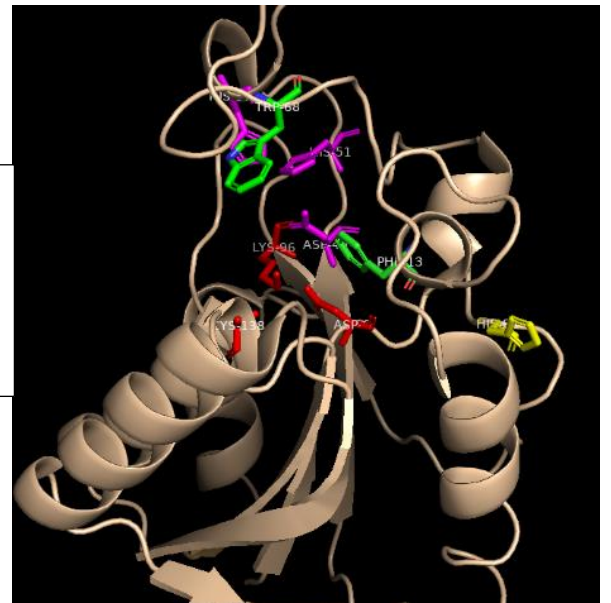


Aminoácido  
Phe81

Cambios:  
F81S

Aminoácido  
His82

Cambios:  
H82D



Aminoácido  
Val180

Cambios:  
V180F