



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

NUEVAS TÉCNICAS Y HERRAMIENTAS
PARA FACILITAR EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

JORGE ENRIQUE CORONEL HERRERA

LIMA – PERÚ

2023

ASESORA

PhD. Patricia Sheen Cortavarría

CO ASESOR

PhD. Mirko Zimic Peralta

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares

Laboratorio de Bioinformática

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima-Perú)

JURADO DE TESIS

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares

Universidad Peruana Cayetano Heredia

PRESIDENTE

DR. MIGUEL ANGEL QUILIANO MEZA

Laboratorio de Biomoléculas

Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas

VOCAL

DRA. MARITZA MERCEDES CALDERON SANCHEZ

Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Universidad Peruana Cayetano Heredia

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

A mi madre María, por ser pilar fundamental en mi vida que me impulsa cada día con sus consejos a ser una buena persona y a continuar con mi desarrollo profesional.

A mis hermanos Paola y Cesar por soportarme y ser parte importante de mi vida.

A mi sobrino Rodrigo por estar ahí siempre conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haber permitido que llegue a esta etapa y haberme dado salud y las fuerzas suficientes para lograr este gran paso.

A mis padres Jorge (QEPD) y María. Especialmente por su amor incondicional y motivación constante en todos los momentos de mi vida para lograr mis objetivos y lograr lo que soy hoy.

A mis hermanos: Paola, Jesús (QEPD) y Cesar. Por soportarme, quererme y apoyarme siempre. A mi sobrino Rodrigo, por ser parte importante en mi vida.

A mi gran amiga y maestra Luz Caviedes Rojas (QEPD). Por su apoyo y motivación incondicional siempre en lo personal y académico. Serás por siempre parte importante de mi vida y te recordare por siempre como la “Madre del MODS”.

A los Doctores: Robert Gilman, David Moore, Mirko Zimic y Patricia Sheen por ser siempre piezas importantes en mi recorrido profesional. Gracias por sus motivaciones y confianza en mi trabajo.

A todos los chicos guerreros del laboratorio de Bioinformática y del laboratorio en enfermedades infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

A Walter Solano y Patricia Fuentes del laboratorio de Mycobacterium en el LID por su colaboración con los ensayos microbiológicos y experimentos.

A Christian del Carpio, Erwin Dianderas, Edgar Fiorentini, Dr. Guillermo Kemper y demás integrantes del Círculo de investigación de variantes microbiológicas.

A la Dra. Zully Puyen, David Santos Aiko Vigo Miriam Alarcón y Vidia Cotrina del laboratorio de micobacterias del Instituto Nacional de Salud del Perú y los integrantes del consorcio CRyPTIC.

Al grupo de investigación Cytonote, Xiomara Chunga y Gabriel Jiménez, muy agradecidos por su ayuda.

A todos ellos y a todas aquellas personas que conocí y me apoyaron en el camino, muchas gracias, su ayuda permitió realizar y concluir este trabajo de tesis doctoral.

A todos ellos mi profundo agradecimiento, pero sobre todo gracias por su estima y amistad.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente trabajo ha sido financiado por las siguientes entidades:

- Círculos de Investigación 1473-2014-C1 CONCYTEC y Wellcome Trust Intermediate Fellowship (099805/Z/12/Z).
- Instituto Nacional de Salud del Perú y PROCIENCIA (Contrato N°230-2018-FONDECYT); Dirección de Investigación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima-Perú (A-055-2021-2); Premio Newton Fund Institutional Links (414591184 Moore PER); Wellcome Trust/Newton Fund–MRC Collaborative Award (200205/Z/15/Z para CRyPTIC) y la Fundación Bill y Melinda Gates (OPP1133541 para CRyPTIC).
- Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA)-CONCYTEC (Contrato N°003-2019-FONDECYT).

NUEVAS TÉCNICAS Y HERRAMIENTAS PARA FACILITAR EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	1%
2	bmcinfectdis.biomedcentral.com Fuente de Internet	1%
3	journals.plos.org Fuente de Internet	1%
4	core.ac.uk Fuente de Internet	1%
5	profiles.tdr-global.net Fuente de Internet	<1%
6	apps.who.int Fuente de Internet	<1%
7	docshare.tips Fuente de Internet	<1%
8	www.mdpi.com Fuente de Internet	<1%
9	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Introducción	1
I.2. Antecedentes	3
I.2.1. Biología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
I.2.2. Fisiología	4
I.2.3. Epidemiología.....	6
I.3. Métodos de diagnóstico microbiológico.....	13
I.3.1. Baciloscopia.....	13
I.3.2. Cultivo	14
I.3.3. Pruebas de sensibilidad a fármacos (DST)	16
I.3.4. Pruebas moleculares	18
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACION.....	22
II.1. Planteamiento	22
II.2. Justificación.....	24
II.3. Pregunta de investigación.....	29

III. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.....	30
IV. METODOLOGÍA.....	31
IV.1. Metodología - Artículo 1	31
IV.2. Metodología - Artículo 2	35
IV.3. Metodología - Artículo 3	39
V. RESULTADOS.....	44
V.1. Resultados - Artículo 1.....	44
V.2. Resultados - Artículo 2.....	48
V.3. Resultados - Artículo 3.....	53
VI. DISCUSIÓN.....	58
VI.1. Discusión específica de cada estudio.....	58
VI.2. Discusión integrada.....	68
VII. CONCLUSIONES.....	71
VIII. LIMITACIONES	73
IX. RECOMENDACIONES.....	76
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

X.1. Referencias capítulo I.....	77
X.2. Referencias artículo 1.....	82
X.3. Referencias artículo 2.....	85
X.3. Referencias artículo 3.....	91
XI. ANEXOS.....	
XI.1. ANEXO 1. Artículo 1	
XI.2. ANEXO 2. Artículo 2	
XI.3. ANEXO 3. Artículo 3	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de las concentraciones de los fármacos utilizados para la comparación entre la metodología APM y BMD UKMYC6.....	36
Tabla 2. Lecturas microscópicas de las variantes microbiológicas y procesadas con el ensayo de susceptibilidad a fármacos por Observación Microscópica (MODS) - muestras de esputo con cultivo positivo	44
Tabla 3. Carga de bacilos en las variantes microbiológicas en frotis paucibacilares y de 1+.....	45
Tabla 4. Rendimiento de la metodología BMD UKMYC6 en comparación con el APM para la determinación de la resistencia a los fármacos.....	51
Tabla 5. Analisis de los resultados discordantes entre el APM y la metodología BMD UKMYC6.....	53
Tabla 6. Performance de la microcopia sin lentes Cytonote comparado con el cultivo MODS para la detección de MTB en imágenes de cepas puras y muestras de esputo.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared celular <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
Figura 2. Fases de Infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
Figura 3. Fisiopatología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Figura 4. Tasas estimadas de incidencia de TB en el 2020.....	7
Figura 5. Tasas estimadas de incidencia de TB-RR/MDR en el mundo en el año 2021.....	9
Figura 6. Número estimado de casos notificados de TB-MDR y TB-XDR del 2016 al 2021 en el Perú.....	11
Figura 7. Tasas de morbilidad e incidencia de tuberculosis en el Perú	12
Figura 8. Diagrama de flujo de los tres estudios planteados en la tesis doctoral..	23
Figura 9. Diagrama de flujo de los procedimientos para evaluar las variantes microbiológicas y los sistemas de filtración de las muestras de esputo.....	31
Figura 10. Imágenes microscópicas representativas de los detritus según el proceso de variante microbiológica.....	32
Figura 11. Sistema de filtración por presión positiva para la concentración de micobacterias	34
Figura 12. Sistema de filtración presión negativa para la concentración de micobacterias.....	34
Figura 13. Configuración del Sistema Cytonote para la Adquisición de Imágenes de MTB de los Cultivos MODS.....	41
Figura 14. Detritus en microscopia Ziehl-Neelsen observados en todas las variantes microbiológicas	46

Figura 15. Recuento de bacilos para todas las variantes en imágenes de láminas coloreadas con Ziehl Neelsen.....	47
Figura 16. Tiempo de filtración del sistema de presión positiva comparado con el sistema de presión negativa.....	48
Figura 17. Distribución de las CMI's en comparación con los resultados obtenidos por APM.....	49
Figura 18. Patrón del crecimiento característico de los cordones de MTB en los cultivos MODS observados a un aumento total de 100X	54
Figura 19. Comparación de imágenes digitales de cultivos MODS positivos al día 8 de cultivo.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AF: Microscopia de fluorescencia con auramina

APM: Método de las proporciones en agar 7H10

BAAR: bacilos alcohol acido resistente

BMD: Microdilución en caldo

CC: Concentración critica

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CRyPTIC: Predicción integral de resistencia a la TB: Consorcio internacional

DST: Pruebas de susceptibilidad a fármacos

ECOFF/ECV: Valor de corte epidemiológico

I+D+i: Investigación, desarrollo e innovación

INH: Isoniacida

INS: Instituto Nacional de Salud

LAM: Lipoarabinomanano

LJ: Lowenstein Jensen

LRNM: Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias

LED: Light emitting diode (en español: diodo emisor de luz)

MNT: Micobacterias no tuberculosas

MODS: Ensayo de susceptibilidad a fármacos por observación microscópica

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

NALC: N-acetil-L-cisteína

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

POE: Procedimiento Operativo Estándar

RIF: Rifampicina

TB: Tuberculosis

TB-DR: TB farmacorresistente

TB-MDR: TB multidrogorresistente

TB-pre-XDR: TB-MDR/TB-RR con resistencia adicional a una fluoroquinolona

TB-RR: TB resistente a la rifampicina

TB-XDR: TB-pre-XDR con resistencia adicional a la bedaquilina o linezolid

UPCH: Universidad Peruana Cayetano Heredia

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

WGS: Secuenciamiento del genoma completo

ZN: Coloración Ziehl Neelsen

RESUMEN

La tuberculosis permanece como una enfermedad desafiante en el mundo. La detección de casos y de resistencia frente a los fármacos es vital. La baciloscopia convencional demuestra baja sensibilidad y las pruebas de sensibilidad son lentas. Las actuales herramientas diagnósticas requieren equipos sofisticados e insumos costosos. Con el objetivo de mejorar el diagnóstico actual, esta investigación doctoral: 1) Reporta dos variantes de la baciloscopia utilizando la tinción Ziehl-Neelsen y fluorescencia con Auramina y la concentración de micobacterias mediante la filtración del esputo con presión positiva y negativa; 2) Evalúa el desempeño del método de microdilución en caldo como prueba de sensibilidad en cepas de tuberculosis resistentes a los fármacos usando la placa UKMYC6 y 3) Evalúa el desempeño de la microscopia sin lentes Cytonote para reconocer y diagnosticar tuberculosis en los cultivos MODS. La sensibilidad de las variantes microbiológicas, pellet y pellet diluido fue un 7,1% y un 2% mayor en ZN y AF respectivamente, en comparación con el frotis directo y la filtración con presión positiva mejoró el rendimiento del frotis directo estándar. La placa UKMYC6 permitió determinar la concentración mínima inhibitoria para 13 fármacos en cepas resistentes y muestra buenos resultados diagnósticos para rifampicina, isoniazida, etambutol, etionamida, kanamicina y levofloxacin. Las imágenes obtenidas con Cytonote mostraron sensibilidades del 86,7%/97,4% para los cultivos de cepas puras y de 70,3%/86,6% para los cultivos de esputo comparados con el método MODS. En conclusión, las variantes propuestas y el uso de Cytonote demuestran ser ensayos simples, económicos y fiables que pueden ser usados en forma

extensiva para el diagnóstico de la tuberculosis. El uso de la placa UKMYC6 permite determinar la susceptibilidad a una amplia gama de fármacos en una sola plataforma asegurando un adecuado tratamiento para los casos resistentes.

PALABRAS CLAVE: Métodos de diagnóstico, baciloscopia, cultivo, pruebas de susceptibilidad, tuberculosis

ABSTRACT

Tuberculosis remains a challenging disease in the world. Detection of cases and drug resistance is vital. Conventional smear microscopy demonstrates low sensitivity and sensitivity testing is slow. Current diagnostic tools require sophisticated equipment and expensive supplies. With the aim of improving current diagnosis, this doctoral research: 1) Reports two variants of smear microscopy using Ziehl-Neelsen and Auramine fluorescence staining and the concentration of mycobacteria in sputum by positive and negative pressure filtration; 2) Evaluates the performance of the broth microdilution method as a susceptibility test in drug-resistant tuberculosis strains using the UKMYC6 plate and 3) Evaluates the performance of Cytonote lensless microscopy to recognize and diagnose tuberculosis in MODS cultures. The sensitivity of the microbiological variants, pellet and diluted pellet was 7.1% and 2% higher in ZN and AF respectively, compared to the direct smear. The proposed variants and positive pressure filtration improved the performance of the standard direct smear. The UKMYC6 plate allowed the determination of the minimum inhibitory concentration for 13 drugs in resistant strains and shows good diagnostic results for rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide, kanamycin and levofloxacin. Images obtained with Cytonote showed sensitivities of 86.7%/97.4% for pure strain cultures and 70.3%/86.6% for sputum cultures compared to the MODS method. In conclusion, the proposed variants and the use of Cytonote prove to be simple, cheap and reliable assays that can be used extensively for the diagnosis of tuberculosis. The use of the

UKMYC6 plate allows the determination of susceptibility to a wide range of drugs in a single platform, ensuring adequate treatment for resistant cases.

KEY WORDS: Diagnostic methods, smear microscopy, culture, susceptibility tests, tuberculosis

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

La tuberculosis (TB) es considerada la enfermedad infectocontagiosa que más muertes ha causado desde los inicios de la humanidad. Se plantea que *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) el agente causal de esta enfermedad, se originó en el Neolítico hace más de 150 millones de años [1]. Su presencia se ha reportado en momias egipcias e incas y desde esas épocas se presume que acompaña al hombre, sin embargo, no fue hasta 1750, durante la Revolución Industrial, la que contribuyó a su mayor transmisión a causa de las malas condiciones existentes, particularmente al hacinamiento, desnutrición y falta de saneamiento. Su alta infectividad acompañado de un tratamiento largo y con posibilidad de resistencia a los fármacos, hace que se mantenga presente como una enfermedad desafiante en el mundo [1, 2].

Mayormente la TB afecta los pulmones y se propaga en el aire cuando las personas afectadas expulsan las bacterias principalmente al toser o estornudar. Por lo general, los síntomas de la persona afectada son tos fuerte (por más de 2 semanas), debilidad, pérdida de peso, escalofríos y fiebre. La mayoría de personas son capaces de contenerla (estado latente), sin embargo, una pequeña proporción de personas infectadas (5-10%) van a desarrollar la enfermedad.

En la actualidad, a pesar de los esfuerzos para su control, la TB sigue presente como un importante problema de salud pública. En el año 2021, según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial estaba infectada con TB. De ellos, 10,6 millones de personas enfermaron y 1,6 millones murieron. Estos datos han permitido que la TB sea

considerada la segunda causa de muerte por algún agente infeccioso después del COVID-19 [3].

El aumento considerable de casos se atribuye a diversas causas, principalmente al aumento progresivo de la resistencia a los fármacos, que potencian la enfermedad originando retrasos en el diagnóstico y falta de adherencia al tratamiento. Los pacientes con TB farmacorresistente (TB-DR) a diferencia de los que tienen TB sensible, son pacientes más difíciles de tratar, requieren de un mayor tiempo de tratamiento y presentan una recuperación solo del 60% [4]. Esto es debido a que varios de los fármacos usados en ellos están poco caracterizados, no son tan eficaces, producen efectos adversos y presentan un costo elevado. El panorama en este caso no es alentador, se reporta que el número de casos de TB-DR tratados se redujo en un 15% de 177 100 en el 2019 a 150 359 en el 2020 acompañado de un éxito reducido al tratamiento de solo el 59% de casos. Por otro lado, el incremento de pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), potencian el riesgo de contraer la enfermedad y morir. Según datos reportados por la OMS en el 2020, este grupo representa el 8% de los casos totales de TB, de ellos 214 000 fallecieron [5]. Es, por tanto, que la aparición de las formas resistentes a los fármacos y la confección con el VIH funcionan como los principales impedimentos para su control y erradicación.

Frente a ello, el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno de la enfermedad deberían ser los pilares más importantes para reducir y controlar la alta carga de la TB y la TB-DR. Sin embargo, los esfuerzos realizados se han visto gravemente limitados especialmente por pruebas de diagnóstico imperfectas, que mayormente son poco sensibles y lentas. En las últimas décadas, se han

desarrollado nuevas herramientas de diagnóstico microbiológicas y moleculares, para la detección de casos y de resistencia a los fármacos. Sin embargo, la mayoría son de uso limitado dado su costo elevado para su implementación especialmente en los puntos de atención de los países de bajos recursos donde se reportan las cargas más altas de TB. En ese sentido, son necesarias nuevas herramientas y métodos para el diagnóstico de esta enfermedad.

I.2. Antecedentes

I.2.1. Biología de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis fue descubierto por Robert Koch en 1882. Pertenece al orden de los Actinomicetales, familia Mycobacteriacea, género *Mycobacterium*, especie *tuberculosis*. El género *Mycobacterium* agrupa a más de 120 especies, la mayoría son ambientales y no patógenas y se les denomina como micobacterias no tuberculosas (MNT); En el caso de MTB, está integrado dentro del complejo *M. tuberculosis* con otras 5 especies: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. canetti*. Fenotípicamente no se diferencian entre ellas sin embargo *M. tuberculosis* es la más frecuente de aislar en más del 95% de los casos. Es un patógeno intracelular obligado cuyo hospedero frecuente es el hombre, desencadenando en ellos respuesta de inmunidad celular. Las micobacterias son bacilos Gram positivos, aerobios que adoptan forma de bastoncillo de extremos redondeados, no móviles ni esporulados de 0,2-0,6 x 1x10 µm de tamaño. Se dividen lentamente, cada 18-20 horas, en comparación a los 20 minutos de la mayoría de bacterias y se inactiva con radiación ultravioleta y/o temperaturas por encima de 60°C [6]. Su gruesa pared celular es compleja, hidrofóbica y rica en

lípidos (60%), está compuesta por tres macromoléculas unidas covalentemente entre sí (peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos) y un lipopolisacárido, lipoarabinomanano (LAM), que se cree que está anclado a la membrana plasmática con una capa característica de ácidos micólicos que le confiere una fortaleza contra el ambiente bactericida en los macrófagos, barrera contra los fármacos, fuente de virulencia, así como resistencia a las decoloraciones acidas [7]; de ahí el calificativo de bacilos alcohol ácido resistente (BAAR) (Figura 1). Se les puede detectar en los extendidos de las muestras de esputos solos o agrupados.

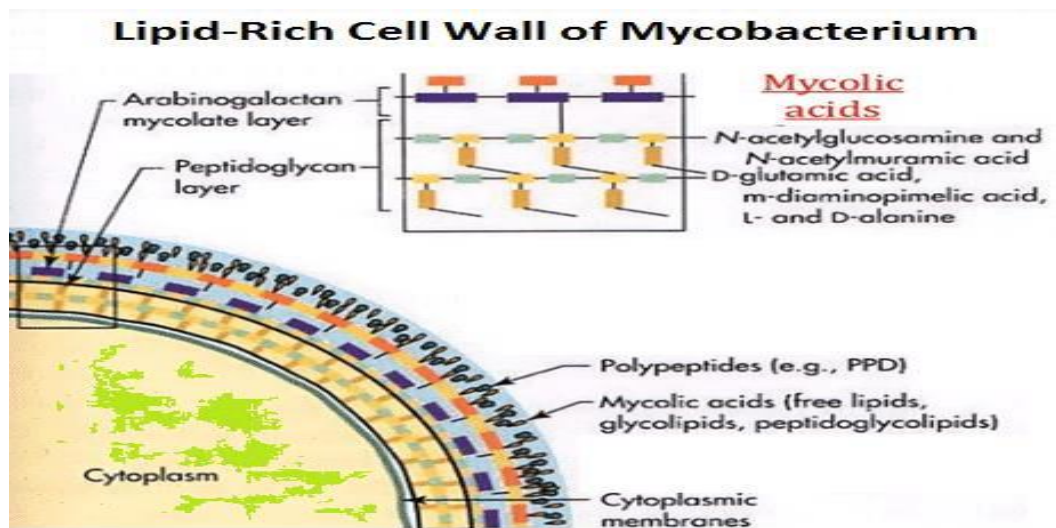


Figura 1. Estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Tomado de: Martynov et al., (2016) [8].

I.2.2. Fisiología

El mecanismo de transmisión más importante para el contagio de la TB es la vía aérea. La persona enferma al toser, estornudar, hablar o cantar, elimina pequeñas gotas en forma de aerosoles siendo las gotas de 1-5 μm cargadas de micobacterias, las que pueden quedar suspendidas en el aire de minutos a horas y por vía aérea son

capaces de infectar a otras personas depositándose en sus alveolos pulmonares [7, 8]. Después de ingresar MTB al organismo puede darse 2 diferentes situaciones: (1) En la mayoría de casos (90-95%) se da la contención de la infección donde los pocos bacilos que llegan a los alveolos son fagocitados por los macrófagos [7, 8] o (2) se produce la enfermedad en el 10 % de los infectados [7-9], de ellos, la mitad se da en forma temprana, a los pocos meses de la infección, mientras que el otro 5% en un tiempo mayor, en ocasiones hasta décadas para la reactivación endógena de las lesiones aparentemente curadas que contienen a las micobacterias (Figura 2).

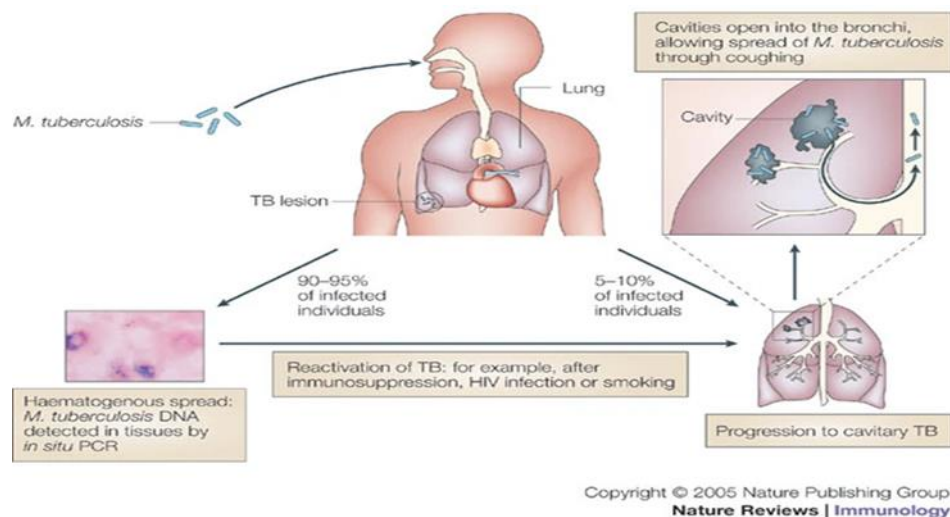


Figura 2. Fases de Infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de: Rook et al., (2005) [9].

Cuando las bacterias resisten la destrucción por parte de los macrófagos alveolares, pueden multiplicarse dentro de los macrófagos y destruirlos para liberarse al medio extracelular donde se expanden a los ganglios linfáticos, ingresan a la circulación y vuelven a diseminarse a los pulmones, afectando así potencialmente cualquier órgano del cuerpo del paciente [7-9].

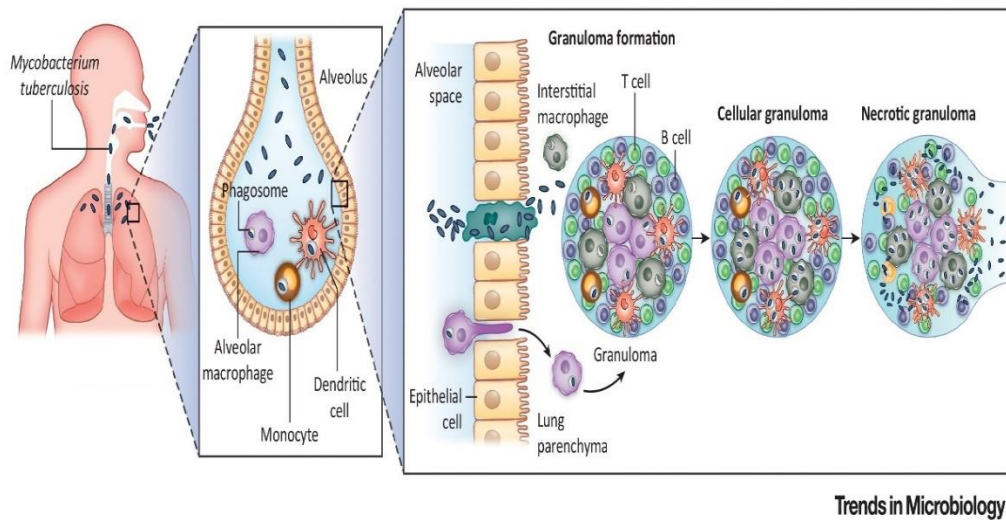


Figura 3. Fisiopatología de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de: Koch y Mizrahi (2018) [10].

I.2.3. Epidemiología

La TB se presenta como la enfermedad infecciosa que produce la mayor mortalidad en el mundo superada solo por el COVID-19. El panorama actual es desolador y se acentúa más tras la pandemia del COVID que ha revertido el progreso de los programas de control, así como la capacidad de detección de casos en muchos países [5]. Según el reporte del 2020 de la OMS, la mayoría de las personas que desarrollaron TB eran hombres adultos. El 43% de los casos nuevos se produjo en el Asia Sudoriental, seguida de África con el 25% y 18% en el Pacífico Occidental. El 90% de los nuevos casos de TB ocurrieron en 30 países siendo 8 de ellos los que representan los dos tercios de los nuevos casos de TB: India, China, Indonesia, Filipinas, Pakistán, Nigeria, Bangladesh y Sudáfrica. El impacto más notorio reportado, es la gran caída del número de personas recién diagnosticadas la cual disminuyó en un 18%, de 7,1 millones en el 2019 a 5,8 millones en el 2020. En el caso de la TB resistente, se

diagnosticaron a unas 465 000 personas de las cuales solo una de cada tres tuvo acceso al tratamiento [5]. Las tasas de incidencia difieren en todo el mundo, como puede observarse en la figura 4.

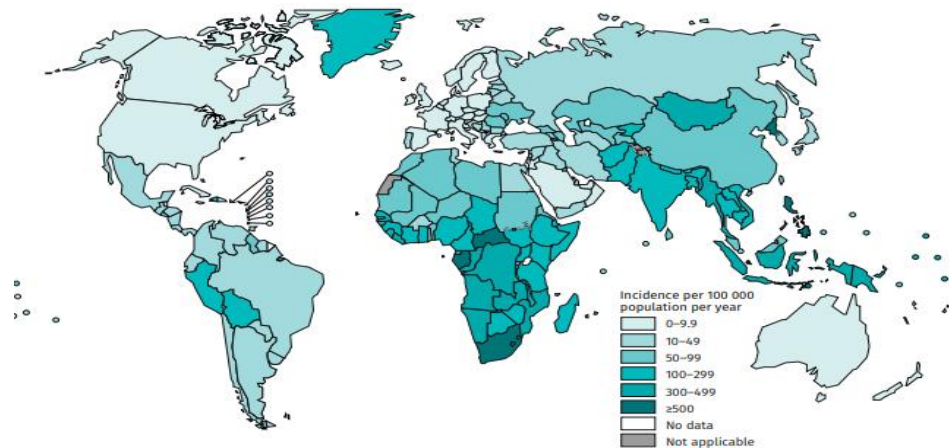


Figura 4. Tasas estimadas de incidencia de TB en el 2020. Tomado de OMS (2021)[5].

I.2.3.1. Situación mundial de la tuberculosis farmacorresistente (TB-DR)

La TB farmacorresistente (TB-DR) es considerada la forma más compleja para tratar la enfermedad a diferencia de la TB susceptible, representa un problema grave y amenazante para la salud mundial dado que conlleva a un mayor número de casos y muertes [5]. Desde el 2021, en respuesta a opciones de tratamiento más eficaces para los casos con resistencia, un grupo de expertos de la OMS actualizó la clasificación de la TB-DR en 5 categorías: TB resistente a la isoniazida, TB resistente a la rifampicina (TB-RR), TB multidrogorresistente (TB-MDR), que es definida como la TB resistente tanto a la isoniazida (INH) y la rifampicina (RIF), la TB pre extremadamente resistente (TB-pre-XDR) que es la TB-MDR/RR con resistencia adicional a una fluoroquinolona sea levofloxacin o moxifloxacin. Finalmente, la TB extremadamente resistente (TB-XDR) que es la TB más difícil

de curar y que se define como una TB-pre-XDR con resistencia adicional a otro fármaco del grupo A (bedaquilina o linezolid) [11]. La OMS espera que estas nuevas definiciones también conduzcan a una mejor notificación, vigilancia y seguimiento de todos los casos resistentes. En 2020, El número total de personas detectadas con TB-DR disminuyó un 22% entre 2019 y 2020, con 157 903 nuevos casos (132 222 casos de TB-MDR y TB-RR y 25 681 casos de TB pre-XDR o XDR) [12].

I.2.3.2. Situación mundial de la TB multidrogorresistente (TB-MDR) y TB resistente a la rifampicina (TB-RR)

A nivel mundial, se estima que el 3.6% (IC 95 %: 2,7–4,4 %) de personas con TB padecen de TB-MDR o TB-RR (TB-MDR/RR) entre los casos nuevos siendo mayor aun entre los casos previamente tratados con un 18 % (IC 95 %: 11–26%) [3]. Entre el año 2015 y el 2020 el número de casos se mantuvo estable, pero se incrementó en el 2021. Se estima que hubo 450 000 casos reportados (IC 95 %: 399 000–501 000) un 3,1 % más que los 437 000 (IC 95 %: 390 000–483 000) en el 2020. El incremento de casos se explica por el aumento de la incidencia general de TB entre 2020 y 2021 causado por el impacto de la pandemia del COVID-19 [3].

Con respecto al tratamiento, 2 de cada 3 personas que padecen TB MDR/RR no reciben tratamiento adecuado, En el 2021 hubo una reducción del 15% de las personas que recibieron tratamiento (177 100 y 150 359 en el 2019 y 2020 respectivamente) [12]. La tasa de éxito al tratamiento fue solo del 59% y 180 000 casos, que representa el 11% fallecieron [13]. Todo ello debido al aumento

considerable de casos resistentes, así como la poca disponibilidad de medicamentos, a las brechas socio económicas y de igual forma al impacto del COVID-19 que imposibilitó el acceso a los servicios de salud [12].

Tres países representan el 42% de los casos globales en el 2021: India (26%), la Federación Rusa (8,5%) y Pakistán (7,9%). Las proporciones más altas (>50% de los casos previamente tratados con TB-MDR/RR) son encontrados en la Federación Rusa y en varios países en Europa del Este y Asia Central. En 105 países, el 20 % de las personas con este tipo de resistencia, también presentan resistencia a las fluoroquinolonas [11].

La figura 5 muestra la incidencia estimada de TB-MDR/RR en el 2021, para países con al menos 1000 casos incidentes, siendo siete los países con la carga más alta en términos de número de casos y que representaron dos tercios de los casos de TB-RR/MDR a nivel mundial en 2021[3].

El factor de riesgo más importante para adquirir la TB-MDR es tener una historia de tratamiento previo. Otros factores de riesgo varían según el entorno, pero pueden incluir la hospitalización, el encarcelamiento y la infección por el VIH.

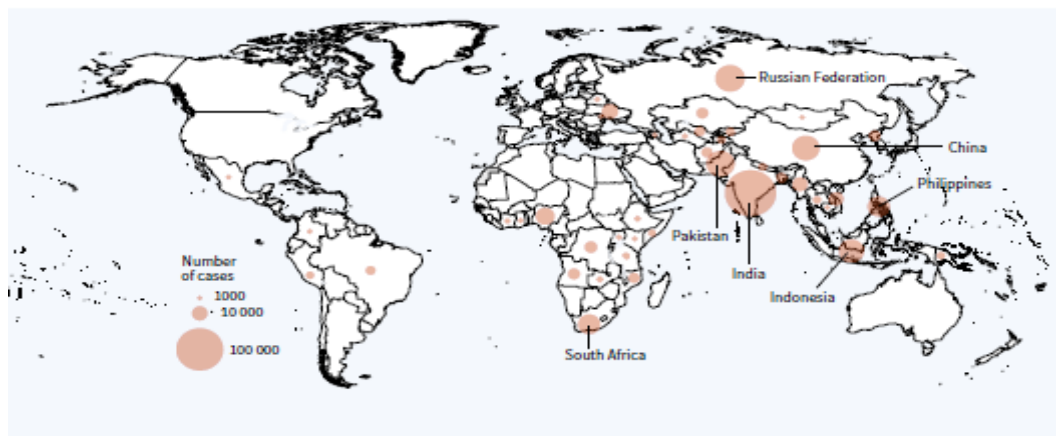


Figura 5. Tasas estimadas de incidencia de TB-RR/MDR en el mundo en el año 2021. Tomado de: OMS (2022)[3].

I.2.3.3. Situación mundial de la TB pre extremadamente resistente (TB-pre-XDR) y la TB extremadamente resistente (TB-XDR)

La TB-pre-XDR y la TB-XDR son las formas más agresivas y letales de la enfermedad, dado que son resistentes a la mayoría de fármacos utilizados para el tratamiento de la TB y por tanto un problema serio para su control y erradicación. Se encuentran ampliamente distribuidas y se asocian a una desoladora respuesta al tratamiento y alta probabilidad de morir. Los datos disponibles son escasos, sin embargo, a fines del 2018 se reportaba que al menos un caso de TB-XDR había sido notificado por los 131 países miembros de la OMS. En el 2020, se detectaron 25 681 casos de pre-TB-XDR o TB-XDR en el mundo [5]. La información disponible señala que el 6.2% (RI 95 %: 4,4–8,2 %) de los casos con TB-MDR también presentaban TB-XDR, siendo Bielorrusia (29%) y Lituania (25%), los países con la proporción más alta de casos. El éxito del tratamiento es muy bajo, con solo un 39% [13].

I.2.3.4. Situación de la tuberculosis en el Perú

La historia de la TB en el Perú data desde la época prehispánica y su presencia se evidencia gracias a las lesiones tuberculosas óseas en momias de la época y que fueron descritas por cronistas en la conquista. El problema siguió durante la época republicana y desde ahí se mantiene como una enfermedad endémica [14].

En la década de los años 1980, el Perú fue calificado como un país con endemia severa dada sus altas tasas de prevalencia e incidencia con cobertura al tratamiento limitado. Dado este panorama, en 1990 con el acceso a recursos económicos y capacitaciones al personal de salud, se fortalece el programa de control que permitió tratamientos gratuitos, mejorar el diagnóstico, así como

impulsar el tratamiento directamente supervisado de corta duración considerado en su época como un gran modelo para los países con alta endemia. Como resultado, se logró curar al 85% de los casos de TB sensible y reducir la mortalidad significativamente. Ello permitió que el Perú fuera removido de la lista de los 23 países con mayor prevalencia de TB en el mundo. Sin embargo, a mediados de la década de los 90 se detectaron también los primeros casos de TB-MDR en el país y hasta el 2003, se observó una disminución sostenida mayor al 8% anual de los casos. Posterior a esta época, el panorama epidemiológico permanece estacionario y desafiante [15].

Actualmente el Perú, se encuentra entre los 30 países con la mayor carga de TB-MDR a nivel mundial. De igual forma su posición dentro de la Región de las Américas no es alentadora. En el año 2019, se notificaron 39 000 casos que representa el 13,4 % de los casos totales del continente y con respecto a los casos TB-MDR/RR y TB-XDR ocupa el primer lugar con 1464 y 89 casos respectivamente [16,17].

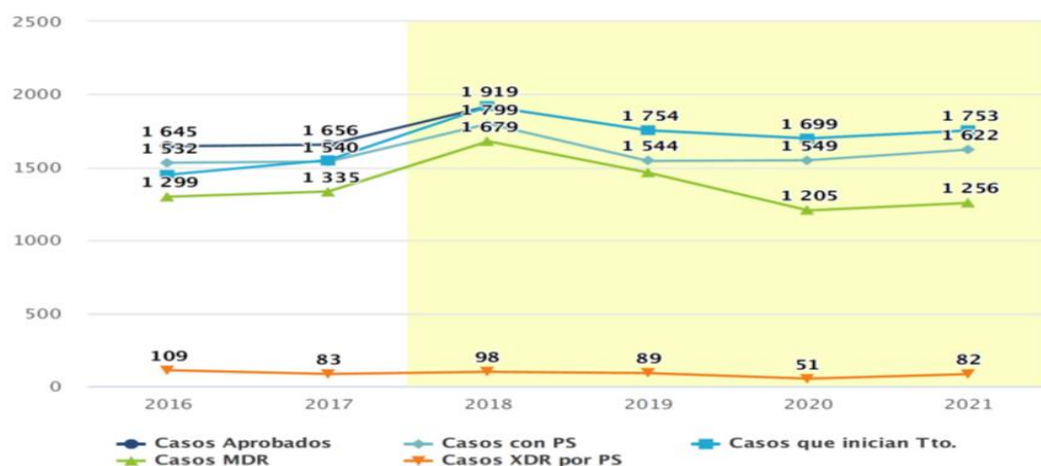


Figura 6: Número estimado de casos notificados de TB-MDR y TB-XDR del 2016 al 2021 en el Perú. Tomado de: Ministerio de Salud-Portal de Información Peruano (2021)[17].

Las tasas de morbilidad e incidencia hasta el 2019 han permanecido estables en el Perú; sin embargo, disminuyó a partir del 2020 dado el impacto negativo de la pandemia COVID-19 donde no hubo acceso a los servicios de salud de TB y los datos no reflejan ciertamente los casos nuevos ni cuantos están enfermos actualmente [17]. Ver Figura 7.

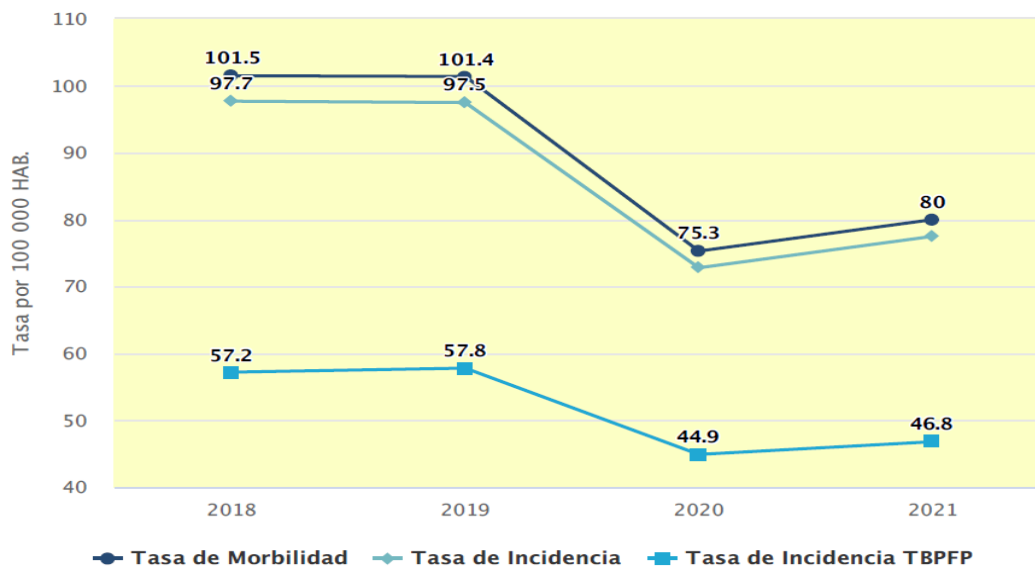


Figura 7. Tasas de morbilidad e incidencia de tuberculosis en el Perú.

Tomado de: Ministerio de Salud-Portal de Información peruano (2021)[17].

Notas: Hasta el 2017 informe operacional manual, 2018 sistema de información gerencial de la tuberculosis (SIGTB).

Abreviaturas: TBPF= Tuberculosis pulmonar frotis positivo

Los casos de TB están distribuidos en los 24 departamentos del país, sin embargo, su capital Lima y la Provincia Constitucional del Callao alberga al 61% de los casos de TB, el 78% de los casos de TB-MDR y 83% TB-XDR. Adicionalmente, Tacna Ucayali, Madre de Dios, Loreto y Tumbes son los departamentos con las más altas cargas de TB.

I.3. Métodos de diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de la TB se establece a partir de los signos y síntomas clínicos que presenta la persona afectada, sin embargo, su confirmación descansa en la microbiología, es decir, la detección de MTB a partir de una muestra biológica. [18]. El diagnóstico microbiológico, pese a los esfuerzos para el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, sigue dependiendo del uso de la baciloscopia, el cultivo y pruebas de susceptibilidad que permiten detectar y conocer el patrón de resistencia de MTB frente a los fármacos. Ningún método consigue captar el 100% de afectados, por lo que el 10-15% de casos de TB pulmonar y hasta el 50% en algunas formas de TB extrapulmonar no tendrán confirmación microbiológica y se apoyarán en la clínica y en la respuesta al tratamiento [19]. Aun así, los ensayos microbiológicos son las pruebas de referencia en el diagnóstico de la enfermedad.

I.3.1. Baciloscopia

La baciloscopia es el método de uso universal para el diagnóstico de la TB, fue desarrollado hace más de 100 años por Franz Ziehl y Frederick Neelsen y es hasta hoy la base del diagnóstico en muchos países dado que es simple, rápido y económico en el cual las micobacterias previamente coloreadas son observadas directamente de una muestra clínica usando un microscopio.

La tinción clásica más utilizada es la coloración de Ziehl-Neelsen (ZN) que tiñe a las micobacterias de rojo sobre un fondo azul, es considerada la prueba de primera elección en el diagnóstico, sin embargo, su limitante es su baja sensibilidad (40-50%) ya que se necesita 10^4 bacilos/mL o más para poder ser detectados, asimismo, en pacientes con TB extrapulmonar, coinfectados con el VIH y en pediátricos el rendimiento es aún menor [20, 21]. El resultado de la tinción se

expresa en una escala semicuantitativa de 0 a 3 cruces, que reflejan la intensidad de la carga bacteriana, por tanto, la baciloscopia puede ayudar al diagnóstico, determinar la extensión de la enfermedad, al monitoreo del tratamiento, así como indicador de contagiosidad del paciente.

En los últimos años, una alternativa a la baciloscopia convencional con ZN es el uso de tinciones fluorescentes como la auramina que permite una detección más rápida y lecturas de múltiples muestras. Esta técnica es más sensible (aumenta un 10%) que ZN y se justifica su uso en laboratorios con alta carga, sin embargo, requiere lectura inmediata dentro de las 24 horas dado que la fluorescencia se desvanece en el tiempo [22], además requiere de un observador con mayor experiencia y un microscopio de fluorescencia que suele ser costoso. Recientemente, se han diseñado microscopios basados en tecnología light-emitting diode (LED) que tienen el respaldo de la OMS dado que son más económicos, de bajo mantenimiento y que se pueden usar como alternativa frente a la baciloscopia convencional [23]. En estudios recientes, se han propuesto alternativas para mejorar la sensibilidad de la baciloscopia, sin embargo, se requiere del uso de nuevas variantes microbiológicas y/o métodos de concentración que permitan aumentar la detección de casos de TB [24].

I.3.2. Cultivo

Ante las limitaciones de la baciloscopia, los métodos de cultivo son considerados los métodos de referencia en el diagnóstico de la TB dado que son más sensibles y pueden detectar entre 100-1000 bacterias/mL [19]. Antes de realizar el cultivo, las muestras deben someterse a un proceso previo conocido como descontaminación para eliminar la flora bacteriana acompañante. Este proceso

implica someter a las muestras no estériles como el esputo a agentes alcalinos para que lisen las bacterias presentes y queden solo viables las micobacterias, las cuales sobreviven gracias a la estructura de su pared bacteriana, aun así, se reporta que este proceso no es inocuo a ellas y que dependiendo del tiempo de exposición y otros factores el 30% morirá [18, 19]. Este proceso proporciona al cultivo de MTB una complejidad específica y además condiciones de seguridad superiores en el manejo de muestras a diferencia de la mayoría de otros microorganismos [19].

Los medios de cultivo tradicionales para cultivar micobacterias son específicos. Los más usados en los países en vías de desarrollo son los medios sólidos a base de huevo en su preparación como el Ogawa y el Lowenstein-Jensen (LJ). Entre los medios sólidos con agar y sin huevo los más usados son Middlebrook 7H10 y 7H11. La desventaja común de todos ellos es la lentitud para detectar MTB macroscópicamente, pueden tardar hasta 2 meses si provienen de muestras con baciloscopia negativa [18, 24]. Dado este inconveniente, en la década de 1990 se desarrolló e impulsó el uso de medios de cultivo líquidos a partir de diferentes sistemas que han demostrado ser más sensibles y rápidos [25]. El primer sistema usado que brindó resultados rápidos de 5-7 días fue el método radiométrico BACTEC 460TB (Becton Dickinson, MD, EE.UU.), sin embargo, su desventaja es el uso de radiactividad, el medio líquido 12B es marcado con C^{14} para detectar el CO_2 producido por el crecimiento bacteriano. Posteriormente se han desarrollado métodos más automáticos como el BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, MD, EE.UU.), MB BacT (BioMerieux, Francia) y Versa TREK (Termo Fisher, MA, EE.UU.) [25]. Todos ellos basados en fluorescencia ya que incorporan en cada tubo de cultivo sensores fluorométricos los cuales son sensibles a cambios de la

concentración de CO₂ producidos por el crecimiento bacteriano y que son detectados por las incubadoras de estos sistemas. Pese a sus bondades estos sistemas requieren de constante supervisión y costo elevado para su implementación lo cual hace ser considerados como métodos de uso limitado.

Ante ello en los últimos años un grupo multidisciplinario de investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia desarrollo el método MODS o ensayo de susceptibilidad a fármacos por observación microscópica el cual ha demostrado ser una herramienta económica, sensible, específica y de reconocida aplicación. MODS se encuentra implementado en el Programa Nacional de Control contra la TB en el Perú y en el 2010 la OMS recomendó su uso como prueba rápida de diagnóstico de la TB-MDR. Este método se basa en el diagnóstico simultáneo de la TB y la TB-MDR en placas de 24 pocillos conteniendo muestras de esputo descontaminadas y resuspendidas en medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 [26, 27, 28]. La base del diagnóstico microbiológico se da con la detección del crecimiento característico de las colonias de MTB tipo cordón en el medio líquido entre los 7-9 días de incubación utilizando un microscopio de luz invertida que suele ser costoso y de operadores expertos en la lectura microscópica. Frente a ello, nuevos sistemas de lectura alternativo que permitan evitar el uso del microscopio y hacer más automática las lecturas se están evaluando para masificar su uso.

I.3.3. Pruebas de sensibilidad a fármacos (DST)

Después que MTB se aísla en un cultivo, es crucial realizar en forma temprana las pruebas de sensibilidad para determinar el patrón de resistencia de los aislados frente a los fármacos que permitan que los pacientes reciban una terapia adecuada, este procedimiento puede demorar de 1 a 4 semanas adicionales luego

del cultivo y según el medio de cultivo utilizado [24]. El método de referencia ampliamente usado en países de escasos recursos por su bajo costo es el método de las proporciones descrito por Cannetti y Grosset en 1963 [29]. Fue recomendado por la OMS y se emplea como un método indirecto para determinar el patrón de resistencia a fármacos, a partir de un cultivo positivo a MTB [14]. Involucra la inoculación de MTB en medios sólidos como el LJ o el Middlebrook 7H10 con y sin fármacos. Se basa en medir la proporción de bacilos resistentes ($\geq 1\%$) que existen en una cepa de MTB a una concentración de fármacos capaz de inhibir el crecimiento de bacilos sensibles, pero no los resistentes [18, 29]. En estas condiciones las colonias no pueden ser detectadas hasta 30 o 60 días luego de la inoculación. Actualmente se están dejando de usar ya que la dificultad reside en preparar adecuadamente los inóculos para calcular adecuadamente la proporción de bacterias resistentes y ser además una técnica muy laboriosa [19].

Dado este panorama, actualmente se está usando métodos semiautomatizados en medios de cultivos líquidos que brindan rápidos resultados con el mismo principio del método de las proporciones. Durante dos décadas, el método más usado fue el sistema radiométrico BACTEC 460TB, convirtiéndose en el método de referencia de las pruebas de susceptibilidad, sin embargo, al involucrar el uso de radiactividad dejó de utilizarse [19]. Actualmente los métodos más utilizados comerciales son el BACTEC MGIT960, MBBacT y VersaTREK los cuales como se ha detallado tienen la ventaja de no usar radiactividad, lo cual los hace más seguros. Sin embargo, involucra alto costo y dependen igualmente del uso de un cultivo primario para ejecutar los ensayos de susceptibilidad lo cual implica una inversión de varias semanas para obtener resultados.

Asimismo, existen otras estrategias de ensayos de susceptibilidad alternativos colorimétricos que utilizan medios líquidos en microplacas, se basan en aprovechar la actividad metabólica de MTB y en la reducción de un indicador que se agrega al medio de cultivo líquido luego que se dispensa una suspensión de MTB a la microplaca que contiene fármacos a diversas concentraciones, permitiendo medir la concentración mínima inhibitoria (CMI) y detectar la resistencia con el cambio de color del indicador. Dentro de estos ensayos tenemos la nitrato reductasa, Alamar Blue, MTT y resazurina [30]. Se ha demostrado que son útiles y de buen rendimiento al compararlos con los métodos convencionales [30]; sin embargo, la limitación común de todos, es ser laboriosos, de alto costo y sin ningún respaldo regulatorio. Actualmente las placas de microtitulación en caldo en formato seco, ofrecen evaluar un alto rango de concentraciones y una gran cantidad de fármacos incluidos los recientemente recomendados para el tratamiento de la TB-MDR. Los primeros estudios reportan una buena concordancia categórica (92-100%) al compararse con el método de las proporciones [30, 31] y la OMS actualmente está evaluando la viabilidad para su uso.

I.3.4. Pruebas moleculares

Dadas las limitaciones de la baciloscopia y cultivo, en los últimos 25 años se desarrollaron estrategias genotípicas a partir del conocimiento de las bases moleculares de MTB que permitan su detección. La diana genética más estudiada por las pruebas caseras de amplificación de ácidos nucleicos es la secuencia de inserción IS6110 generalmente usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica que se utilizó ampliamente en algunos lugares dada sus expectativas generadas como herramienta rápida de diagnóstico 2-3 días. En la práctica los

resultados demostraron ser inconsistentes y variables, además, no se ha establecido su real costo/efectividad para su implementación [19]. Estas técnicas implican un paso previo que es la extracción de ADN que suele ser difícil dada la complejidad de la pared de bacteriana de MTB y que puede inhibir la amplificación. En la práctica, difícilmente se consigue amplificar muestras con menos de 3 000 - 5 000 bacterias/mL. Esta sensibilidad las coloca en una posición intermedia entre la microscopia y el cultivo además que requieren instalaciones adecuadas, equipos costosos y experiencia por parte del operador [19].

En vista de los inconvenientes de las pruebas moleculares caseras se han desarrollado herramientas genéticas comerciales que están permitiendo la detección y conocimiento rápido de resistencia a los fármacos antituberculosos. Algunas se basan en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR y otros en ensayos de hibridación con sondas de ADN.

Actualmente, la OMS recomienda el uso de pruebas moleculares como prueba diagnóstica inicial en un paciente sospechoso de TB [3, 32]. Entre ellas se incluye: ensayos Xpert MTB/RIF y Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, EE. UU.); prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (TB-LAMP; Eiken Chemical, Tokio, Japón); Pruebas Truenat MTB, MTB Plus y MTB RIF Dx (Molbio Diagnostics, Goa, India) y ensayo de lipoarabinomanano en orina de flujo lateral (LF-LAM; Alere Determine TB LAM Ag, Abbott, San Diego, EE. UU.) [32, 33].

Desde el 2010, la OMS recomienda el uso del método Xpert (MTB/RIF o MTB/RIF Ultra) [32, 34]. Estos métodos se basan en la detección y amplificación del ADN de MTB, así como mutaciones asociadas con la resistencia a RIF a lo

largo del gen *rpoB*. El ensayo se da en un solo paso con el uso de un cartucho donde ocurre el proceso de la muestra y la reacción de PCR en tiempo real dentro de las 2 horas [34]. Se reporta que su rendimiento es comparable con los ensayos Truenat MTB, MTB Plus y MTB-RIF Dx para la detección de TB [32]. Sin embargo, tienen reducida sensibilidad en ciertas poblaciones, como niños y pacientes VIH [33], una desventaja adicional es la alta tasa de monorresistencia a la INH en muchos entornos los cuales no son detectados por la metodología. Además, la plataforma y cartuchos son costosos y requieren instalaciones de laboratorio con acceso continuo a la energía eléctrica.

Otro método molecular in vitro avalado por la OMS y que ofrece resultados en menos de 6 horas es el ensayo de sonda lineal Genotype MTBDR plus y Genotype MTBDR sl (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Alemania) ambos utilizan una técnica de PCR e hibridación reversa para identificar MTB y simultáneamente su patrón de farmacorresistencia. El Genotype MTBDR plus permite detectar MTB y mutaciones en los genes *rpoB* de la RIF y en el gen *katG* de la INH, además puede detectar la presencia de genes promotores de *inhA* que confieren resistencia a dosis bajas de INH [35]. El ensayo Genotype MTBDR sl 2.0 puede detectar mutaciones que confieren resistencia a las fluoroquinolonas (*gyrA* y *gyrB*) y fármacos inyectables de segunda línea como la kanamicina, amikacina y capreomicina (*rrs* y *eis*) [36]. Sin embargo, a pesar de ser pruebas rápidas y recomendadas para su uso, presentan limitaciones, el desconocimiento de todas las mutaciones clínicamente relevantes para la determinación correcta de resistencia incluido el requerimiento de equipos especiales, entrenamiento continuo y un alto costo de los insumos requeridos hacen que no estén al alcance de la mayoría de los laboratorios de los

países con alta incidencia y que tienen la mayor proporción de resistencia a las drogas [12].

Dado lo descrito, es prioritario identificar nuevas técnicas y herramientas para facilitar el diagnóstico de la TB y controlar su propagación.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACION

II.1. Planteamiento

La TB es considerada la segunda enfermedad infectocontagiosa que más muertes causa en el mundo. El diagnóstico microbiológico temprano y la pronta detección de la resistencia a los fármacos utilizando la baciloscopia, el cultivo y las pruebas de susceptibilidad a los fármacos deberían ser las herramientas claves para detener la carga global; sin embargo, las pruebas microbiológicas actuales presentan deficiencias como la baja sensibilidad de la baciloscopia y la lentitud en la obtención de los resultados de los cultivos y de las pruebas de sensibilidad. Sumado a ello la falta de recursos en los países donde se concentra la mayor cantidad de casos y la eficiencia del operador en los procesos microbiológicos, todo ello, acentúa aún más la problemática diagnóstica. En los últimos años, se están evaluando nuevas herramientas diagnósticas que deberían tener mejores sensibilidades, ser rápidas, económicas y de fácil uso. Dichas técnicas deberían facilitar el diagnóstico de la TB y evitar su propagación sin necesidad de equipos costosos ni complejos procedimientos.

Dada las limitaciones ya descritas relacionadas a los métodos de diagnóstico microbiológico para el control de la TB, en esta investigación doctoral se ha planteado tres temas de investigación (figura 8):

- (1) En el artículo 1 se describe la evaluación de dos variantes microbiológicas de la baciloscopía con la finalidad de aumentar la sensibilidad para la detección de casos de TB en muestras de esputo coloreadas con ZN y AF comparada con la baciloscopia directa tanto para la detección microscópica como del análisis de imágenes digitales. Las dos variantes microbiológicas consistieron en

descontaminar las muestras, luego fueron concentradas (pellet) y diluidas (pellet diluido) con la finalidad de concentrar las micobacterias y diluir los detritus. Asimismo, se evaluaron dos sistemas de concentración de muestras de esputo mediante dos métodos de filtración a presión positiva y negativa para optimizar el diagnóstico microscópico y por imágenes de la TB.

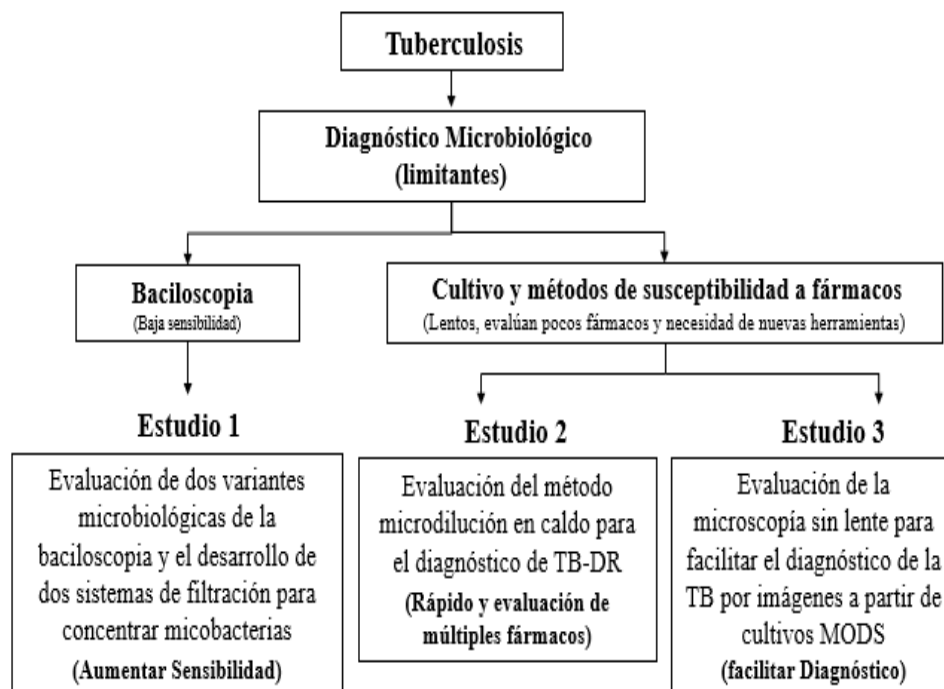


Figura 8. Diagrama de flujo de los tres estudios planteados en la tesis doctoral

- (2) En el artículo 2 se describe el uso del método de susceptibilidad de microdilución en caldo usando la placa UKMYC6 (desarrollada como parte del proyecto global CRyPTIC) en un conjunto representativo a nivel nacional de aislados resistentes de MTB en el Perú. Este método permite determinar en una sola plataforma la distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en forma simultánea a 13 fármacos anti TB incluyendo fármacos nuevos y otros repropuestos de

segunda línea propuestos recientemente por la OMS. Asimismo, permitió evaluar el perfil integral de resistencia en comparación con el método de las proporciones en agar 7H10.

- (3) En el artículo 3 próximo a publicar, se describe por primera vez el uso de la microscopía sin lentes Cytonote para detectar TB y TB-MDR en los cultivos MODS. El estudio evalúa la utilidad del sistema de la microscopía sin lentes para generar imágenes y estudiar la morfología de las colonias de MTB tipo cordón de los cultivos MODS, así como evaluar las imágenes obtenidas por Cytonote en un monitor de computadora con el objetivo de diagnosticar como positivo o negativo los cultivos MODS obtenidos de cepas (cultivos puros) y muestras de esputo.

II.2. Justificación

En la actualidad, los progresos para el control de la TB se ven afectados considerablemente por un diagnóstico no efectivo de los casos y por la propagación extendida de cepas resistentes a los fármacos que impide tratar a la persona afectada oportunamente lo cual conlleva a la progresión de la enfermedad, al contagio a otras personas y a la transmisión del bacilo resistente en la población.

El diagnóstico actual de la TB en la mayoría de países con alta incidencia, se basa principalmente en la microbiología, utilizando métodos convencionales como: 1) La baciloscopia usando la coloración Ziehl Neelsen, herramienta base, de uso universal dado su bajo costo y simplicidad que permite la detección microscópica de la bacteria, brindando una primera orientación sobre la presencia de la enfermedad activa. 2) El cultivo utilizando medios sólidos, es la prueba Gold estándar que permite obtener el aislado clínico para posteriormente ser usados para

realizar pruebas de susceptibilidad a los fármacos. En estas condiciones, estos métodos convencionales han demostrado ser imperfectos para el control eficaz de la enfermedad dado a que la baciloscopia es poco sensible y el cultivo junto con las pruebas para evaluar resistencia a los fármacos son inefectivos debido a la espera prolongada para conocer los resultados.

Dado este panorama, a lo largo de los años se ha trabajado en el desarrollo de nuevas alternativas microbiológicas para mejorar la detección del bacilo de la TB en las muestras de esputo, así como herramientas eficaces que permitan en forma oportuna conocer el patrón de farmacorresistencia para un tratamiento correcto y evitar la transmisión.

En ese sentido, con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la baciloscopia e intentar automatizarla, en el artículo 1 del presente trabajo, se trata de evaluar dos modificaciones de la baciloscopia convencional. El primero de ellos, es la evaluación de dos variantes microbiológicas que permitan optimizar el diagnóstico microscópico y por imágenes de la TB a través de la concentración y dilución del concentrado de las muestras que permita captar las micobacterias y reducir el detritus, definido como el material sólido del esputo que pueda perturbar el reconocimiento de los bacilos en las láminas e imágenes. Los reportes publicados, señalan que el añadido de pasos previos a la baciloscopia que incluyen la centrifugación y el tratamiento del esputo con productos químicos alcalinos como el NaOH y la lejía para licuar, aclarar y concentrar las muestras de esputo revelan una mejor detección de bacilos. Sin embargo, estos estudios comparan los diversos métodos alternativos a un nivel categórico y son poco precisos para evaluar el efecto de la carga de bacilos. No consideran, además, el nivel de detritus que podría influir

en la interpretación de los resultados y en la calidad de las imágenes para el desarrollo de algoritmos de reconocimiento bacilar que permitan la automatización futura de las lecturas. La segunda variante, presenta el desarrollo y evaluación de dos prototipos alternativos de concentración automática por filtración de muestras de esputo usando presión negativa y positiva para concentrar y detectar cantidades mínimas de micobacterias. En evaluaciones previas, se han desarrollado métodos alternativos de concentración utilizando filtros que reportan aumentar la sensibilidad. Evaluaciones posteriores utilizando presión negativa utilizando diversos sistemas de recolección mostraron aumento significativo de la sensibilidad frente al método directo. Nuestro trabajo evaluó en paralelo dos equipos prototipos bajo las mismas condiciones de volumen de muestra, tiempo y volumen filtrado independiente de otras variantes dado su potencial uso como métodos alternativo no complejo para entornos de bajos recursos y con alta carga de TB.

Otro aspecto muy importante, es el aumento considerable de casos de TB-DR a nivel mundial, para ello, se requiere de información oportuna del patrón de resistencia frente a los fármacos para tratamiento mejorados e individualizados y así mejorar la tasa de éxito. Los métodos convencionales son lentos, laboriosos, poco estandarizados y evalúan solo un limitado número de fármacos. En el tiempo, se han desarrollado diversos ensayos fenotípicos y moleculares mediante el uso de plataformas automatizadas comerciales que brindan rápidos resultados; sin embargo, son de uso reducido dado su alto costo y no fácil aplicación en entornos de pocos recursos. Además, los métodos moleculares no se adaptan en todos los entornos dada la variabilidad de mutaciones existentes y no detectan todas las mutaciones que confieren resistencia.

Bajo este panorama, en el artículo 2 se describe la evaluación de una novedosa herramienta rápida recientemente validada que permite determinar en una sola plataforma y en simultáneo la CMI de 13 fármacos anti-TB de primera y segunda línea en un grupo representativo de cepas resistentes del Perú utilizando la placa de microtitulación en caldo UKMYC6. Esta es una placa de 96 pocillos que permite evaluar una gran variedad de fármacos a diferentes concentraciones de un solo aislado clínico con control de calidad sin la necesidad de preparar soluciones de fármacos y así limitar errores y variabilidad entre laboratorios. La presentación liofilizada de los fármacos facilita su transporte y almacenaje. En ese sentido, la placa UKMYC6 es una variante de la placa comercial Sensititre MYCOTB (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU) cuya performance en diversos estudios ha brindado buenos resultados, sin embargo el Consorcio CRyPTIC (Predicción Integral de la Resistencia a la Tuberculosis: un Consorcio Internacional) dentro de sus objetivos de identificar nuevos genes asociados a la resistencia, diseñó y validó la placa UKMYC5 que logró la incorporación de fármacos nuevos como la bedaquilina y delamanid y repropuestos como clofazimina y linezolid. Durante su evaluación se eliminó el fármaco ácido β -para-aminosalicílico y se optimizó el rango de concentración de los fármacos restantes dando lugar a la placa UKMYC6 que brinda valores de CMI cuantitativos y por lo tanto una comprensión de mayor resolución de la resistencia a los fármacos, lo cual facilitaría un tratamiento mejorado e individualizado para cada paciente. Nuestro trabajo describe el perfil integral de resistencia a partir de la CMI de una muestra epidemiológicamente representativa a nivel nacional de cepas de MTB resistentes en el Perú. Adicionalmente revela un análisis comparativo de esta metodología con el método

de las proporciones en agar 7H10. Esta herramienta se plantea como una buena alternativa microbiológica para un tratamiento individualizado y optimizado dado que brinda información cuantitativa sobre el grado de resistencia permitiendo la elección y dosis de los fármacos que son necesarios para el tratamiento del paciente afectado de TB.

La detección de la TB-MDR, es fundamental para reducir la propagación de este tipo de resistencia en la población, frente a ellos diversas herramientas especialmente comerciales se han diseñado sin embargo a sobresalido el uso del método MODS o ensayo de susceptibilidad a fármacos por observación microscópica, que ha probado ser una herramienta no comercial, robusta, sensible, específica y de amplio uso para el diagnóstico simultáneo de la TB y la TB-MDR a partir de una muestra de esputo. La observación de las colonias características en el medio de cultivo líquido utilizando un microscopio invertido es la base del diagnóstico microbiológico. A pesar de las ventajas y de su reconocido uso hay retos que deben afrontarse para expandir su aplicación. MODS requiere de un microscopio invertido, que suele ser costoso y de personal capacitado y dedicado al reconocimiento característico de MTB en el medio líquido. Dado ello, el tercer trabajo describe la evaluación de la plataforma de microscopía sin lente Cytonote que captura imágenes en tiempo real en un gran campo de visión de 29,4 mm² sin la necesidad de ajustar manualmente el enfoque o brillo como alternativa al uso del microscopio invertido convencional para el reconocimiento de los cordones característicos de los cultivos MODS y su desempeño en el diagnóstico de la TB a partir de la captura de imágenes digitales en cepas (cultivos puros) y muestras de

esputo. Esta plataforma contribuirá a los esfuerzos para facilitar el uso de MODS y alcanzar un diagnóstico rápido de la TB en poblaciones de alta incidencia.

II.3. Pregunta de investigación

¿Los métodos de diagnóstico propuestos en este estudio: Variantes de la baciloscopía, microdilución en caldo usando la placa UKMYC6 y la microscopía sin lentes (Cytonote), facilitan el diagnóstico de la TB y la TB-DR?

III. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

Objetivo General

Evaluar nuevas técnicas y herramientas para facilitar el diagnóstico de TB.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el uso de dos variantes microbiológicas y de dos métodos de concentración por filtración de micobacterias para mejorar el diagnóstico microscópico y por imágenes de la TB en comparación con la baciloscopia directa. (Estudio 1 – Anexo 1).
2. Evaluar el desempeño y el perfil integral de resistencia del método de microdilución en caldo utilizando la placa UKMYC6 para determinar la CMI y mejorar el estudio de susceptibilidad a fármacos en cepas resistentes de MTB del Perú en comparación con el método de las proporciones en agar 7H10 (Estudio 2 - Anexo 2).
3. Evaluar el uso de la Microscopia sin lentes Cytonote para el reconocimiento a partir de imágenes digitales de los cordones característicos de los cultivos MODS y facilitar el diagnostico microscópico para el diagnóstico de TB tanto en cepas y muestras de esputo en comparación de la microscopia invertida convencional. (Estudio 3 – Anexo 3).

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Metodología - Artículo 1

Evaluación de variantes microbiológicas del procesamiento del esputo y de la concentración de micobacterias para optimizar el diagnóstico microscópico y por imagen de la tuberculosis

En este estudio se analizaron en total 214 muestras de esputo de pacientes con tuberculosis activa cuya distribución se muestra en la Figura 9.

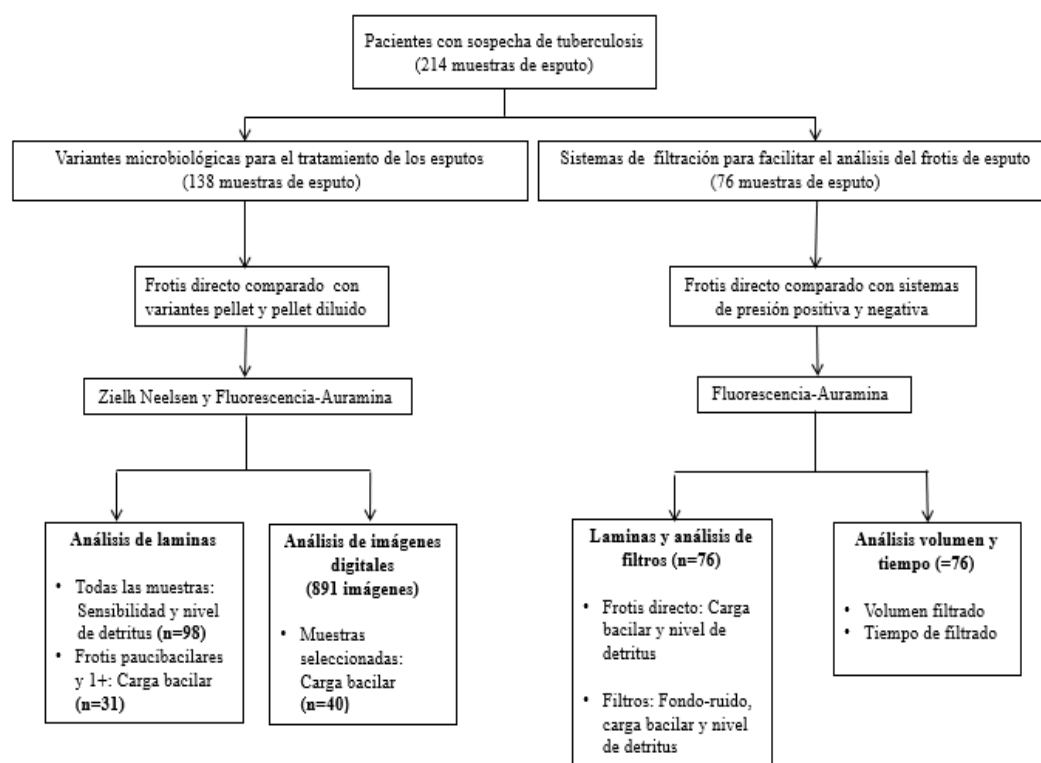


Figura 9. Diagrama de flujo de los procedimientos para evaluar las variantes microbiológicas y los sistemas de filtración de las muestras de esputo

Modificado de: Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

En la primera parte del estudio estimamos y comparamos la sensibilidad y el nivel de detritus presentes en el frotis de las dos variantes microbiológicas de

procesamiento del esputo frente al frotis directo, utilizando la tinción ZN y AF en 98 muestras. Las variantes microbiológicas incluyeron la descontaminación de las muestras mediante el método estándar de NaOH-Citrato de sodio-N-acetil-L-cisteína (NALC). En la variante pellet, el sedimento fue resuspendido en 0,5 mL del tampón fosfato; mientras que en la variante pellet-diluido, el sedimento fue resuspendido en 2 mL de medio de cultivo 7H9-OADC-PANTA. El volumen restante se utilizó para la detección de MTB mediante el ensayo de susceptibilidad a fármacos por observación microscópica (MODS). Las imágenes digitales de los frotis (4-5 imágenes por portaobjetos) fueron capturados en 40 muestras, utilizando una cámara digital Mini VID USB 5Mp (LW Scientific) acoplada al ocular de un microscopio Primo star Carl Zeiss.

El nivel de detritus observado fue categorizado como escaso, medio y abundante (Figura 10).

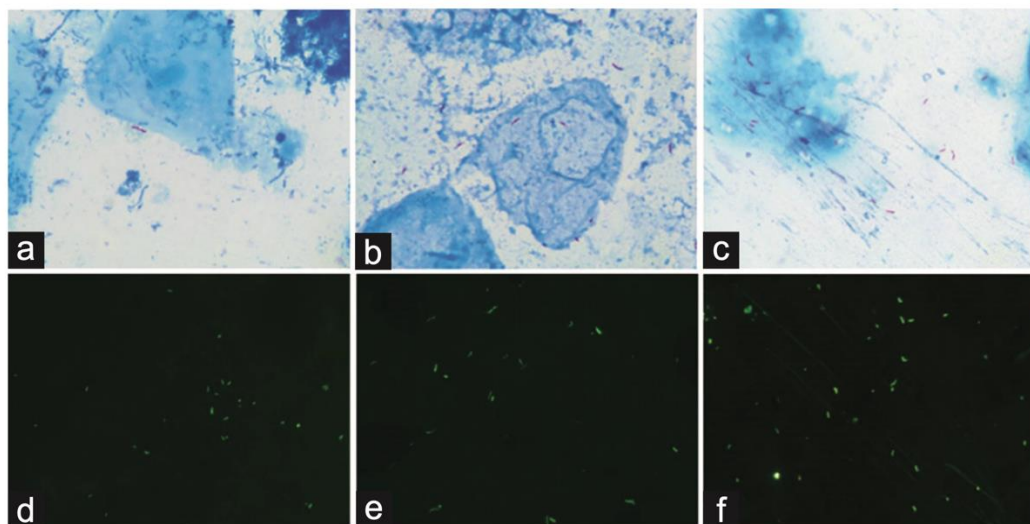


Figura 10. Imágenes microscópicas representativas de los detritus según el proceso de variante microbiológica. ZN: Frotis directo (medio) (a), pellet (medio) (b) y pellet diluido (escaso) (c). AF: Frotis directo (escaso) (d), pellet (escaso) (e) y pellet diluido (escaso) (f).

pellet diluido (escaso) (f). Las imágenes se tomaron con un aumento de 1000x para ZN y 400x para AF. Tomado de: Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

La carga bacilar en los frotis se estimó como el número total de bacilos en muestras previamente categorizadas como paucibacilar y 1+. En ZN, la lectura se realizó en 100 campos microscópicos a 1000x de aumento total y en AF, en 40 campos microscópicos a 400x de aumento total. Cada imagen fue examinada manualmente por el mismo técnico y se contó el número total de bacilos.

La carga de bacilos se midió por observación microscópica y el análisis de las imágenes digitales en 31 y 40 muestras respectivamente.

En la segunda parte del estudio evaluamos dos prototipos de filtración por presión positiva (Figura 11) y negativa (Figura 12) de esputo para mejorar el cribado microscópico para la concentración de bacilos, en 76 muestras. Las comparaciones entre la filtración de esputo y el frotis directo estándar, incluyeron la carga de bacilos, el nivel de detritus observado, el volumen filtrado, el tiempo de filtración y el nivel de fondo.

Las muestras esputo fueron tratadas con NALC y lejía al 7% antes de ser filtradas para disolver el esputo y prefiltradas. La membrana conteniendo la muestra de esputo filtrada fue teñida con AF y observada en el microscopio fluorescente (Primo star Carl Zeiss con un aumento total de 400x). Se registró el número total de bacilos encontrados y los detritus observados en 40 campos microscópicos (clasificados como escasos, regulares y altos). Ambos sistemas se evaluaron en paralelo y simultáneamente. Se registró el volumen de filtrado en mL (aproximadamente 15 mL por sistema) y el tiempo de filtrado en segundos para

cada proceso (tiempo máximo por sistema 600 s).

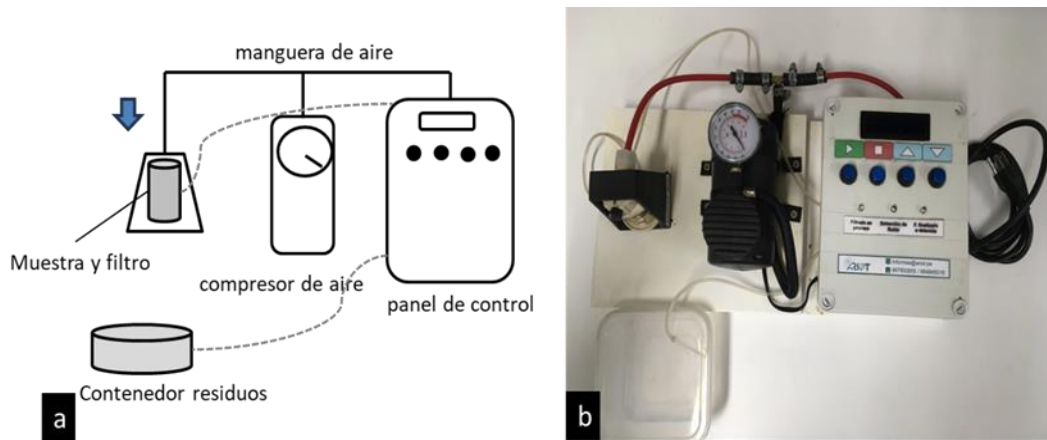


Figura 11. Sistema de filtración por presión positiva para la concentración de micobacterias. Modificado de: Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

Nota: (a) Esquema del sistema (b) fotografía del sistema completo.

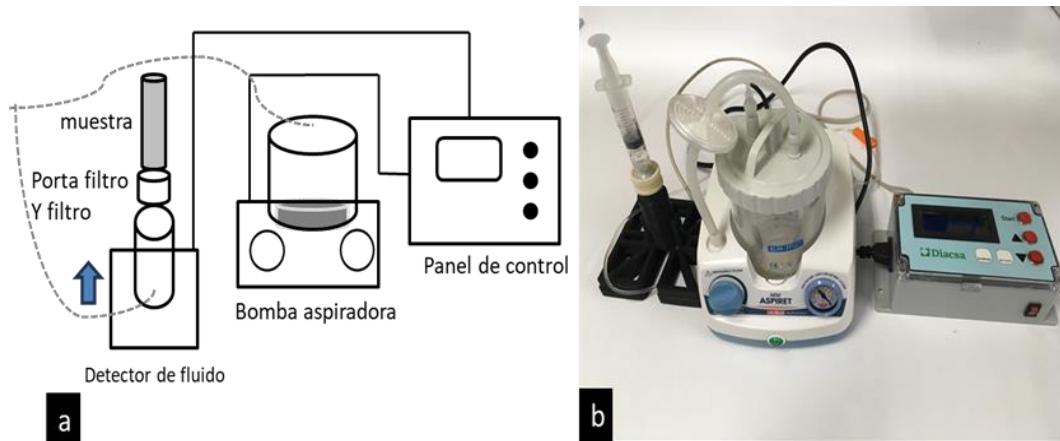


Figura 12. Sistema de filtración por presión negativa para la concentración de micobacterias. Modificado de: Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

Nota: (a) Esquema del sistema (b) fotografía del sistema completo.

Análisis estadístico

La comparación cuantitativa entre subgrupos se realizó según las pruebas de normalidad. Las muestras dependientes se analizaron con las pruebas de Friedman-Wilcoxon; las muestras independientes con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas post hoc de Dunn. Para las variables categóricas, se aplicaron las pruebas de Chi-cuadrado y exacta de Fisher.

IV.2. Metodología - Artículo 2

Evaluación de la metodología de microdilución de caldo en placas para pruebas de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* en el Perú.

La susceptibilidad antimicrobiana fue determinada en 496 cepas de MTB resistentes a los fármacos epidemiológicamente representativas de todo el Perú del periodo 2015-2018 utilizando el método estándar de las proporciones en agar 7H10 en placas divididas en cuatro cuadrantes que contenían: rifampicina, isoniazida, etambutol, etionamida, kanamicina y levofloxacina (Tabla 1). Brevemente, las cepas se subcultivaron en caldo Middlebrook 7H9 y se incubaron durante 7 días a 37°C. Posteriormente, los cultivos se estandarizaron a una escala de turbidez McFarland 0,5 y se diluyeron a 10⁻². Luego se inocularon 100 µL de esta suspensión a cada uno de los cuadrantes de las placas Petri que contenían fármacos, así como al cuadrante de control sin fármacos. Las placas se sellaron en bolsas de plástico y se incubaron a 37°C durante 21 días. Los cultivos se clasificaron como resistentes cuando el número de colonias desarrolladas en el cuadrante con fármaco era superior al 1% del número de colonias observadas en el cuadrante de control; en caso contrario, se clasificaron como susceptibles.

Tabla 1. Valores de las concentraciones de los fármacos utilizados para la comparación entre la metodología APM y BMD UKMYC6.

Fármaco	APM CC (mg/L)	UKMYC6 ECOFF/ECV (mg/L)	UKMYC6 Limite (mg/L)	Rangos de concentración UKMYC6 (mg/L)
Fármacos utilizados en regímenes de tuberculosis sensible a los medicamentos				
Rifampicina	1.0	0.5	–	0.063-8
Rifabutina	–	0.12	–	0.06-2
Isoniazida	0.2	0.1	0.2 - 0.4	0.025-12.8
Fármacos utilizados en regímenes de TB-MDR ^a				
Grupo A				
Moxifloxacina	–	1.0	–	0.06–4
Levofloxacina	1.5	1.0	–	0.125–8
Bedaquilina	–	0.25	–	0.008–1
Linezolid	–	1.0	–	0.06–4
Grupo B				
Clofazimina	–	0.25	–	0.03–2
Grupo C				
Etambutol	5.0	4.0	4.0	0.25–32
Delamanid	–	0.12	–	0.008–0.5
Amikacina	–	1.0	–	0.25–16
Etionamida	5.0	4.0	4.0	0.25–8
Adicional				
Kanamicina	5.0	4.0	–	1–16

Notas: ^a Los grupos A, B y C se establecieron según la actualización de la OMS de 2018 [10]. Modificado de Puyen et al., (2022). Ver anexo 2.

Abreviaturas: APM: Método de las proporciones en agar 7H10, BMD: Método de microdilución en caldo, UKMYC6: nombre de placa usada en el método BMD, CC: Concentración crítica, UKMYC6 ECOFF/ECV: Valor de corte epidemiológico propuesto por estudio CRyPTIC para la placa UKMYC6, UKMYC6 Limite:

Categoría propuesta por CRYPTIC para los fármacos con abundantes variantes genéticas que producen efectos variantes en las CMI [11].

Posteriormente, se realizó la prueba de susceptibilidad a los fármacos utilizando la placa de microdilución de 96 pocillos UKMYC6, diseñado por el proyecto CRyPTIC que permitió determinar la susceptibilidad frente a 13 fármacos antituberculosos compuestos por agentes utilizados en el tratamiento de la TB como rifampicina, rifabutina, isoniazida, levofloxacin, moxifloxacin, bedaquilina, linezolid, clofazimina, etambutol, delamanid, amikacina, etionamida y kanamicina (Tabla 1). Para este ensayo, las cepas previamente criopreservadas se reactivaron en medio líquido 7H9 suplementado durante 7 días a 37°C. Luego, se subcultivaron en medio Middlebrook 7H10 durante 25 a 30 días a 37°C. Posteriormente, se prepararon suspensiones a escala de 0,5 McFarland en solución salina Tween con perlas de vidrio. A continuación, se diluyeron 100µL de la suspensión en un tubo con caldo 7H9 suplementado con OADC para obtener un inóculo aproximado de 1×10^5 UFC/mL. Posteriormente, utilizando el equipo automatizado Sensititre Autoinoculator®/AIM® se dispensaron 100µL de inóculo en cada pocillo de la placa UKMYC6. Las placas se sellaron con plástico transparente y se incubaron aeróbicamente a 35-37°C. Las placas se leyeron con el instrumento semiautomatizado Vizion™ que capturó y almacenó una imagen de las CMIs al día 14 día después de la inoculación y se dio una segunda lectura a los 21 días si el crecimiento del control positivo de la placa era débil o insuficiente. La CMI de un fármaco se consideró como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento visible de MTB en un pozo determinado y las cepas se categorizaron

como susceptibles, intermedias o resistentes (categorización ternaria) tomando como referencia los Valores de Corte Epidemiológicos (EOFF/ECV), así como las concentraciones límite (concentraciones a las que las mutaciones genéticas presentan efectos diferentes dando lugar a categorías mixtas de susceptibilidad o resistencia). Se determinó que un resultado era susceptible si la CMI era inferior o igual al ECOFF/ECV establecido; en caso contrario, se definió como resistente. La isoniazida, el etambutol y la etionamida se clasificaron teniendo en cuenta las concentraciones límite.

Los resultados genómicos sólo se utilizaron para resolver los resultados discordantes entre las pruebas APM y BMD. El ADN genómico se aisló utilizando el método del fenol-cloroformo. Las bibliotecas de la secuenciación se generaron utilizando el Nextera XT Library Preparation Kit. El secuenciamiento se realizó en la Universidad de Oxford (Reino Unido) utilizando la plataforma Illumina HiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

Análisis bioinformático

La calidad de las lecturas del secuenciamiento se evaluó con el programa FastQC v0.11.9. Las lecturas emparejadas se filtraron con el programa Trimmomatic v0.38. Las lecturas filtradas se compararon con el genoma de referencia H37Rv (NC_000962.3). Se evaluaron los genes asociados a la resistencia genotípica a la rifampicina (*rpoB*), isoniazida (*inhA*, *katG*, *ahpC*, *fabG1*, *kasA*), fluoroquinolonas (*gyrA*, *gyrB*) y los inyectables de segunda línea (*rrs*, *eis*, *tlyA*). Las variantes genéticas encontradas se validaron utilizando la lista de mutaciones publicada por la OMS en el "Catálogo de mutaciones en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su asociación con la resistencia a los

medicamentos". Asimismo, los perfiles de resistencia se determinaron utilizando los programas TBProfiler v3.0.4 8 (base de datos de mutaciones v. A2a234b) y Mykrobe v0.10. Para cada fármaco, las cepas se clasificaron como susceptibles o resistentes según la ausencia o presencia de mutaciones detectadas en los genes asociados a la resistencia, respectivamente.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos de las CMI's obtenidas y de los tiempos de desarrollo en las placas UKMYC6. Para los seis fármacos evaluados tanto por el método APM como por el método BMD y se determinaron los índices de rendimiento diagnóstico (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, acuerdo categórico y coeficiente Kappa de Cohen). Para determinar la fuerza de la concordancia estadística se utilizó el valor kappa (k), que se calificó como insignificante ($0 \leq k \leq 0,2$), medio ($0,2 < k \leq 0,4$), moderado ($0,4 < k \leq 0,6$), bueno ($0,6 < k \leq 0,8$) o casi perfecto ($0,8 < k \leq 1$).

IV.3. Metodología - Artículo 3

Evaluación de la microscopía sin lente para la interpretación de los cultivos MODS y el facilitamiento del diagnóstico de la tuberculosis

En este estudio se colectaron 62 muestras de esputo con baciloscopia negativa (N=20) y positiva (N=42) a partir de sobrantes de los procesos de cultivo rutinarios y 38 cepas (cultivos puros) de MTB de forma anonimizada.

El cultivo MODS de las muestras de esputo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Caviedes et al., (2000). Las cepas de MTB (cultivos puros) fueron

ajustadas a una solución de la escala 1 de MacFarland (3×10^8 ufc/mL); 5 μ L de la suspensión bacteriana fue mezclada con 5 mL del medio líquido 7H9-OADC. Cada suspensión de muestra o cepa, se distribuyó en 4 pocillos de una placa de 24 pocillos con y sin agentes antimicrobianos (isoniacida y rifampicina) e incubadas a 37°C. Las placas fueron examinadas los días 7, 8 y 9 de cultivo utilizando un microscopio invertido para la búsqueda de los cordones característicos de MTB en el medio de cultivo líquido.

Sistema de imágenes sin lente Cytonote

El microscopio invertido de video sin lentes evaluado fue el modelo portátil Cytonote 1W (12x11x10 cm) de un pocillo, diseñado para evaluar el crecimiento de células a través de la captura de imágenes en tiempo real en un gran campo de visión de 29,4 mm² sin la necesidad de ajustar manualmente el enfoque o brillo. Este sistema, emite un haz compuesto por diferentes intensidades de luz sobre la muestra, a través de un agujero de 150 μ m unido a un LED multichip. Cuando el haz incide sobre la muestra, forma un patrón de difracción que es captado por un sensor CMOS de 10 megapíxeles. Posteriormente, el patrón de difracción (holograma) se reconstruye en una imagen ampliada interpretable por el ser humano mediante un algoritmo holográfico implementado en el software Horus v. 5.2.2.0 (Iprasense, Francia), similar a lo observado en un microscopio invertido óptico y captado en un monitor de computadora (Figura 13-A).

Configuración y procedimiento general de adquisición de imágenes

Horus fue configurado para seleccionar automáticamente un valor de enfoque dentro de un rango específico y reconstruir el patrón de difracción en una suspensión celular. Asimismo, se calibraron las intensidades de luz y los tiempos

de adquisición de las imágenes de la placa MODS cubriendo el sistema con una caja cobertora. La adquisición de imágenes tras la calibración también se llevó a cabo colocando el pocillo correspondiente sobre el sensor y cubriendo el sistema.

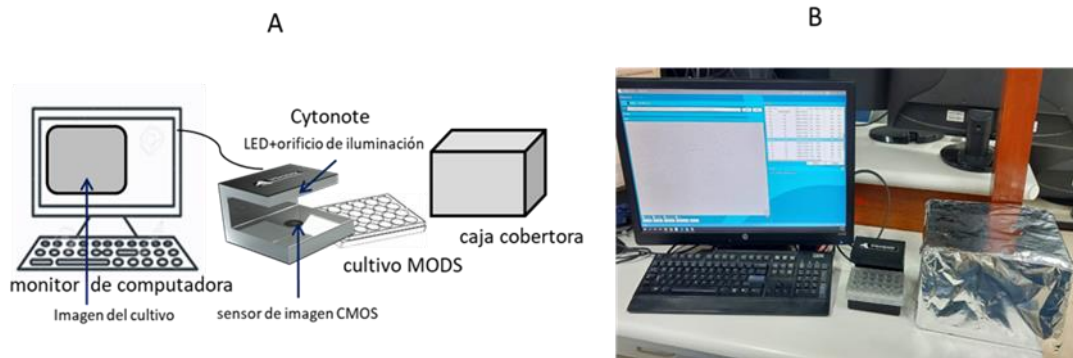


Figura 13. Configuración del Sistema Cytonote para la Adquisición de Imágenes de MTB de los Cultivos MODS. Tomado de: anexo 3.

Notas: (A) Diagrama esquemático de la Configuración (B) Fotografía de la Configuración.

Las imágenes reconstruidas por Horus usando el autoenfoco fueron comparadas con los resultados del MODS obtenidos en forma convencional. El enfoque manual fue usado en aquellas muestras en donde la reconstrucción de la forma de las micobacterias no fue posible con el autoenfoco. El enfoque manual permitió incrementar el enfoque de 0 a 4000 en pasos de 50 en forma automatizada (Python interno), por lo que se generó un conjunto de 200 fotos. Luego de la revisión de las 200 fotos, se seleccionaron aquellas con mejor enfoque.

Evaluación

La aplicabilidad de la microscopia sin lentes Cytonote utilizada en el diagnóstico de TB fue evaluado en tres fases:

Fase 1: Optimización de los parámetros de Horus para la captura de imágenes MODS. La optimización se realizó evaluando dos parámetros: Filtrado de ruido de fondo y el rango de autoenfoco. En la filtración del ruido de fondo se evaluaron 3 opciones (la media, la mediana y un algoritmo de tercer orden) manteniendo el rango de autoenfoco usando 240 imágenes de cordones de MTB proveniente de cinco cultivos de cepas aisladas y cinco muestras de esputo. La optimización del enfoque se realizó con 63 de las 240 imágenes óptimas digitalizadas con diagnóstico positivo de TB de acuerdo con la evaluación por microscopía invertida. Se recuperaron sus valores de enfoque manual o automático y las muestras se agruparon según el tipo de cultivo. Se compararon el tipo de distribución y los valores medios de cada grupo mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov y la prueba T-Student independiente (varianzas iguales, comprobadas mediante la prueba de Levene).

Fase 2: Evaluación de las características morfológicas de los cordones MODS en las imágenes generadas por el microscopio Cytonote. Seis cultivos puros de pacientes con TB-MDR y 15 muestras de esputo con baciloscopia positiva de 1+ y 2+ fueron evaluados. Las imágenes fueron revisadas desde el día 7 hasta el día 9 de incubación, se determinó el diagnóstico de positivo o negativo utilizando un microscopio invertido convencional. Luego, se procedió a la captura y análisis de imágenes con Cytonote. Para la evaluación de los cordones en cada imagen, se consideraron tres aspectos: El primero fue determinar si las características morfológicas que presentan los cordones de MTB en el medio de cultivo líquido, cuando se observan bajo un microscopio invertido, son similares en las imágenes a las generadas en el microscopio Cytonote. El segundo fue detectar en las imágenes

si los cordones presentan alguna característica especial. El tercero fue reconocer en las imágenes la presencia de detritus y/o células, que son artefactos propios de una muestra de esputo procesada con MODS y que puede dificultar la detección temprana de los cordones si se encuentra en alta cantidad durante el diagnóstico convencional.

Fase 3: Evaluación de las imágenes generadas por el microscopio Cytonote para el diagnóstico de TB. El microscopio Cytonote, se configuró de acuerdo con los parámetros obtenidos en la Fase 1. Las muestras de esputo y cepas de TB se procesaron con MODS e incubaron a 37°C. Tras siete días de incubación y durante dos días consecutivos, se determinó el diagnóstico de positivo o negativo de todos los cultivos utilizando un microscopio invertido acoplado a una cámara digital para mantener un registro de cada imagen evaluada. Posteriormente, se procedió a la generación de imágenes ubicando cada pocillo de la placa de MODS sobre el sensor CMOS del microscopio Cytonote (Figura 13-B). Se obtuvieron ocho imágenes digitales diarias por cada muestra o cepa. Cada imagen se clasificó como positiva o negativa. La positividad para TB se estableció si se observaban dos o más cordones característicos en cada imagen.

V. RESULTADOS

V.1. Resultados - Artículo 1

Variantes microbiológicas

La sensibilidad de las variantes microbiológicas en ZN fue de 84.7% (83/98), 91.8% (90/98) y 91.8% (90/98) y en AF, fue de 93.8% (92/98), 95.9% (94/98) y 99.0% (97/98) utilizando los métodos directo, pellet y pellet diluido, respectivamente. Las variantes microbiológicas, en comparación con el frotis directo, aumentan la sensibilidad de la microscopía en un 7,1% y un 2% en ZN y AF respectivamente. Ver tabla 2.

Tabla 2. Lecturas microscópicas de las variantes microbiológicas y procesadas con el ensayo de susceptibilidad a fármacos por Observación Microscópica (MODS) – muestras de esputo con cultivo positivo.

Clasificación	Tinción ZN			Tinción AF		
	Directo	Pellet	Pellet diluido	Directo	Pellet	Pellet diluido
Paucibacilar	16	9	18	16	15	17
+	15	18	13	15	13	15
++	23	23	27	33	27	36
+++	29	40	32	28	39	29
No BAAR	15	8	8	6	4	1
Sensibilidad* (%)	83/98 (84.7)	90/98 (91.8)	90/98 (91.8)	92/98 (93.8)	94/98 (95.9)	97/98 (99.0)
Total	98	98	98	98	98	98

Notas: *El subtotal que comprende los frotis que resultaron paucibacilares, +, ++ y +++ cruces en las lecturas microscópicas. El Método MODS - cultivo positivo es el método de referencia. Modificado de Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

Abreviaturas: ZN: Ziehl Neelsen, AF: Auramina fluorescencia.

El frotis directo en comparación con el pellet diluido, la sensibilidad en AF aumenta en un 5%. Las pruebas estadísticas indicaron que la sensibilidad del frotis con pellet diluido en AF era estadísticamente significativa más alta que la de cada tinción de ZN ($p = 0,0003$, $0,0348$, $0,0348$, respectivamente), aunque similar a la de los métodos de AF directo y AF con pellet ($p = 0,1183$, $p = 0,365$).

En el análisis de la carga bacilar en muestras de frotis paucibacilares y de 1+; en ZN y AF, las cargas bacilares en el pellet diluido y pellet fueron significativamente altas en comparación al frotis directo (Tabla 3).

Tabla 3. Carga de bacilos en las variantes microbiológicas en frotis paucibacilares y 1+

Variantes microbiológicas	<i>n</i>	Directo, mediana (RIQ)	Pellet, mediana (RIQ)	Pellet diluido, mediana (RIQ)	<i>p</i>
Bacilos ZN	49	6 (0.0-40.0) ^a	28 (5.5-100.0) ^b	11 (4.0-99.5) ^b	0.0001
Bacilos AF	44	8.5 (2.0-28.8) ^a	14.0 (2.3-42.5) ^b	14.0 (3.3-62.5) ^b	0.0299

Notas: ^{a, b} representan subgrupos significativamente diferentes según la prueba de rangos con signos de Wilcoxon. Modificado de: Coronel et al., (2019).

Abreviaturas: ZN: Ziehl-Neelsen, AF: Auramina fluorescencia, RIQ: rango intercuartil.

El nivel de detritus en ZN (Figura 14) fue significativamente mayor en el método directo y pellet en comparación al pellet diluido ($p < 0,001$). El 44,9% de las muestras procesadas con el método directo se clasificaron con nivel escaso y

medio de detritus; en el grupo pellet el 51% de las muestras como medio y del grupo pellet diluido el 86,5% como escaso. En el caso de la AF, estas pruebas mostraron diferencias significativas en la distribución de los detritus, teniendo el método de pellet más detritus que el directo y el de pellet diluido ($p < 0,001$).

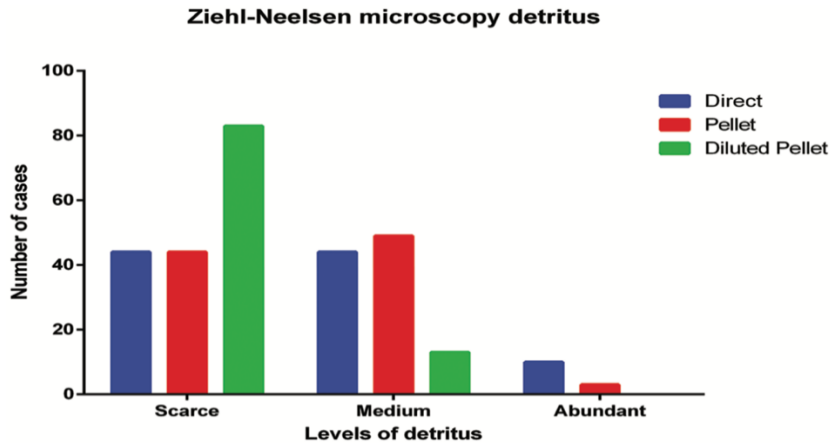


Figura 14. Detritus en microscopía Ziehl-Neelsen observados en todas las variantes microbiológicas. Las columnas representan el número de casos para cada nivel de detritus. Tomado de: Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

Se obtuvieron un total de 891 imágenes de las 40 muestras procesadas, de las cuales 114, 117 y 114 fueron imágenes en ZN mientras que 183, 180 y 183 en AF utilizando los métodos directo, pellet y pellet diluido, respectivamente. En ZN (Figura 15) tanto el pellet como el pellet diluido mostraron mayores recuentos que el método directo ($p < 0,0001$). En AF, el método del pellet tuvo recuentos más altos que el frotis directo y el pellet diluido ($p < 0,0001$).

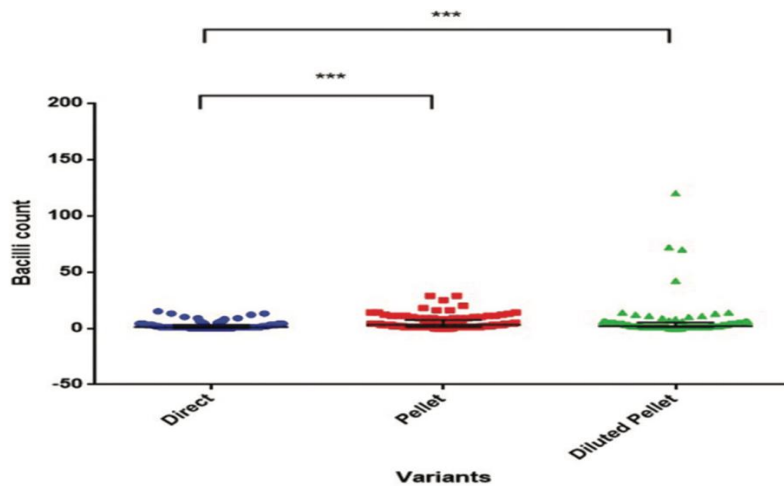


Figura 15. Recuento de bacilos para todas las variantes en imágenes de láminas coloreadas con Ziehl Neelsen. Tomado de: Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

Nota: *** $p < 0,001$.

Sistemas de filtración para el tratamiento de esputo

A pesar de la superioridad aritmética de las muestras filtradas con presión positiva, la carga bacilar fue similar entre el frotis directo de presión positiva (mediana: 105,5, RIQ: 11,25-320) y de presión negativa (mediana: 50, RIQ: 4,3-141,5) ($P = 0,2033$). El nivel de detritus fue significativamente más alto en las presiones positivas ($p < 0,0001$) como negativas ($p < 0,05$) en comparación con el frotis directo. Las presiones positivas y negativas mostraron una distribución similar de detritus ($p > 0,05$). La prueba no paramétrica de Mann-Whitney mostró que la presión positiva dio lugar a volúmenes significativamente mayores ($p < 0,0001$) (mediana: 15 mL, RIQ: 15,0 - 15,0) en comparación con la presión negativa (mediana: 9,5 mL, RIQ: 7,8 - 13,5). La prueba no paramétrica de Mann-Whitney mostró que la presión positiva dio lugar a tiempos de filtración significativamente

más rápidos ($p < 0,0001$) (mediana de 75 s, RIQ 25,75-345,0) en comparación con la presión negativa (mediana de 600,0 s, RIQ 600,0-600,0) (Figura 16).

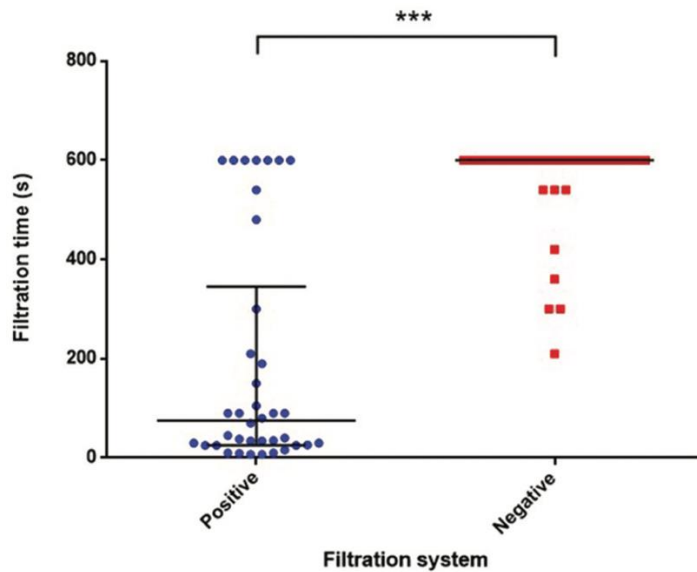


Figura 16. Tiempo de filtración del sistema de presión positiva comparado con el sistema de presión negativa Tomado de: Coronel et al., (2019). Ver anexo 1.

Nota: *** $p < 0,0001$.

V.2. Resultados - Artículo 2

Determinación de la CMI utilizando la placa UKMYC6

Se determinaron las CMIs para 13 fármacos antituberculosos utilizando la placa UKMYC6. Del total de lecturas obtenidas en las placas, el 99% mostraron resultados válidos. De ellos, el 80% (397/496) de las cepas resultaron MICs disponibles a los 14 días y el 20% (99/496) a los 21 días.

El análisis comparativo entre los resultados del APM y las CMIs de las placas UKMYC6 para los 6 fármacos evaluados (rifampicina, isoniazida, etambutol, etionamida, kanamicina y levofloxacin) determinó una buena

concordancia para los fármacos rifampicina, isoniazida, kanamicina y levofloxacin.

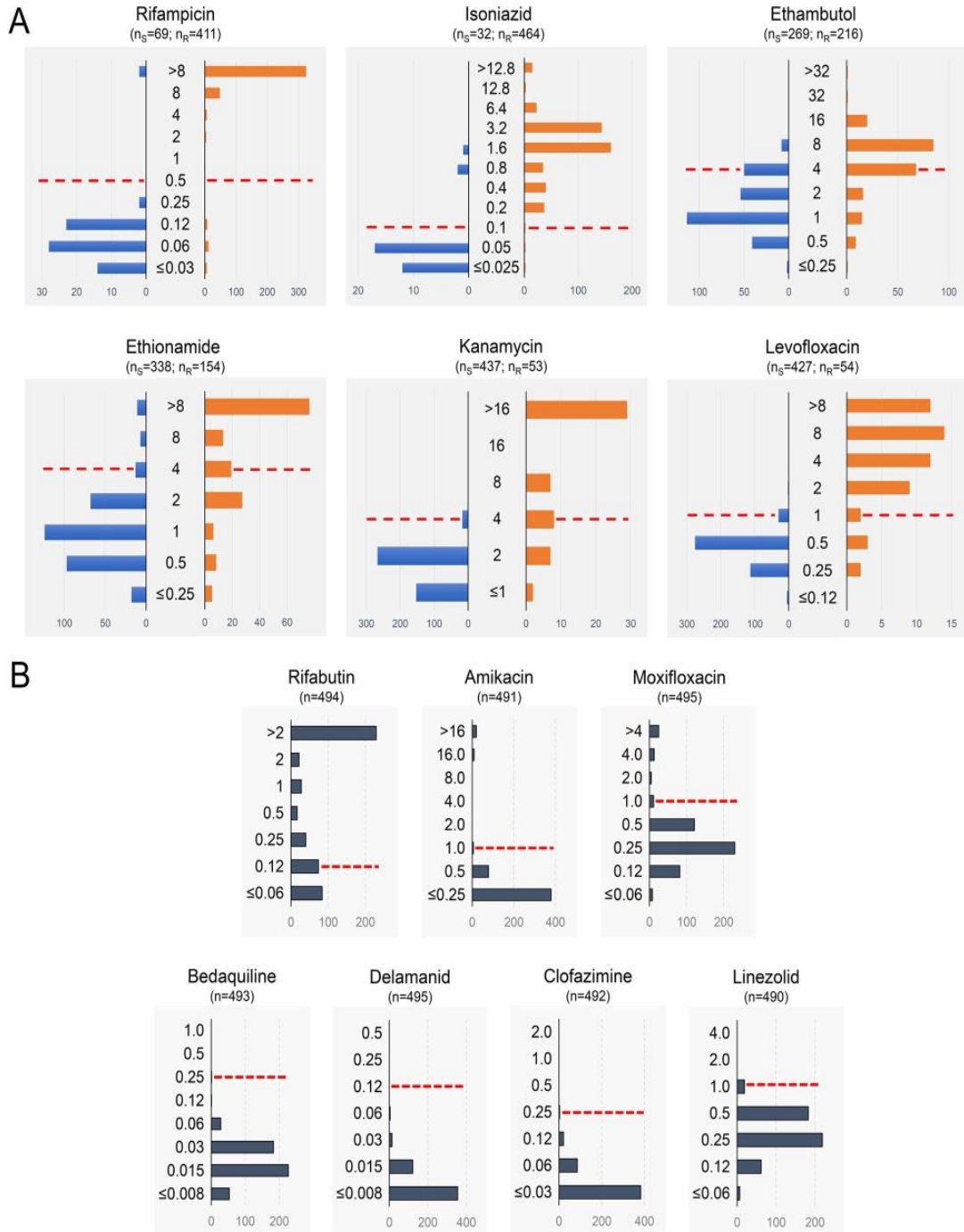


Figura 17. Distribución de las CMIs en comparación con los resultados obtenidos por APM. Tomado de Puyen et al., (2022). Ver anexo 2.

Notas: **A.** Análisis obtenido de la comparación de los resultados de susceptibilidad por APM, categorizados como susceptibles (barras azules) o resistentes (barras naranjas), en comparación con las CMI_s obtenidas en placas UKMYC6. APM fue el método de referencia. **B.** Distribución de las CMI_s de los fármacos analizados únicamente por la metodología de placas BMD. Para ambos análisis, las ECOFF/ECV de las placas UKMYC6 se indican con líneas discontinuas. Las cantidades de cepas susceptibles (n_s) y resistentes (n_R) por APM se especifican para cada fármaco. Para el caso de los fármacos que no fueron evaluados por APM, se especificó el número total de cepas o mediciones (n) realizadas.

Sin embargo, hubo un considerable solapamiento para las cepas definidas como resistentes y susceptibles a etambutol y etionamida por APM (Fig. 17-A). Para el resto de los fármacos (rifabutina, amikacina, moxifloxacina, bedaquilina, delamanid, clofazimina y linezolid) no se disponía de un resultado de susceptibilidad a fármacos de referencia (Fig. 17-B). Ninguna de las cepas presentó CMI_s superiores a los valores de ECOFF/ECV_s para los fármacos nuevos o reutilizados, por lo que se definieron como cepas fenotípicamente susceptibles por la metodología de la placa BMD (Fig. 17-B).

Rendimiento de la metodología de BMD en placas comparada con el APM para la determinación categórica de susceptible/resistente.

El uso de los valores ECOFF/ECV_s en las placas UKMYC6 (excluyendo los resultados con CMI_s límites) para los seis fármacos mencionados anteriormente determinó una concordancia categórica media de 0,93 siendo las más altas para

rifampicina, isoniazida, kanamicina y levofloxacin. Utilizando la categoría APM como referencia, la sensibilidad de la placa de BMD UKMYC6 para la detección de la resistencia a los medicamentos fue la más alta para isoniazida (0,98) y la rifampicina (0,93) y la más baja para etionamida (0,66) y kanamicina (0,68). La especificidad fue alta para todos los fármacos, desde 0,91 para isoniazida hasta 1,0 para kanamicina (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento de la metodología BMD UKMYC6 en comparación con el APM para la determinación de la resistencia a los fármacos

Fármaco	BMD	APM		Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Acuerdo categórico	Kappa de Cohen
		R	S						
Rifampicina	R	383	2	0.93	0.97	0.99	0.71	0.94	0.78
	S	28	67	(0.90, 0.95)	(0.90, 1.00)	(0.98, 1.00)	(0.60, 0.79)		
Isoniazida	R	381	3	0.98	0.91	0.99	0.83	0.98	0.85
	S	6	29	(0.97, 0.99)	(0.75, 0.98)	(0.98, 1.00)	(0.66, 0.93)		
Etambutol	R	107	8	0.72	0.96	0.93	0.84	0.87	0.71
	S	41	211	(0.64, 0.79)	(0.93, 0.98)	(0.87, 0.97)	(0.79, 0.88)		
Etionamida	R	89	18	0.66	0.94	0.83	0.87	0.86	0.64
	S	46	307	(0.57, 0.74)	(0.91, 0.97)	(0.75, 0.90)	(0.83, 0.90)		
Kanamicina	R	36	0	0.68	1.00	1.00	0.96	0.97	0.79
	S	17	437	(0.54, 0.80)	(0.99, 1.00)	(0.90, 1.00)	(0.94, 0.98)		
Levofloxacin	R	47	3	0.87	0.99	0.94	0.98	0.98	0.89
	S	7	424	(0.75, 0.95)	(0.98, 1.00)	(0.83, 0.99)	(0.97, 0.99)		

Notas: Los resultados con MIC limítrofes se excluyeron del análisis. APM es el método de referencia. Modificado de: Puyen et al., (2022). Ver anexo 2.

Abreviaturas: APM: Método de las proporciones en agar 7H10, BMD: Método de microdilución en caldo, R: Número de cepas fenotípicamente resistentes, S:

Número de cepas fenotípicamente susceptibles, VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo, IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

Secuenciamiento del genoma completo utilizado para el análisis de resultados discordantes

Se identificaron 266 resultados discordantes (presentes en 191 cepas diferentes) para los seis fármacos evaluados. El 75% (200/266) fue para etambutol y etionamida. Los análisis posteriores que excluyeron las CMI límite redujeron considerablemente el número de resultados discordantes a 179 (presentes en 122 cepas diferentes). El etambutol y la etionamida presentaron nuevamente los mayores grados de discrepancia, con un 13% (49/367) y un 14% (64/460), respectivamente. Para la mayoría de los agentes, el secuenciamiento apoyo la mitad de los resultados obtenidos por APM (52%, 93/179) y la mitad de los obtenidos por el sistema BMD (48%, 86/179). (Tabla 5).

Tabla 5: Análisis de los resultados discordantes entre el APM y la metodología BMD UKMYC6.

Fármaco	Total	APM	BMD	WGS		Resultados de APM respaldados por WGS (%)	Resultados de BMD respaldados por WGS (%)
				S	R		
Rifampicina	30	S R	R S	1 7	1 21	22 (73)	8 (27)
Isoniazida	9	S R	R S	2 4	1 2	4 (44)	5 (56)
Etambutol	49	S R	R S	0 18	8 23	23 (47)	26 (53)
Etionamida	64	S R	R S	7 24	11 22	29 (45)	35 (55)
Kanamicina	17	S R	R S	0 8	0 9	9 (53)	8 (47)
Levofloxacin	10	S R	R S	1 2	2 5	6 (60)	4 (40)

Notas: Se muestra el resultado genotípico obtenido por WGS. Los resultados con MICs limítrofes se excluyeron del análisis. WGS[#]: utilizado como método de referencia para la resolución de los discordantes. Modificado de: Puyen et al., (2022). Ver anexo 2.

Abreviaturas: APM: Método de las proporciones en agar 7H10, DMO: Método de Microdilución en caldo, WGS: Secuenciación del genoma completo, R: Número de cepas resistentes, S: Número de cepas sensibles.

V.3. Resultados - Artículo 3

Cultivo MODS

Las colonias de TB que crecen en un cultivo MODS atraviesan tres fases de crecimiento fácilmente distinguibles visualmente (Figura 18). En promedio,

durante los primeros 5-6 días emergen pequeñas estructuras en forma de "coma". Entre los días 7 y 9, adquieren la forma de "cordón" y a partir del día 10, las colonias se aglutinan formando "conglomerados". En este estudio se evaluaron las placas durante tres días consecutivos a partir del séptimo día de incubación, ya que se considera el momento óptimo según diversos estudios para obtener un cultivo MODS positivo detectable.

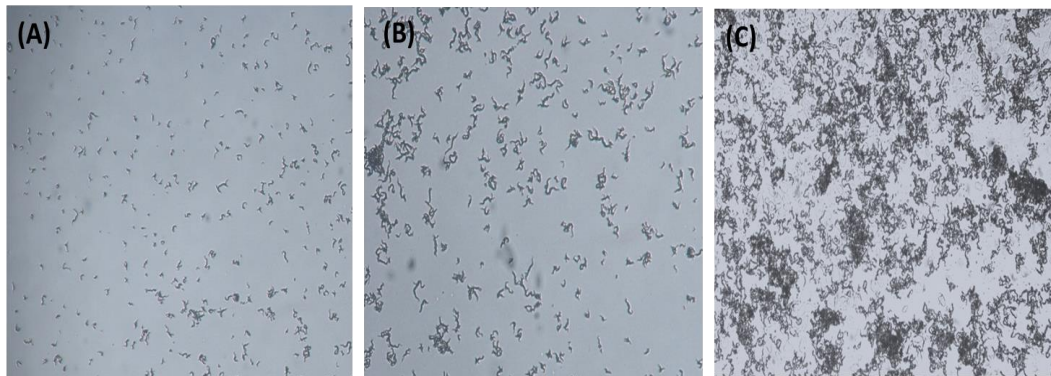


Figura 18: Patrón del crecimiento característico de los cordones de MTB en los cultivos MODS observados a un aumento total de 100X. (A) Día 6 de cultivo; (B) Día 8 de cultivo; (C) Día 13 de cultivo. Los cordones observados entre los días 7-9 son muy específicos y claros para el diagnóstico de MTB. Ver anexo 3.

Parámetros optimizados

El algoritmo de la mediana en la filtración del ruido de fondo minimizó la intensidad de los conglomerados en la imagen con respecto al algoritmo de la media y del tercer orden. Las distribuciones de los valores de foco tanto de las cepas aisladas como de las muestras de esputo siguen un mismo patrón ($p = 0,5011$), visualmente similares; por lo tanto, las distribuciones para ambos tipos de cultivo derivan de la misma distribución continua y comparten los mismos parámetros. Por esta razón, para subsiguientes análisis ambos grupos fueron combinados. Se realizó

una estimación permisiva del rango de autoenfoco óptimo (el que maximiza las posibilidades de contener un valor correcto para casi todas las muestras) tomando el rango conformado por el redondeo de los valores de enfoque mínimo y máximo de esta distribución combinada. El valor de autoenfoco óptimo resultante fue de 2000-4000 μm .

Evaluación de las características morfológicas de los cordones MODS en las imágenes capturadas con el microscopio sin lente Cytonote

En total se analizaron 252 imágenes digitales de cultivos MODS de 7 a 9 días. De estas, 72 provenían de cultivos con cepas puras de TB y 180 de muestras de esputo con baciloscopía positiva. La evaluación inicial determinó que Cytonote produce imágenes claras de los cordones de TB con mínimas diferencias en comparación con lo que se observa en un microscopio invertido (Figura 19-A). Se detectó positividad en todas las imágenes. Las imágenes en los cultivos de cepas puras se detectaron los cordones con mayor claridad sobre un fondo libre de ruido (Figura 19-B) a diferencia de los cordones en las muestras de esputo, donde es común encontrar un fondo con células o detritus (Figura 19-C). La forma sinusoidal de los cordones, con longitud y grosor variable, son las características morfológicas más importantes para el reconocimiento visual de TB en las imágenes.

Evaluación de las imágenes con Cytonote para el diagnóstico de TB

Se obtuvieron 2361 imágenes de cultivos MODS de 7 a 9 días con Cytonote. Del total, 911 provenían de 38 cultivos de cepas puras y 1450 de 62 muestras de esputo. La mayoría de las imágenes fueron reconstruidas adecuadamente mediante el software Horus, para una correcta interpretación de los cultivos MODS. Las

imágenes con buen enfoque permitieron distinguir la forma sinuosa de los cordones con longitud y grosor variable (Figura 19). Los extremos puntiagudos y el aumento de brillo en los bordes de los cordones observados con la microscopia invertida convencional, no se aprecian.

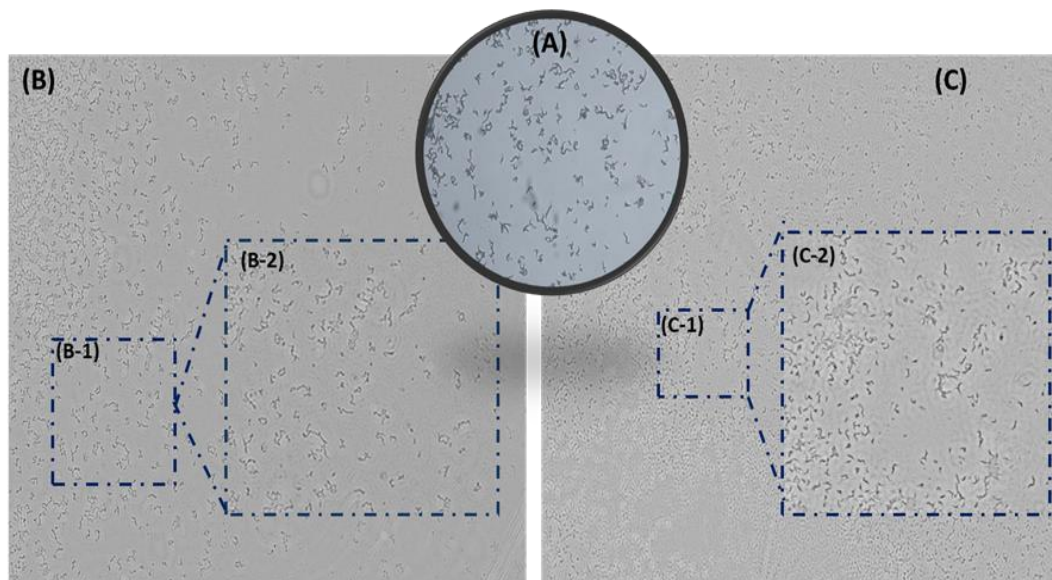


Figura 19: Comparación de imágenes digitales de cultivos MODS positivos al día 8 de cultivo. Ver anexo 3.

Notas: (A) Imagen de una muestra de esputo observada en un microscopio invertido y capturada con cámara Nikon digital DS-L2 (B) Imagen de cepa pura de MTB capturada con Cytonote (C) Imagen de muestra de esputo positiva a MTB capturada con Cytonote. (B-1) y (C-1) segmentos de imagen original Cytonote; (B-2) y (C-2) segmentos de imagen Cytonote ampliado con zoom.

Las imágenes de los cultivos de cepas puras mostraron mayor definición y claridad en comparación con las imágenes correspondientes a los cultivos de esputo (Figura 19-B y 19-C). Del total de imágenes obtenidas, 112 (12,3%) y 143 (9,9%)

correspondientes a los cultivos de cepas puras y muestras de esputo respectivamente, mostraron un bajo nivel de enfoque no interpretable.

Luego de la reconstrucción manual, el 95.85% pudo ser reconstruida con el enfoque adecuado para su interpretación. La comparación final con las imágenes reconstruidas mostró una concordancia del 97.59% para los cultivos de cepas puras y del 94.76% para los cultivos de esputo con el método MODS.

Tabla 6: Performance de la microscopia sin lentes Cytonote comparado con el cultivo MODS para la detección de MTB en imágenes de cepas puras y muestras de esputo

Variables	Enfoque automático				Enfoque manual			
	MODS cepas		MODS esputo		MODS cepas		MODS esputo	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Cytonote Pos	729	0	289	21	819	0	356	21
Cytonote Neg	112	70	122	1018	22	70	55	1018
Sensibilidad %	86.7		70.3		97.4		86.6	
Especificidad %	100		98		100		98	
VPP%	100		93.2		100		94.4	
VPN%	38.4		89.3		76.1		94.9	
Kappa	0.5		0.74		0.85		0.87	

Notas: El Método MODS de cepas y de esputo es el método de referencia. Ver anexo 3.

Abreviaturas: Pos: positivo, Neg: negativo, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Discusión específica de cada estudio

Artículo 1: Evaluación de variantes microbiológicas del procesamiento del esputo y de la concentración de micobacterias para optimizar el diagnóstico microscópico y por imagen de la tuberculosis

El primer estudio busca mejorar la baciloscopia que al ser la herramienta base del diagnóstico microbiológico, es usada aun a pesar de su baja sensibilidad. La baciloscopia es realizada usualmente a partir de muestras de esputo en forma directa y con menos frecuencia a partir de esputos descontaminados. Cuando los esputos son descontaminados, la muestra es resuspendida en el mismo volumen que la muestra original. La estrategia para mejorar este método se concentró en el proceso de las muestras de esputo, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la baciloscopía las muestras descontaminadas fueron concentradas (pellet) y con el objetivo de disminuir los detritus las muestras descontaminadas fueron diluidas (pellet diluido). Los resultados fueron analizados directamente de los observado en el microscopio y de las imágenes tomadas. Asimismo, se probaron dos sistemas de filtración de las muestras con el objetivo de concentrar las muestras y reemplazar los pasos de centrifugación.

Las variantes microbiológicas fueron comparadas a través del recuento de los bacilos y no a través de resultados positivo/negativo como usualmente es reportado con la finalidad de evaluarlos en forma cuantitativa. La mayoría de los estudios realizan comparaciones sólo a nivel categórico, lo cual es relevante en un

entorno clínico, pero podría ser perjudicial para la cuantificación detallada de los efectos de las nuevas variantes microbiológicas que se pretenden introducir.

El recuento de bacilos para las dos variantes microbiológicas fue significativamente mayor en ZN y AF en comparación con el frotis directo, aumentando significativamente la sensibilidad en un 7,1% y un 2%. Por lo tanto, estas variantes contribuyen a aumentar tanto la sensibilidad como potencialmente la especificidad, facilitando las observaciones microscópicas y reduciendo los objetos de distracción y las fuentes de confusión frente a los bacilos.

En este estudio se clasificó la presencia de detritus (restos) como característica de los frotis de esputo teñidos para ZN y AF. La variante de frotis directo y pellet de ZN presentó mayor nivel de detritus que el pellet diluido ($p < 0,001$). En la AF, se encontró un mayor nivel de detritus con la variante pellet ($p < 0,001$) que en los otros métodos. La presencia de detritus en mayor cantidad en la variante pellet concuerda con el hecho que son muestras concentradas; sin embargo, la presencia de dichos detritus no disminuye la capacidad de observación de los bacilos. La variante pellet diluido mostró una mejor especificidad debido a una imagen resultante más limpia.

Los análisis visuales a partir de fotografías de ZN y AF utilizando las variantes descritas, con el objetivo de explorar su utilidad en el desarrollo de algoritmos de reconocimiento. Visualmente, se observó una mayor carga de bacilos en la ZN de pellet y de pellet diluido ($p < 0,001$) en comparación con el frotis directo, así como con la AF. Estos resultados son similares a las observaciones piloto anteriores (datos no mostrados), en las que se cuantificó la carga de bacilos

y se categorizó el detritus en las imágenes evidenciando que había menos ruido de fondo y artefactos en la variante de pellet diluido para ambos métodos de tinción.

Con respecto a la evaluación de los métodos de filtración que permitan a partir de muestras de esputo concentrar los bacilos de MTB, el método de filtración positiva a diferencia del método de filtración negativa mostró tiempos de procesamiento más cortos, menor ocurrencia de atascos y superioridad numérica en el parámetro de carga de bacilos, pero sin alcanzar diferencias significativas. El uso de sistemas de concentración de esputo, por filtración con presión negativa, ha sido estudiado previamente, confirmando las ventajas observadas. Otros estudios utilizaron diferentes sistemas colectores mostraron mejoras en comparación con el frotis directo, pero con la limitación de la formación de tapones en el 5%-20% de las muestras. Otros estudios, sin embargo, utilizando colectores de aluminio multitest, no mejoraron significativamente la sensibilidad en comparación con el frotis directo. A diferencia de otros estudios, aquí comparamos dos prototipos de sistemas paralelos (presión positiva y negativa) en condiciones de trabajo similares con el mismo volumen de muestras y midiendo el tiempo de filtración y el volumen filtrado de muestra en cada equipo. En este estudio, el método de filtración fue probado directamente con muestras de esputo sin previo proceso, sin embargo, el principal inconveniente fue el atascamiento en la filtración.

Los sistemas de filtración de esputo son relativamente económicos por lo que es una opción de reemplazo a los métodos de centrifugación. Estudios adicionales son necesarios para que pueda usarse en forma masiva acompañado de un sistema o algoritmos que identifiquen las micobacterias presentes.

Artículo 2: Evaluación de la metodología de microdilución de caldo en placas para pruebas de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* en el Perú.

El segundo estudio evalúa un método de susceptibilidad a partir de aislados de MTB, el cual es capaz de evaluar múltiples fármacos en un solo tiempo. incluidos fármacos nuevos y repropuestos recientemente por la OMS para el tratamiento de la TB-DR. Por tal motivo se propuso evaluar la metodología de microdilución en caldo utilizando la placa UKMYC6 la cual proporciona la CMI a 13 fármacos en una sola plataforma.

Este trabajo, presenta la primera oportunidad de describir el perfil completo de farmacoresistencia a partir de la CMI de una muestra epidemiológicamente representativa de cepas de MTB resistentes en el Perú. Ello es fundamental para el diseño de regímenes de tratamiento estandarizados para la TB-MDR y brindó la oportunidad de comparar la metodología propuesta con el método tradicional de las proporciones en agar 7H10.

La placa BMD es una herramienta conveniente que determina la CMI de diversos fármacos, esto permite dirigir tanto la elección del fármaco como la dosis para un tratamiento individualizado. Facilita la adición de otros nuevos fármacos y puede adaptarse a una diversa gama de CMIs de ser necesario. Recientemente, la OMS ha destacado la gran viabilidad de esta metodología y ha comenzado a analizar su rendimiento para recomendar su uso clínico.

En general, no se detectó resistencia a los fármacos nuevos y reutilizados. Ninguna cepa superó el ECOFF/ECV para bedaquilina, delamanid, clofazimina o linezolid. Estos resultados coinciden con estudios previos; por lo tanto, se

recomienda su introducción al programa de TB. Una comparación con cepas representativas contemporáneas sería instructiva e importante.

La detección de resultados discordantes en pruebas fenotípicas y genotípicas ha sido reportada en diversos estudios. El mayor porcentaje de resultados discordantes en nuestro estudio se obtuvo en etambutol y etionamida y concuerda con otros reportes. La OMS, reconoce también que las DST fenotípica carecen de suficiente reproducibilidad y no se recomienda para estos fármacos. La considerable disminución de los casos discordantes aplicando concentraciones límite demuestra el gran desafío de definir un fenotipo binario susceptible/resistente para determinados fármacos. El sistema BMD se presenta como una alternativa frente a sistemas tradicionales como el APM. Esta plataforma evalúa simultáneamente un rango de concentraciones para cada fármaco frente al APM que evalúa únicamente concentraciones críticas de un número limitado de fármacos. Además, brinda rápidos resultados, de meses a sólo 14 días. Asimismo, la practicidad del diseño permite personalizar las placas del sistema BMD con diferentes fármacos y rangos de concentración que se ajusten mejor a la realidad de cada país. El análisis simultáneo de varios fármacos anti-TB supondría una gran ventaja en países con alta carga de TB-DR como el Perú, donde los flujos tradicionales generan retrasos en los resultados con alto costo. Por otro lado, se estima que la sustitución de fármacos y el reajuste de las concentraciones no supondrían un aumento significativo de los costos de producción en cada país.

El valor de los datos de la CMI reside en comprender su distribución en poblaciones bien caracterizadas en el tiempo (uso en salud pública) y en el manejo de casos cuando las opciones terapéuticas son muy limitadas pero el aumento de la

dosis podría facilitar la eficacia (uso clínico). La reevaluación periódica del perfil nacional de distribución de la CMI, en particular para los fármacos nuevos y reutilizados en este estudio permitiría conocer la velocidad a la que están (o no están) surgiendo las cepas resistentes, ello no se evidenciaría con los datos binarios de susceptibles/resistentes.

Un punto fuerte de este análisis es la representatividad nacional gracias al muestreo estratificado de las cepas en el periodo del estudio que garantizó una cobertura nacional completa y proporcionada. La disponibilidad y el uso del WGS para el análisis de discrepancias fue una mejora de importancia crítica para no depender de una única metodología como "patrón de oro". Una limitación del análisis fue la falta de datos del APM para los agentes nuevos y repropuestos.

La rápida expansión del uso del WGS para las DST de la TB, la creciente biblioteca de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) que confieren resistencia y la baja de costos sitúan al WGS como un probable sucesor de las DST fenotípica en entornos donde la infraestructura lo permita. Las herramientas en la web para la interpretación del WGS pueden ofrecer "probabilidad de resistencia" para cada fármaco que permitirían una toma de decisiones más inteligente e informada.

Artículo 3: Evaluación de la microscopía sin lente para la interpretación de los cultivos MODS y el facilitamiento del diagnóstico de la tuberculosis

El tercer estudio, reporta por primera vez el uso del sistema de microscopía sin lentes Cytonote para detectar MTB a partir de un cultivo líquido. Entre los métodos de diagnóstico basados en el crecimiento de las micobacterias en medio líquido, se encuentra el método MODS que ha demostrado ser una herramienta

simple y robusta para el diagnóstico de TB y TB-MDR, sin embargo, al necesitar de un microscopio invertido que suele ser costoso y de necesitar expertos y tiempo para las lecturas microscópicas se propuso el uso de la microscopia sin lentes Cytonote para que facilite el diagnóstico con MODS ya que proporciona imágenes en un mayor campo de visión con ausencia de enfoque manual entre las tomas y realizar el análisis de las imágenes en tiempo real con menor trabajo para el operador.

Dado ello, la estrategia para este estudio se concentró en evaluar inicialmente si el microscopio sin lentes Cytonote podría ayudar a generar imágenes de los cordones MODS y sobre ello estudiar su morfología que permita su reconocimiento en un corto tiempo. Asimismo, se evaluaron un grupo de imágenes obtenidas por Cytonote obtenidas a partir de cepas y muestras de esputo cultivadas con MODS con el objetivo de diagnosticar TB como positivo o negativo mostrando la imagen en un monitor de computadora.

La evaluación inicial determinó que Cytonote produce imágenes claras de los cordones de TB con MODS y que su morfología se visualiza con poca diferencia con respecto a lo que se observa en un microscopio invertido, siendo los cultivos de cepas puras donde se detectan con mayor claridad los cordones de MTB sobre un fondo sin ruido y en muestras de esputo donde es común encontrar adicionalmente células o detritus. En ambos cultivos, se determinó que la forma sinusoidal de los cordones adoptando longitud y grosor variado son las características morfológicas más importantes para el reconocimiento visual de TB en las imágenes.

Con respecto al desempeño en el diagnóstico de la TB a partir de la captura de imágenes digitales con Cytonote, esta plataforma demostró ser una herramienta rápida y simple, aunque, en algunos casos, es necesaria una inspección de distintas imágenes reconstruidas de una misma muestra. Pese a ello, muestra ser una herramienta de gran utilidad que facilita el diagnóstico de la TB a partir de los cultivos MODS.

Una fortaleza del presente estudio es que permitió la identificación y evaluación de los cordones MODS en una imagen completa dentro de un campo de visión de 29,4 mm² utilizando un sensor CMOS de 10 megapíxeles. Sin embargo, en cultivos de esputo con alta cantidad de detritus y/o células, los cordones no se distinguen con claridad. Este detalle se presenta además en los cultivos con alta cantidad de cordones que forman conglomerados, las imágenes no lograban distinguirse a diferencia de lo que logra la vista humana en el examen microscópico. Ello representa una limitación intrínseca de la plataforma utilizada.

Tanto el análisis de las características morfológicas como la evaluación de las imágenes por Cytonote para el diagnóstico de TB son subjetivos y difíciles de estandarizar. Por lo tanto, los resultados dependen directamente de la capacidad visual y de la experiencia de los profesionales que hacen MODS. La práctica de interpretar correctamente la imagen captada de un pocillo MODS puede acortar el diagnóstico sin la necesidad de usar un microscopio invertido.

Si bien nuestro estudio confirma la prueba de concepto que valida el uso de la microscopía sin lentes para las lecturas e interpretación de cultivos MODS en el diagnóstico de TB, debemos reconocer que aún existen ciertas limitaciones que deben ser consideradas en futuros estudios para buscar mejores resultados.

Los patrones de difracción (hologramas) generados con el microscopio sin lentes, deben ser tratados matemáticamente para reconstruir la imagen física real. En el presente estudio hemos encontrado que luego de optimizar inicialmente el parámetro de enfoque en el eje-Z, este único parámetro no es capaz de reconstruir los hologramas y generar imágenes de óptima calidad para todas las muestras. Aproximadamente en un 11% de los casos, las imágenes reconstruidas utilizando el único parámetro de enfoque/eje-Z optimizado, son borrosas y no es posible interpretarlas adecuadamente. En estos casos, tuvimos que repetir el procesamiento del holograma, empleando el software Horus, para distintos valores del parámetro de enfoque/eje-Z. En cada caso encontramos que al menos un parámetro de enfoque/eje-Z fue capaz de reconstruir una imagen con calidad adecuada para realizar un diagnóstico confiable.

La razón por la cual, casi un 11% de los cultivos MODS, a diferencia de los cultivos celulares para los cuales el sistema de microscopía sin lentes Cytonote fue originalmente diseñado, requieren un parámetro de enfoque/eje-Z a medida, podría deberse a que las estructuras de cordones asociadas a las colonias, se forman no necesariamente en un mismo plano con respecto al nivel del pozo. Los cordones de TB, pueden doblarse y alcanzar una compleja estructura en 3 dimensiones o podrían crecer montados sobre algunos restos contaminantes, formándose por lo tanto en planos distintos, por lo cual requieren parámetros de enfoque/eje-Z optimizados para la muestra específica. Esto representa una importante limitación de la aplicación de la tecnología de microscopía sin lentes. Creemos, sin embargo, que una mejora para los softwares de reconstrucción, podría ser que de manera automática reconstruyan las imágenes de los hologramas, para distintos parámetros

de enfoque/eje-Z en un cierto rango alrededor del parámetro óptimo inicialmente estimado.

Otra limitación identificada fue la formación de condensación en las tapas de las placas de MODS generado al momento de sacarlas de la incubadora ocasionando pérdida de la calidad de las imágenes. Si bien el sensor CMOS apunta a la placa por debajo de esta, la fuente de luz ilumina y atraviesa la muestra desde arriba, pasando a través de la tapa. Sin embargo, esto fue subsanado aplicando calor sobre la placa utilizando una sopladora de aire caliente.

Este estudio demuestra que la microscopia sin lentes Cytonote permite la detección temprana y automática de cultivos MODS, respondiendo a necesidades básicas de los usuarios. Además, este estudio es la base para el desarrollo de nuevos dispositivos de imágenes 100% automáticos que permitan la detección y monitoreo simultáneo dentro de una incubadora de una placa completa de 24 pocillos para evaluar varios cultivos facilitando el diagnóstico de TB-MDR en un tiempo corto. El evaluar un único pocillo requiere la inspección de 25 campos microscópicos con un aumento de 100X para un experto en MODS lo cual puede tomar de 4-5 minutos para un operador no experto, lo cual, usando microscopía sin lente, dicha captura se realiza en un instante. Esto abre posibilidades prometedoras para desarrollar sistemas automatizados más rápidos para el diagnóstico de TB basados en cultivos MODS. El enlace de un microscopio sin lentes, con un algoritmo de reconocimiento de patrones, que permita un diagnóstico rápido y automático, sería una herramienta importante para ayudar y simplificar el diagnóstico de TB basado en MODS.

VI.2. Discusión integrada

El presente trabajo doctoral aporta a partir de los tres estudios referidos un conjunto de nuevas técnicas y herramientas microbiológicas simples, básicas y económicas que permitan mejorar la detección de casos de TB y la TB-DR. Los trabajos señalados surgen en base a la necesidad de mejorar las estrategias microbiológicas actuales y que son aun de uso amplio en los países en vías de desarrollo. De igual forma, estos trabajos han permitido plasmar en forma sencilla y breve el acceso a conocimiento nuevo para el manejo microbiológico de la TB.

Los trabajos planteados en esta tesis doctoral se dan como respuesta a los problemas concretos, antiguos y vigentes para el diagnóstico microbiológico de la TB. Lo descrito en los trabajos mencionados en este manuscrito son claramente insuficientes para abarcar los problemas en la detección de los casos y del reconocimiento rápido de la resistencia a los fármacos. Sin embargo, aporta nuevas herramientas y alternativas de optimización de métodos existentes que permitan frenar o mejorar el avance de la TB especialmente en países con bajos recursos.

El trabajo realizado en esta tesis doctoral no implica la culminación de trabajos publicados solo para el conocimiento científico sino marca el inicio de más estudios relacionados que permitan mejorar los hallazgos encontrados y de nuevos retos diagnósticos que permitan controlar la propagación de la enfermedad. En el caso de las variantes microbiológicas propuestas ha permitido su implementación como justificación científica en nuestro laboratorio y en el laboratorio referencial de TB de la Dirección de Salud del Callao tanto para muestras de esputo y muestras extrapulmonares como parte de sus estrategias para mejorar la detección de casos

en forma oportuna. Con respecto a las variantes microbiológicas descritas para el desarrollo de algoritmos de reconocimiento, nuestros hallazgos iniciales sirvieron de argumento para el desarrollo de algoritmos de reconocimiento de imágenes para extendidos coloreados tanto para ZN y AF, en ambos casos, los resultados obtenidos son positivos, se reportó que el uso de las variantes produce imágenes más limpias, rechazando con éxito los objetos clasificados como no bacilos en >90% de los casos como lo describe Del Carpio et al., (2019) y Dianderas et al., (2020).

Asimismo, el uso de las placas de microtitulación en caldo usando la placa UKMYC6 para la detección de la CMI a diversos fármacos propuesto por el Consorcio CRyPTIC (Predicción integral de la resistencia a la tuberculosis: un consorcio internacional) están impulsando mejorar en el control de la TB resistente y apoyar a la estrategia End TB de la OMS para un mejor, rápido y efectivo tratamiento de la TB-DR. Ha permitido en su estudio el mapeo de variaciones genéticas en el genoma de MTB que confieren resistencia a múltiples fármacos en 20 632 aislados de 11 diversos países del mundo; asimismo, proporciona evidencia que respalda el uso de las placas UKMYC6 en el camino a la obtención de pruebas universales para el tratamiento mejorado e individualizado de cada paciente afectado. Nuestro estudio permitió caracterizar un conjunto de cepas resistentes epidemiológicamente representativas de todo el Perú demostrando resultados alentadores y permitió caracterizar otros fármacos utilizados en el control de la TB tanto nuevos como otros recientemente propuestos por la OMS. Actualmente, una nueva versión de la placa UKMYC6 está siendo evaluada con aislados de Lima por

un grupo independiente de investigación del Perú utilizando similares fármacos (comunicación personal).

Optimizar herramientas diagnósticas que han evidenciado ser sencillas, robustas y de amplio uso en diferentes entornos como el método MODS es tener la oportunidad de mejorarlas y masificar aún más su uso en el diagnóstico de la TB y TB-MDR, lo desarrollado no es suficiente. Bajo este panorama, somos testigos en estos años del desarrollo de la I+D+I en el campo de la microscopia y de la TB. La creciente alza de la TB-DR en el mundo nos ha confirmado que el uso de un sistema de microscopia sin lentes es útil para la inspección por imágenes digitales de los cultivos MODS y para la detección de MTB ofreciendo rapidez y simplicidad para las lecturas, Sin embargo, presenta ciertas limitantes que se deben abordar y sienta las bases para el desarrollo de nuevos dispositivos de imágenes completamente automáticos que permitan la detección y monitoreo simultáneo de una placa completa de 24 pocillos en una incubadora, facilitando el diagnóstico de TB-MDR en un tiempo corto.

Finalmente, los estudios descritos en esta tesis doctoral se considera que dan un aporte científico microbiológico importante y relevante para la búsqueda de herramientas fáciles y simples para posibilitar el diagnóstico de la TB y de la TB-DR especialmente en países donde son escasos los recursos y presentan alta carga de la enfermedad.

VII. CONCLUSIONES

Estudio 1:

- Las variantes microbiológicas propuestas en el estudio mejoraron la sensibilidad de la baciloscopia directa estándar en 7.1% y 2% tanto en muestras de esputo coloreadas con ZN y con AF.
- La variante pellet diluido presentó menos detritus en un 41.6% y 3.7% tanto en muestras de esputo coloreadas con ZN y AF con respecto a la baciloscopia directa estándar.
- La carga bacilar fue significativamente mayor tanto en los frotis e imágenes digitales utilizando las variantes propuestas coloreadas con ZN y AF comparado con la baciloscopia estándar.
- El método de filtración positiva mostró mayor volumen filtrado en menor tiempo y similar recuento de micobacterias a la filtración negativa y al método directo.

Estudio 2:

- El método de microdilución en caldo utilizando la placa UKMYC6, demostró rapidez para obtener resultados (14 días en el 80% de las placas) y buen desempeño para caracterizar las CMI's de diversos fármacos (99% de MIC validos), así como fármacos nuevos y otros repropuestos recientemente.
- El método de microdilución en caldo mostró alta concordancia en la susceptibilidad de rifampicina, isoniazida, kanamicina y levofloxacina y

modesta concordancia con etambutol y etionamida al ser comparado con el APM.

Estudio 3:

- El uso del sistema de microscopio sin lentes Cytonote genera imágenes claras de los cordones de MTB en los cultivos MODS, facilitando el diagnóstico de la TB en un tiempo más corto.
- Las imágenes obtenidas con Cytonote usando el enfoque automático y manual mostraron sensibilidades del 86.7%/97,4% para los cultivos de cepas puras y de 70.3%/86,6% para los cultivos de esputo comparado con el método MODS.

VIII. LIMITACIONES

Estudio 1

Las variantes microbiológicas propuestas mejoraron la sensibilidad para la detección de bacilos de MTB en muestras de esputo en comparación con el frotis directo, sin embargo, se necesitan evaluar una mayor para cantidad de muestras para confirmar estas mejoras en la coloración de auramina en donde no se encontró diferencias estadísticas de las variantes con respecto a la baciloscopía directa.

Las variantes propuestas aclararon los frotis al disminuir los detritus presentes para el recuento bacilar en un menor tiempo sin embargo esta variable no fue evaluada en este estudio. Asimismo, los recuentos microscópicos tanto en los frotis directo y en las variantes con ambos métodos de coloración no son comparables con el análisis de imágenes dado que este último solo consideró 4-5 imágenes por lamina coloreada sin embargo los recuentos realizados fueron significativamente superiores al compararse con el frotis directo, asimismo estas imágenes fueron evaluadas posteriormente utilizando algoritmos de detección tanto para ZN y AF, donde la variante pellet diluido brindo mejor sensibilidad en las evaluaciones.

Los sistemas de filtración evaluados con cierta frecuencia presentaron obstrucciones que dependían de la viscosidad de las muestras de esputo, asimismo, el tratamiento previo de las muestras para filtrar tomaba un tiempo prolongado a comparación del frotis directo. Es importante reducir estos eventos y para ello se necesitan más estudios que permitan disolver mejor las muestras de esputo con pocos y simples procesos.

Estudio 2

El método de microtitulación en placa permitió la primera descripción del perfil integral de resistencia a través de la CMI de una muestra representativa (a nivel de prevalencia) de cepas de MTB del Perú, sin embargo, se requiere más evaluaciones para analizar su reproducibilidad para obtener un sistema optimizado que pueda recomendarse para uso clínico.

No se obtuvo información de susceptibilidad por APM para algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la TB incluyendo los fármacos nuevos y repropuestos últimamente por la OMS para los análisis, sin embargo, se destaca la versatilidad del BMD para evaluar gran diversidad de fármacos en un solo ensayo.

Estudio 3

Se requiere la optimización de los parámetros de enfoque de la microscopia sin lentes Cytonote especialmente para los cultivos de muestras de esputo dado a que, a diferencia de los cultivos de células, los cordones MODS no se forman sobre un mismo plano al nivel del pozo, estos pueden adquirir una estructura tridimensional o desarrollarse en distintos planos junto a restos o detritus propios de la muestra.

La presencia de detritus y/o células en los cultivos de esputo, así como muestras con abundantes cordones que forman conglomerados, no permite distinguirse en las imágenes a comparación de las imágenes obtenidas en la observación directa a través de un microscopio invertido convencional. Por tanto,

los resultados con Cytonote dependen de la experiencia del personal que realiza las lecturas y de la optimización futura que se dé al sistema.

La condensación en las tapas de las placas MODS, al retirarlas de la incubadora, produce bajo nivel de enfoque en algunas imágenes sin embargo en nuestro estudio se solucionó aplicando calor a la placa con un soplador de aire caliente.

IX. RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones y limitaciones ya descritas en esta tesis doctoral de los estudios ya mencionados se describen las siguientes recomendaciones:

1. Las variantes microbiológicas podrían ser parte de las estrategias de los programas de TB para la detección oportuna de casos. Es necesario más estudios que impulsen su utilidad de estas variantes, así como explorar más su utilidad en el desarrollo de algoritmos de reconocimiento.
2. Es prioritario contar con herramientas simples que permitan determinar el patrón de resistencia a múltiples fármacos en un solo paso para mejorar la tasa de éxito al tratamiento y cortar la transmisión de la TB-DR. El uso de la placa UKMYC6, está demostrando ser una herramienta conveniente que permite un tratamiento individualizado y se está analizando actualmente su rendimiento para desarrollar un sistema optimizado que pueda recomendarse en corto plazo para el uso clínico.
3. La microscopía sin lentes Cytonote utilizando imágenes digitales emerge como una plataforma prometedora que permite la detección temprana y automática de los cordones típicos de MTB en los cultivos MODS, sin embargo, se requiere optimizar su sistema de enfoque. Además, se concluye que futuras investigaciones deben abordar las limitantes encontradas y facilite en tiempo corto el diagnóstico de la TB y TB-MDR.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

X.1. Referencias capítulo I

1. 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.* 2017; 58(1): p. E9-E12.
2. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiro Med.* 2006; 100 (11): p.1862–1870.
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2022 [Internet]. 2022 [consultado el 10 de marzo del 2022]. 57p. Disponible en : http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
4. Blumberg, H. M., Burman, W. J., Chaisson, R. E., Daley, C. L., Etkind, S. C., Friedman, L. N., Fujiwara, P., Grzemska, M., Hopewell, P. C., Iseman, M. D., Jasmer, R. M., Koppaka, V., Menzies, R. I., O'Brien, R. J., Reves, R. R., Reichman, L. B., Simone, P. M., Starke, J. R., & Vernon, A. A. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003; 167(4), p. 603-662.
5. World Health Organization Global Tuberculosis Report 2021 [Internet]. 2021 [consultado el 12 de marzo del 2022] 57 p. Disponible en: <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>
6. Murray PR, Kobayashi PR, Pfaller MA, Rosenthal KS. *Microbiologia Medica. Mycobacterium*. Editorial Medica Panamericana; 1992; cap. 35: p. 321-333.

7. Serafino W. Tuberculosis 2: Pathophysiology and microbiology of pulmonary tuberculosis SSMJ [Internet] 2013 [consultado el 15 de marzo del 2022] 6 (1). Disponible en www.southsudanmedicaljournal.com
8. Martynov AV, Bomko TV, Nosalskaya TN, Lisnyak Yu.V, Romanova EA, Kabluchko TV, Farber sb. Tuberculosis as an infectious pathology of immune system. Annals of Mechnicov Institute, 2016: (3), p. 8–14.
9. Rook, G., Dheda, K. & Zumla, A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. Nat Rev Immunol 2005; p. 661–667
10. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis* Trends in Microbiology, 2018; 26 (6) p. 555–556.
11. World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021 [consultado el 12 julio 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018662>
12. Tiberi S, Utjesanovic N, Galvin J et al., Drug resistant TB – latest developments in epidemiology, diagnostics and management, International Journal of Infectious Diseases. 2022; 124: p. S20-S25.
13. Roelens M, Battista Migliori G, Rozanova L, Estill J, Campbell JR, Cegielski JP, Tiberi S, Palmero D, Fox GJ, Guglielmetti L, Sotgiu G, Brust JCM, Bang D, Lienhardt C, Lange C, Menzies D, Keiser O, Raviglione M. Evidence-based Definition for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2021; 204(6): p. 713-722.

14. Ministerio de Salud de Salud. Instituto nacional de Salud. El laboratorio de Salud Pública frente a la emergencia de la tuberculosis resistente. Lima, Perú. Documento Técnico No3: Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes.2001.
15. Análisis de la Situación Epidemiológica de la Tuberculosis en el Perú, 2015 Ministerio de Salud de Salud, Dirección General de Epidemiología, 2016.
16. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Organización Panamericana de la Salud, 2021.
17. Ministerio de Salud. Dirección de Prevención y Control de la Tuberculosis - Portal de Información peruano. 2021. [consultado el 13 Nov 2022]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/MapasTB.aspx>.
18. Victorino Farga y José Antonio Caminero. Tuberculosis. Editorial Mediterráneo. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. Santiago y Buenos Aires. 2011.3ra edición, 483 páginas.
19. Gonzalez-Martin J. Microbiology of Tuberculosis. Semin, Fund Esp. Reumatol 2014;15(1): p. 25-33.
20. Hernández-Garduño E, Cook V, Kunimoto D, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. Thorax. 2004; 59(4): p. 286-90.
21. Sester M, Giehl C, McNerney R, Kampmann B, Walzl G, Cuchí P, Wingfield C, Lange C, Migliori GB, Kritski AL, Meyerhans A; European Network for global cooperation in the field of AIDS and TB (EUCCO-Net). Challenges and perspectives for improved management of HIV/Mycobacterium tuberculosis co-infection. Eur Respir J. 2010; 36(6): p. 1242-7

22. Campelo TA, Cardoso de Sousa PR, Nogueira LL, Frota CC, Zuquim Antas PR. Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far? *Access Microbiol.* 2021;3(8): p. 000245. Erratum in: *Access Microbiol.* 2022 4(1): p. 000294.
23. World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement. [Internet] 2011. [Consultado el 14 de abril del 2022] Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44602/9789241501613_eng.pdf
24. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins MD, Aziz MA, Pai M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(10): p. 664-74.
25. World Health Organization. New WHO policies: the use of liquid medium for culture and DST.2007.
26. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, Berg DE, Montenegro-James S. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): p. 1203-8.
27. Moore DA, Mendoza D, Gilman RH, Evans CA, Hollm Delgado MG, Guerra J, Caviedes L, Vargas D, Ticona E, Ortiz J, Soto G, Serpa J; Tuberculosis Working Group in Peru. Microscopic observation drug susceptibility assay, a

- rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(10): p. 4432-7.
28. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, Sanchez E, Piñedo Y, Saravia JC, Salazar C, Oberhelman R, Hollm-Delgado MG, LaChira D, Escombe AR, Friedland JS. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med.* 2006; 355(15): p. 1539-50.
29. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory.* Centers for Disease Control. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia. 1985.
30. Lee J, Armstrong DT, Ssengooba W, Park J-A, Yu Y, Mumbowa F, et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: p.11-8.
31. Hall L, Jude KP, Clark SL, Dionne K, Merson R, Boyer A, et al. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex against first- and second-line agents. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: p. 3732-4.
32. World Health Organization. Rapid Communication: Molecular assays as initial tests for the diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance, [Internet] 2020. [consultado el 15 de julio del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330395/9789240000339-eng.pdf>

33. Gill CM, Dolan L, Piggott LM, et al. New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe* 2022; 18: p. 210149
34. World Health Organization. (2014). Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational 'how-to'; practical considerations. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112469>
35. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update. Geneva [Internet]. 2016, [Consultado el 12 de febrero del 2022]. Disponible en: www.hts.org.gr/assets/files/seminars/seminars2018/WHO%20molecular%202016.pdf
36. HAIN LifeScience. Genotype MTBDRsl Version 2.0 instructions for use. Document IFA-317A-01. Nehren, HAIN LifeScience, 2015.
37. José Antonio Lozano. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. Elsevier. 2002; 21(8): p. 102-110.

X.2. Referencias artículo 1

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva: World Health Organization [Internet] 2018. [consultado el 13 de enero del 2019] Disponible en: <http://www.apps.who.int/>
2. Sohail M. Tuberculosis: A re-emerging enemy. *J Mol Genet Med* 2006; 2: p. 87-8.
3. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, *et al.* Physiology of mycobacteria. *Adv Microb Physiol* 2009; 55:81-182, 318-9.
4. Ghodbane R, Raoult D, Drancourt M. Dramatic reduction of culture time of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 2014; 4: p. 4236.

5. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970; 51: p.196-206.
6. Xia H, Song YY, Zhao B, Kam KM, O'Brien RJ, Zhang ZY, et al. Multicentre evaluation of Ziehl-Neelsen and light-emitting diode fluorescence microscopy in China. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17: p. 107-12.
7. Hooja S, Pal N, Malhotra B, Goyal S, Kumar V, Vyas L. Comparison of Ziehl Neelsen and Auramine O staining methods on direct and concentrated smears in clinical specimens. *Indian J Tuberc* 2011; 58: p. 72-6.
8. World Health Organization. Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. Geneva: World Health Organization. [Internet]; 2010. [Consultado el 12 de marzo del 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/tb/laboratory/>
9. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: p. 664-74.
10. Smithwick RW, Stratigos CB. Acid-fast microscopy on polycarbonate membrane filter sputum sediments. *J Clin Microbiol* 1981; 13: p. 109-13.
11. Fennelly KP, Morais CG, Hadad DJ, Vinhas S, Dietze R, Palaci M, et al. The small membrane filter method of microscopy to diagnose pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: p. 2096-9.
12. Quincó P, Bühler-Sékula S, Brandão W, Monte R, Souza SL, Saraceni V, et al. Increased sensitivity in the diagnosis of tuberculosis in HIV-positive patients through the small-membrane-filter method of microscopy. *J Clin Microbiol* 2013; 51: p. 2921-5.

13. Boum Y, Kim S, Orikiriza P, Acuña-Villaorduña C, Vinhas S, Bonnet M, *et al.* Diagnostic accuracy of the small membrane filtration method for diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high-HIV-prevalence setting. *J Clin Microbiol* 2016; 54: p. 1520-7.
14. Jones-López E, Manabe YC, Palaci M, Kayiza C, Armstrong D, Nakiyingi L, *et al.* Prospective cross-sectional evaluation of the small membrane filtration method for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2014; 52: p. 2513-20.
15. UPCH. MODS A User Guide. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2008. [Última consulta el 15 de diciembre del 2018]. Disponible en: http://www.modsperu.org/MODS_user_guide.
16. Angeby KA, Alvarado-Gálvez C, Pineda-García L, Hoffner SE. Improved sputum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: p. 684-7.
17. Uddin MK, Chowdhury MR, Ahmed S, Rahman MT, Khatun R, van Leth F, *et al.* Comparison of direct versus concentrated smear microscopy in detection of pulmonary tuberculosis. *BMC Res Notes* 2013; 6: p.291.
18. Del Carpio C, Dianderas E, Zimic M, Sheen P, Coronel J, Fuentes P, *et al.* Computer Algorithm for Detection of Tuberculosis Bacilli in Ziehl Neelsen Sputum Smear Images Based on the Adjustment of RGB Primary Component Tones and Geometric Eccentricity. *Proceedings of the 21st World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics (WMSCI 2017)* [Internet] ; 2017. [Consultado el 15 de diciembre del 2018]. Disponible en: <http://www.iiis.org/>

19. Chew R, Calderón C, Schumacher SG, Sherman JM, Caviedes L, Fuentes P, *et al.* Evaluation of bleach-sedimentation for sterilizing and concentrating *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. BMC Infect Dis 2011; 11: p: 269.

X.3. Referencias artículo 2

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. [Internet]. 2021. [Consultado el 10 de Febrero del 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. [Internet]. 2020. [Consultado el 17 de diciembre del 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. [Internet]. 2019. [Consultado el 5 de diciembre del 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714>.
4. Ministerio de Salud. Dirección de Prevención y Control de la Tuberculosis - Portal de Información peruano. 2021. [Internet]. 2021. [Consultado el 5 de febrero del 2022]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/MapasTB.aspx>.
5. Timperi R, Han LL, Sloutsky A, Becerra MC, Nardell EA, Salazar JJ, *et al.* Drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: five years' experience and insight into treatment strategies for MDR-TB in Lima, Peru. Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis. 2005; 9: p. 175–80.
6. Lee J, Armstrong DT, Ssenooba W, Park J-A, Yu Y, Mumbowa F, *et al.* Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis*

- susceptibility to first- and second-line drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: p. 11–8.
7. Hall L, Jude KP, Clark SL, Dionne K, Merson R, Boyer A, et al. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex against first- and second-line agents. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: p. 3732–4.
 8. Rancoita PMV, Cugnata F, Gibertoni Cruz AL, Borroni E, Hoosdally SJ, Walker TM, et al. Validating a 14-drug microtiter plate containing bedaquiline and delamanid for large-scale research susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62: p. e00344-e418.
 9. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes.* 2nd edition. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
 10. World Health Organization. Rapid communication: key changes to treatment of multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis (MDR/RR-TB). [Internet] 2018. [Consultado el 7 de junio del 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-TB-2018.18>.
 11. The CRyPTIC Consortium, Fowler PW. Epidemiological cutoff values for a 96-well broth microdilution plate for high-throughput research antibiotic susceptibility testing of *M. tuberculosis*. 2022; 60(4): p. 2200239.
 12. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [Internet]. 2010. [Consultado el 12 de nov del 2019] Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

13. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30: p. 2114–20.
14. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows- Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010; 26: p. 589–95.
15. Broad Institute. Picard: A set of Java command line tools for manipulating high-throughput sequencing (HTS) data and formats such as SAM/BAM/CRAM and VCF. Broad Inst GitHub Repos. [Internet]. 2019. [Consultado el 20 de nov del 2019]. Disponible en: <https://broadinstitute.github.io/picard/>.
16. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, et al. The genome analysis toolkit: a Map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010; 20: p. 1297–303.
17. World Health Organization. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. [Internet]. 2021. [Consultado el 20 de julio del 2021]. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>.
18. Phelan JE, O’Sullivan DM, Machado D, Ramos J, Oppong YEA, Campino S, et al. Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs. *Genome Med*. 2019; 11:41.
19. Hunt M, Bradley P, Lapierre SG, Heys S, Thomsit M, Hall MB, et al. Antibiotic resistance prediction for Mycobacterium tuberculosis from genome sequence data with Mykrobe. *Wellcome Open Res*. 2019; 4: p.191.
20. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput. [Internet] 2013. [Consultado el 2 de junio del 2020]. Disponible en: <http://www.R-project.org/>.

21. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: p. 159–74.
22. Mendoza-Ticona A, Moore DA, Alarcón V, Samalvides F, Seas C. Propuesta de esquemas de tratamiento antituberculosis basados en la susceptibilidad A isoniácida y rifampicina. *Rev Peru Med Exp Salud Publ*. 2013; 30: p.197–204.
23. Lopez B, Siqueira de Oliveira R, Pinhata JMW, Chimara E, Pacheco Ascencio E, Puyén Guerra ZM, et al. Bedaquiline and linezolid MIC distributions and epidemiological cut-off values for *Mycobacterium tuberculosis* in the Latin American region. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74: p. 373–9.
24. Ismail NA, Ismail F, Joseph L, Govender N, Blows L, Kaniga K, et al. Epidemiological cut-offs for Sensititre susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: interpretive criteria cross validated with whole genome sequencing. *Sci Rep*. 2020; 10: p. 1013.
25. Yang JS, Kim KJ, Choi H, Lee SH. Delamanid, bedaquiline, and linezolid minimum inhibitory concentration distributions and resistance-related gene mutations in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in Korea. *Ann Lab Med*. 2018; 38: p. 563–8.
26. Ministerio de Salud. Modificatoria de la Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectadas por tuberculosis. [Internet]. 2018.[Consultado el 19 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/186788-752-2018>.
27. Ssengooba W, Nakayita G, Namaganda CC, Joloba ML. Agreement of Middlebrook 7H10 with Lowenstein Jensen and accuracy of the Sensititre MYCOTB plate using either method as a reference standard for *Mycobacterium*

- tuberculosis first line drug susceptibility testing. PLoS ONE. 2018;13: p. e0199638.
28. Yu X, Ma Y-F, Jiang G-L, Chen S-T, Wang G-R, Huang H-R. Sensititre® MYCOTB MIC plate for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis. 2016; 20: p. 329–34.
30. World Health Organization. Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB. [Internet] .2018. [Consultado el 5 de febrero del 2019]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260470>.
31. World Health Organization. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifampicin (rifampicin, rifabutin and rifapentine). [Internet] 2021. [Consultado el 18 de abril del 2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/339275>.
32. Dusthacker A, Saadhali SA, Thangam M, Hassan S, Balasubramanian M, Balasubramanian A, et al. Wild-type MIC distribution for re-evaluating the critical concentration of anti-TB drugs and pharmacodynamics among tuberculosis patients from South India. Front Microbiol. 2020; 11: p.1182.
33. Pasipanodya J, Srivastava S, Gumbo T. New susceptibility breakpoints and the regional variability of MIC distribution in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56: p. 5428.
34. World Health Organization. Optimized broth microdilution plate methodology for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex.

[Internet]. 2022. [Consultado el 15 de abril del 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047419>.

35. Banu S, Rahman SMM, Khan MSR, Ferdous SS, Ahmed S, Gratz J, et al. Discordance across several methods for drug susceptibility testing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a single laboratory. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: p.156–63.
36. Zürcher K, Reichmuth ML, Ballif M, Loiseau C, Borrell S, Reinhard M, et al. Mortality from drug-resistant tuberculosis in high-burden countries comparing routine drug susceptibility testing with whole-genome sequencing: a multicentre cohort study. *Lancet Microbe*. 2021;2: p. e320–30.
37. Zhang Z, Wang Y, Pang Y, Kam KM. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: p. 638–41.
38. Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, et al. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: p. 3976–9.
38. Li M, Chen R, Lin S, Lu Y, Liu H, Li G, et al. Detecting ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China: a comparison between phenotypic drug susceptibility testing methods and DNA sequencing of *embAB*. *Front Microbiol*. 2020; 11: p. 781.
39. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018.

40. CRyPTIC Consortium. Epidemiological cutoff values for a 96-well broth microdilution plate for high-throughput research antibiotic susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *Eur Respir J*. 2022;2200239.
41. Xu Y, Wu J, Liao S, Sun Z. Treating tuberculosis with high doses of anti-TB drugs: mechanisms and outcomes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017; 16: p. 67.
42. World Health Organization. Technical guide on next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. [Internet] 2018. [Consultado el 2 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274443>.
43. Hasan Z, Shakoor S, Hasan R. Importance of next-generation diagnostics in control of tuberculosis in LMICs. *Ebio Medicine*. 2021;74: p. 103753.
44. CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, Allix-Béguet C, Arandjelovic I, Bi L, Beckert P, Bonnet M, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *N Engl J Med*. 2018; 379: p. 1403–15.

X.3. Referencias artículo 3

1. World Health Organization. Geneva: WHO; Global Tuberculosis Report 2021. [Internet] 2022 [consultado el 10 de marzo del 2022]. 57p. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020. Geneva: World Health Organization; [Internet] 2021. [Consultado el 12 de julio

del 2021]. Disponible en:

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240018662>

3. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; [Internet]. 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [Consultado el 13 de julio 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275324479>.
4. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, Berg DE, Montenegro-James S. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol*. 2000; 8(3): p.1203-8.
5. Moore DA, Mendoza D, Gilman RH, Evans CA, Hollm Delgado MG, Guerra J, Caviedes L, Vargas D, Ticona E, Ortiz J, Soto G, Serpa J; Tuberculosis Working Group in Peru. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(10): p. 4432-7
6. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, Sánchez E, Piñedo Y, Saravia JC, Salazar C, Oberhelman R, Hollm-Delgado MG, LaChira D, Escombe AR, Friedland JS. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med*. 2006; 355(15): p. 1539-50.
7. Alcántara R, Fuentes P, Antiparra R, Santos M, Gilman RH, Kirwan DE, Zimic M, Sheen P. MODS-Wayne, a Colorimetric Adaptation of the Microscopic-Observation Drug Susceptibility (MODS) Assay for Detection of

- Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide Resistance from Sputum Samples. J Clin Microbiol. 2019 Jan 30;57(2): p. e01162-18.
8. Alcántara R, Fuentes P, Marin L, Kirwan DE, Gilman RH, Zimic M, Sheen P. Direct Determination of Pyrazinamide (PZA) Susceptibility by Sputum Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS) Culture at Neutral pH: the MODS-PZA Assay. J Clin Microbiol. 2020;58(5): p. e01165-19.
 9. Alva A, Aquino F, Gilman RH, Olivares C, Requena D, Gutiérrez AH, Caviedes L, Coronel J, Larson S, Sheen P, Moore DA, Zimic M. Morphological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* in a MODS culture for an automatic diagnostic through pattern recognition. PLoS One. 2013 Dec 16;8(12): p. e82809.
 10. Lopez-Garnier S, Sheen P, Zimic M. Automatic diagnostics of tuberculosis using convolutional neural networks analysis of MODS digital images. PLoS One. 2019 Feb 27;14(2): p. e0212094.
 11. Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, Pai M. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Current standards and challenges. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2008;19(2): p. 169-72.
 12. Zimic M, Velazco A, Comina G, Coronel J, Fuentes P, Luna CG, Sheen P, Gilman RH, Moore DA. Development of low-cost inverted microscope to detect early growth of *Mycobacterium tuberculosis* in MODS culture. PLoS One. 2010;5(3): p. e9577.
 13. Salgado M, Zarate G, Coronel J, Comina G, Gilman RH, Sheen P, Oberhelman R, Zimic M. Low-cost 3D-printed inverted microscope to detect

- Mycobacterium tuberculosis* in a MODS culture. *Tuberculosis (Edinb)*. 2022;102:158.
14. Wu Y, Ozcan A. Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring. *Methods*. 2018 ;136: p. 4-16.
 15. Serabyn E, Liewer K, Lindensmith C, Wallace K, Nadeau J. Compact, lensless digital holographic microscope for remote microbiology. *Opt Express*. 2016; p. 28540-28548.
 16. Paquin P, Durmort C, Paulus C, Vernet T, Marcoux PR, Morales S. Spatio-temporal based deep learning for rapid detection and identification of bacterial colonies through lens-free microscopy time-lapses. *PLOS Digit Health*. 2022 ;1(10): p. e0000122.
 17. Julián E, Roldán M, Sánchez-Chardi A, Astola O, Agustí G, Luquin M. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *J Bacteriol*. 2010 ;192(7): p.1751-60.
 18. Solis L, Coronel J, Rueda D, Gilman RH, Sheen P, Zimic M. Evaluation of a lens-free imager to facilitate tuberculosis diagnostics in MODS. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016; 97: p. 26-32.
 19. Allier C, Morel S, Vincent R, Ghenim L, Navarro F, Menneteau M, Bordy T, Hervé L, Cioni O, Gidrol X, Usson Y, Dinten JM. Imaging of dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy. *Cytometry A*. 2017; 91(5): p. 433-442.

XI. ANEXOS

XI.1. ANEXO 1. Artículo 1

[Downloaded free from <http://www.ijmyco.org> on Tuesday, March 19, 2019, IP: 161.132.207.45]

Original Article

Evaluation of Microbiological Variants of Sputum Processing and Concentration of Mycobacteria to Optimize the Microscopic and Imaging Diagnosis of Tuberculosis

Jorge E. Coronel¹, Christian C. Del Carpio², Erwin J. Dianderas², Edgar A. Florentini¹, Guillermo L. Kemper², Patricia Sheen¹, Mirko J. Zimic¹

¹Laboratorio de Bioinformática Y Biología Molecular, Faculty of Science, Universidad Peruana Cayetano Heredia,

²INICTEL Institute, Universidad Nacional De Ingeniería, Lima, Perú

Abstract

Background: Direct sputum smear is still the first-choice tool for screening of tuberculosis worldwide. Variants of this technique, to improve the sensitivity are desired. **Methods:** Two microbiological variants of the standard sputum smear ("pellet" and "diluted-pellet") for both Ziehl-Neelsen (ZN) and auramine fluorescence (AF) staining were evaluated. In addition, two methods for concentration of mycobacteria in sputum, using positive and negative pressure filtration, were tested and compared. The evaluation of the microbiological variants was performed on 98 culture positive sputum samples from different TB patients. The diagnostics sensitivity and the level of detritus in the processed sputum were determined. Bacilli load in the smear variants was determined by microscopic observation and by manual inspection of microscopic digital images. The comparison of the mycobacteria filtration methods was performed on 76 smear positive sputum samples. Filters retaining the concentrated mycobacteria were stained with AF and compared with the direct smear. Bacilli load, detritus level, filtered volume, filtration time and background noise level, were determined. **Results:** The sensitivity of microscopy with the microbiological variants was 7.1% and 2% higher in ZN and AF respectively, compared to direct smear. The sensitivity of AF in diluted pellet was significantly higher than all ZN variants ($P < 0.05$). Detritus level observed in slides was significantly lower in the diluted pellet than the pellet and direct smear in ZN and AF ($P < 0.001$). A significant increase in the bacilli load in microscopic observation and digital images analysis was observed in pellet and diluted pellet than the direct method ($P < 0.0001$). The concentration of mycobacteria using positive-pressure filtration showed a trend to produce a higher bacilli load compared to the negative-pressure filtration and direct smear, although it was not significant. Detritus levels were significantly higher in both variants of filtration ($P < 0.0001$). Filtered volumes were higher in positive-pressure compared to negative-pressure filtration. Filtration times were significantly higher in negative-pressure compared to positive-pressure filtration ($P < 0.0001$). **Conclusion:** The proposed variants improved the performance of the standard sputum smear, making it an important test for settings with high rates of smear-negative TB cases.

Keywords: Concentration, filtration, sensitivity, smear, sputum, tuberculosis

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis (MTB) active infection presents a formidable public health challenge despite being a preventable and curable disease, with now more deaths per year than HIV.^[1] The HIV/AIDS pandemic and the emergence of drug-resistance, have precipitated the resurgence of tuberculosis (TB), more severely affecting the developing countries.^[2] On average, one-third of the world population is infected with latent TB; therefore, the screening of active TB cases should be as efficient as possible. Given that TB mostly affects the resource-stricken communities of developing countries, the screening should also consider a simple and affordable methodology.

The gold standard methods for TB diagnostics are primary culture-based. The slow generational time of around 24 h of MTB,^[3] requires for an average of 2–4 weeks for colonies to appear in solid media^[4] or 7–10 days in liquid media culture.^[4] Even though many laboratories are adopting rapid diagnostic

Address for correspondence: Dr. Mirko J. Zimic, Faculty of Science, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, SMP Lima 15102, Peru. E-mail: mirko.zimic@upch.pe

ORCID:
<https://orcid.org/0000-0002-7203-8847>

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 license, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

How to cite this article: Coronel JE, Del Carpio CC, Dianderas EJ, Florentini EA, Kemper GL, Sheen P, et al. Evaluation of microbiological variants of sputum processing and concentration of mycobacteria to optimize the microscopic and imaging diagnosis of tuberculosis. *Int J Mycobacteriol* 2019;8:75-82.

Access this article online	
Quick Response Code: 	Website: www.ijmyco.org
	DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_172_18

technologies with automated cultures (i.e., MGIT 960) or molecular tests (i.e., GeneXpert and Genotyping MTBDR Plus), low-resource settings in developing countries with high prevalence of the disease have limited the access to these technologies. Therefore, the lengthy duration of the cultures and the relatively high cost of molecular tests make them prohibitive in these settings.

Currently, the direct sputum smear microscopy is the first-choice screening method and has become the indisputable pillar of active TB detection in the developing world. The Ziehl-Neelsen (ZN) staining method is a simple, rapid, and low-cost assay, that is, the first-screening tool worldwide.^[5] Despite its advantages, ZN is not very sensitive (30%–70%) in comparison with culture, especially in sputum samples with low-bacterial load commonly found in pediatric and HIV-positive populations.

A sputum sample requires 10^4 – 10^5 bacilli per milliliter to be ZN smear positive, which is the reason for its low sensitivity. Comparably, the auramine-fluorescence (AF) smear microscopy has a higher sensitivity (40%–80%) and consumes less time, since it allows for $\times 400$ magnification microscopy inspection, which reduces to 2–3 min the reading time, compared to the 10–15 min in ZN inspected at $\times 1000$ magnification. The recent development of inexpensive, robust, and prolonged lifespan fluorescence microscopes based on the light-emitting diodes motivated the WHO to recommend the auramine smear microscopy as an alternative to ZN.^[6,7] The high workload in TB endemic countries leads to technical fatigue, which reduces the accuracy of microscopy inspection.^[8] Therefore, it is important to improve the sensitivity of staining methods and try to make them automatic.

In recent studies, microbiological variants of conventional smear microscopy have been proposed to detect the minimal amounts of mycobacteria in sputum, increasing significantly the sensitivity. Added steps, including the centrifugation and treatment of sputum with alkaline chemicals such as NaOH and bleach to liquefy, clarify, and concentrate the sputum samples, have revealed an improved detection of bacilli.

In a systematic review, it was shown that centrifugation with the alkaline treatment of sputum is more sensitive than the direct smear, without a compromise of specificity.^[9]

Otherwise, the majority of studies of studies compare the different alternative methods of sputum concentration at a categorical level that is not very precise to evaluate more precisely the effect of the bacilli load.

The detritus, defined as the sputum solid material that can disturb the recognition of the bacilli in ZN or AF, and therefore, influence the result, is not considered either. The reduction of detritus in the ZN and AF slides could improve the smear microscope image quality, and therefore, would considerably favor the development of more accurate algorithms of pattern recognition and automation of smear reading and interpretation.

Low amounts of mycobacteria in a positive sample will increment the chance of a false-negative result, and for

this reason, the bacilli concentration techniques have been proposed. A novel alternative method of concentration was developed by the filtration of sputum samples using polycarbonate membranes (25 mm in diameter and 1 μ m pore). After filtering, the membranes were fixed on a sheet to be held and microscopically observed. This variant was able to increase the sensitivity to 80.2% using fluorescence microscopy.^[10]

Subsequent evaluations using a negative-pressure filter system with 13-mm diameter filters, showed a significant increase of sensitivity of 89% compared to the direct method (56%) and concentrated by centrifugation (60%).^[11]

Quincó *et al* described a sputum filtration system that was able to significantly increase the sensitivity from 47.6% (using centrifugation) to 61.9% (using filtration) when tested in HIV-positive patients.^[12] Controversially, the recent studies showed that the negative-pressure filtration (48.5% sensitivity) showed poor performance compared to the direct smear (60.9% sensitivity) in HIV-positive patients.^[13,14]

In this study, we evaluated two main variants for the sputum smear: (1) The introduction of two steps in the microbiological processing of the sputum, and (2) the introduction of a step to concentrate the mycobacteria by sputum filtration (testing and comparing a positive-pressure and a negative-pressure filtration method).

METHODS

Study design

The study design comprised a total of 214 sputum samples from patients with active TB. In the first part of the study we estimate and compare the sensitivity and level of detritus present in the smear, of the two microbiological variants of sputum processing against direct smear, using ZN and AF staining in 98 samples. Bacilli load was measured for microscopic observation and digital image analysis in 31 and 40 samples respectively.

In the second part of the study we evaluated two methods of sputum filtration for enhancing microscopy screening by the concentration of bacilli, in 76 samples. These methods consisted in negative-pressure and positive-pressure filtration. For this, we built and evaluated two mechatronic devices that were compared. Comparisons between the sputum filtration and the standard direct smear, included bacilli load, detritus level observed, filtered volume, filtration time, and background level [Figure 1].

Patients and sputum samples

A total of 214 TB patients were enrolled in the TB Reference Laboratory located at the Dirección de Salud del Callao (DIRESA Callao) after the ethical approval from both Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) and DIRESA Callao. Surplus samples from active TB-suspected patients obtained from routine processing with previous smear microscopy readings were reassigned to new codes for this study. All the procedures were performed at UPCH in a level-3 biosafety laboratory.

Microbiological variants for the treatment of sputum

Smears preparation

For this analysis, 98 sputum samples were processed. Two direct smears were prepared from each sample (approximately 40 μ L on each slide) in an area of approximately 1×2 cm². The volume remaining of each sample was processed using two microbiological variants:

1. Pellet – 2 mL of sputum was collected in a 15 mL Falcon tube and 2 mL of decontaminating solution using the standard method of NaOH–Sodium Citrate-N-acetyl-L-cysteine (NALC) was added. The sample was mixed with a vortex for 20 s and then was left to rest for 15 min. After that, 10 mL of phosphate buffer pH 6.8 was added to neutralize the alkaline conditions and centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min. Supernatants were discarded, and the sediment resuspended with phosphate buffer pH 6.8 up to 0.5 mL with to equilibrate the volumes of all samples. With this sample, two smears were prepared
2. Diluted-pellet – The remaining sediment to the previous step was resuspended in 2 mL of liquid culture medium 7H9-OADC-PANTA. From this resuspension, two smears were prepared.

The remaining volume was used to confirm active TB infection by the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay.^[15] The six slides obtained from each sample (direct, pellet, and diluted-pellet) were stained through ZN and AF methods.

Digital images

For the analysis of digital images from smears, 40 samples were prepared in a similar way to that indicated above. Digital images were captured from all the stained slides through ZN and AF methods (4-5 images for slide) using a MiniVID USB 5Mp digital camera (LW Scientific) attached to the eyepiece of a Primo star Carl Zeiss microscope.

Determination of detritus levels

For each slide, we read 100 microscopic fields for ZN, and 40 microscopic fields for AF stained slides. We used $\times 1000$ and $\times 400$ microscopic magnification for ZN and AF staining, respectively. The observed detritus level was manually categorized as scarce, medium, and abundant, by an expert technician in smears interpretation [Figure 2].

Determination of the bacillary load

The bacillary load in the stained slides was estimated as the total number of bacilli observed in the total surface of the smear previously categorized as paucibacillary and 1+ in direct smear. In ZN, the reading was made in 100 microscopic fields at $\times 1000$ of total magnification, and in AF, in 40 microscopic fields at $\times 400$ of total magnification. Each image was manually examined by the same technician, and the total number of bacilli was counted.

Filtration systems for the treatment of sputum

Semi-automated prototypes of sputum filtration

Two mechatronic prototypes were designed for the semi-automatic concentration of sputum samples using positive [Figure 3] and negative pressure [Figure 4], respectively. These

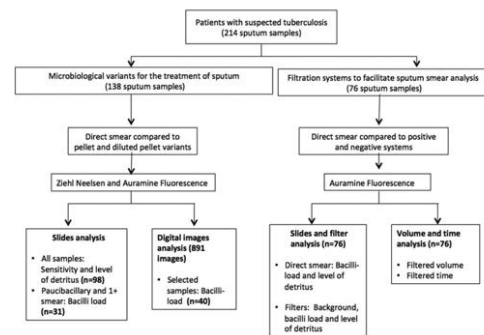


Figure 1: Flow diagram of procedures to evaluate the microbiological variants and filter systems for sputum samples

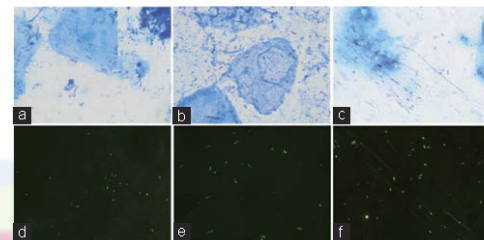


Figure 2: Representative microscopic images of the detritus according to the microbiological variant process. ZN: direct smear (medium) (a), pellet (medium) (b), and diluted pellet (scarce) (c). AF: direct smear (scarce) (d), pellet (scarce) (e), and diluted pellet (scarce) (f). The images were taken at a magnification of $\times 1000$ for Ziehl-Neelsen and $\times 400$ for AF

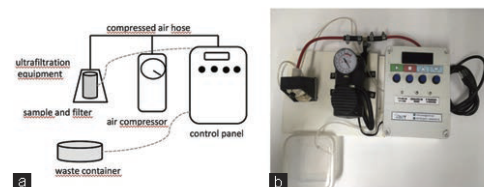


Figure 3: A schematic diagram of the positive pressure system (a) and a photo of the entire system (b)

systems incorporated regulated pressure, filtration time control, and a fluid sensor capable of detecting falling droplets, with which it determines if the filtration process is completed or if the filter is stacked. These systems used polycarbonate filters, which after completed the filtration of the total sputum sample, are stained with AF and observed by the fluorescent microscopy.

Sample processing

A pilot test was conducted to determine the optimal concentration of NALC and bleach to dissolve the sputum

and facilitate the rate of filtering. We used a variation of the protocol proposed by Fennelly *et al.*^[11] For this, a total of 76 sputum samples were processed. Briefly, a drop of the original sample (approximately 40 µL) was spread directly on a slide for staining and conventional microscopic evaluation with AF. Then, 600 µL of the excess sputum was added to a 50 mL Falcon tube and 2.4 mL of NALC solution (10 mg/mL) was added. The tube was vortexed for 10s, followed by 5 min of sedimentation. Six mL of 7% bleach was added, mixed, and allowed to settle for 15 min. Distilled water was added to a total volume of 30 mL. The solution was manually prefiltered using a 30-µm pore nylon filter with a diameter of 25 mm (Millipore). A volume of 15 mL of the prefiltered solution was added to each filtration system that was previously equipped with a black polycarbonate filter of 0.8-µm pore and 25-mm diameter (Sterlitech). Finally, the filters of both systems were removed and placed with the help of tweezers on slides containing a drop of 2% albumin solution and allowed to dry. Then the slides containing the filters were stained with the AF method.

Microscopic evaluation of the slides and filters

The readings of the direct smears and the filters stained with AF were performed in a Primo star UV Carl Zeiss microscope at ×400 total magnification. The total number of bacilli found and the observed detritus in 40 microscopic fields (classified as scarce, regular, and high) were recorded. In addition, the background (observed in previous evaluations in some areas of stained filters) was recorded as scanty, regular or high.

Evaluation of filtration systems

Both systems were evaluated in parallel and simultaneously. The filtering volume in mL (approximately 15 mL per system) and the filtering time in seconds were recorded for each process (maximum time per system 600 s).

Statistical analysis

Quantitative comparison among subgroups was carried out according to the normality tests. Dependent samples were analyzed with the Friedman–Wilcoxon tests; independent samples with Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s *post hoc* tests. For categorical variables, Chi-squared and Fisher’s exact tests were applied.

RESULTS

Microbiological variants for the treatment of sputum

Smear sensitivity

A total of 98 samples, all of them positive to MODS culture were processed through the proposed microbiological variants. Slides readings are summarized in Table 1. Of the total of processed slides, 83 (84.7%), 90 (91.8%), and 90 (91.8%) were classified positive in ZN, whereas 92 (93.8%), 94 (95.9%), and 97 (99.0%) in AF using the direct, pellet, and diluted-pellet methods, respectively. Our results indicate that these microbiological variants when compared to direct smear increase the sensitivity of microscopy by 7.1% and 2% in ZN and AF, respectively. Compared to the direct smear with diluted pellet, the sensitivity in AF increases in 5%. Global Chi-square test (for all six categories) showed heterogeneity and *post hoc* pairwise Fisher exact tests indicated that AF diluted pellet smear sensitivity was statistically significant higher than every ZN stain ($P = 0.0003, 0.0348, 0.0348$, respectively) although similar to AF direct and AF pellet methods ($P = 0.1183, P = 0.365$).

Determination of the bacillary load

In paucibacillary and +1 smear samples both for ZN and AF, bacilli counts were determined. In samples where 2+ and 3+ were found in all the proposed microbiological variants were not considered. [Table 2]. For ZN, Friedman–Wilcoxon signed

Table 1: Microscopy acid-fast bacillus readings of microbiological variants of microscopic observation drug susceptibility assay - culture-positive sputum samples

	ZN stain			AF stain		
	Direct	Pellet	Diluted pellet	Direct	Pellet	Diluted pellet
Paucibacillary	16	9	18	16	15	17
+	15	18	13	15	13	15
++	23	23	27	33	27	36
+++	29	40	32	28	39	29
No AFBs	15	8	8	6	4	1
Sensitivitysm (%)	83/98 (84.7)	90/98 (91.8)	90/98 (91.8)	92/98 (93.8)	94/98 (95.9)	97/98 (99.0)
Total	98	98	98	98	98	98

*The subtotal which comprises paucibacillary, +, ++, and +++. AFBs: Acid-fast bacillus, ZN: Ziehl-Neelsen, AF: Auramine fluorescence

Table 2: Bacilli load for microbiological variants in paucibacillary and 1+ smear

Microbiological variants	n	Direct, median (IQR)	Pellet, median (IQR)	Diluted pellet, median (IQR)	P
ZN bacilli	49	6.0 (0.0-40.0) ^a	28.0 (5.5-100.0) ^b	11.0 (4.0-99.5) ^b	0.0001
AF bacilli	44	8.5 (2.0-28.8)	14.0 (2.3-42.5)	14.0 (3.3-62.5)	0.0299

^arepresent significantly different subgroups according to the Wilcoxon signed-rank test. ZN: Ziehl-Neelsen, AF: Auramine fluorescence, IQR: Interquartile range

rank *post hoc* tests showed the significant superiority of both diluted-pellet and pellet against direct smear ($P = 0.0001$); in AF, diluted-pellet was superior to direct smear ($P = 0.008$).

Determination of detritus levels

Figure 2 shows the representative results of the microbiological variants detritus by ZN and AF. The level of detritus in the ZN and AF slides are presented in Figures 5 and 6, respectively. For ZN, Kruskal–Wallis and Dunn’s *post hoc* tests showed significant differences in the distribution of detritus as well, with both the direct and pellet methods showing more detritus than the diluted pellet method ($P < 0.001$). Numerically speaking, detritus levels with the highest number of cases were distributed in the following manner: in the direct group, 44.9% of samples were classified as scarce and also 44.9% as a medium; in the pellet group, 51% of samples as a medium; in the diluted-pellet, 86.5% as scarce. For AF, these tests showed significant differences in the distribution of detritus, with the pellet method having more detritus than both the direct and diluted pellet ones ($P < 0.001$). The most numerically prevalent classification was “scarce” for all subgroups (direct: 74.7%, pellet: 39%, and diluted-pellet: 71%).

Digital images

A total of 891 images were obtained from the 40 samples processed, of them, 114,117,114 were images in ZN while 183, 180, and 183 in AF using direct, pellet, and diluted-pellet methods, respectively. While in the images observed in ZN [Figure 7] both the pellet and the diluted pellet showed higher counts than the direct method ($P < 0.0001$) by Kruskal–Wallis

and Dunn’s *post hoc* tests. In AF [Figure 8], the pellet method had higher counts than direct smear and diluted pellet ($P < 0.0001$).

Filtration systems for the treatment of sputum

Determination of the bacillary load

Despite the arithmetic superiority of positive pressure filtered samples, Kruskal–Wallis test showed similarity among direct smear (median: 50, interquartile range [IQR]: 4.3–141.5) positive (median: 105.5, IQR: 11.25–320) and negative pressure systems (median: 50, IQR: 4.3–141.5) ($P = 0.2033$).

Detritus level

Figure 9a-c shows the representative images of the level of detritus. Kruskal–Wallis followed by Dunn’s *post hoc* tests showed that detritus levels were significantly higher for both when using positive ($P < 0.0001$) and negative ($P < 0.05$) pressures compared with the direct smear. Positive and negative pressures showed a similar distribution of detritus ($P > 0.05$) [Figure 10]. Numerically speaking, detritus levels with the highest number of cases occurred in the following manner: 92.1% of direct samples

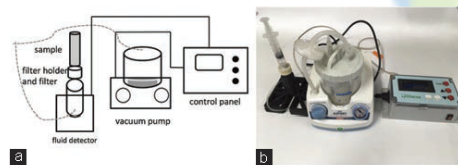


Figure 4: A schematic diagram of the negative pressure system (a) and a photo of the entire system (b)

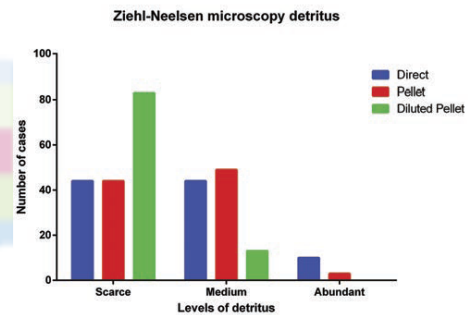


Figure 5: Ziehl–Neelsen microscopy detritus observed in all microbiological variants. Columns represent the number of cases for every level of detritus

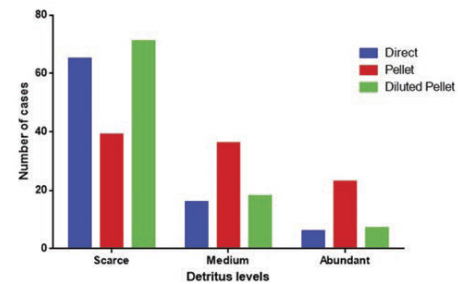


Figure 6: Auramine microscopy detritus observed in all microbiological variants. Columns represent the number of cases for every level of detritus

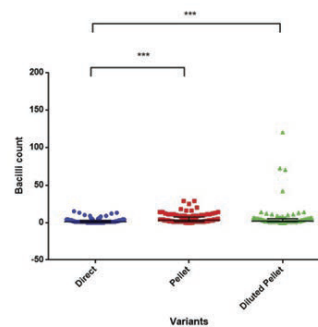


Figure 7: Ziehl–Neelsen staining photographs were assessed by eye and bacilli counts quantified for all variants *** $P < 0.001$

were classified as scarce, 56.6% of positive pressure as scarce, and 73.7% of negative pressure samples as scarce.

Background

Figure 9d-f shows the representative images of the level of background. Regarding the observed background of filtered samples, the positive system (median 2.0 [1.0–2.0]) presented significantly higher background than the negative system (median 1.0 [1.0–2.0]) ($P = 0.0033$).

Filtered volume

Nonparametric Mann–Whitney test showed that positive pressure resulted in significantly ($P < 0.0001$) higher volumes (median: 15 mL, IQR: 15.0 – 15.0) when compared with negative pressure (median: 9.5 mL, IQR: 7.8 – 13.5) [Figure 11].

Filtration time

Nonparametric Mann–Whitney test showed that positive pressure resulted in significantly ($P < 0.0001$) faster filtration times (median 75 s, IQR 25.75–345.0) when compared with negative pressure (median 600.0 s, IQR 600.0–600.0) [Figure 12].

DISCUSSION

Direct smear will continue its role as a key tool for TB diagnosis, and under this paradigm, technical improvements are required to convert it into a more accurate test for diagnosis of TB cases. In this study, two-microbiological variants have been compared along with direct smears. Both through direct microscopical observation and analysis of digital images; and in a separated set of samples, mycobacteria concentration by filtration of processed sputum using two variants of pressured prototypes. Our results confirm that bacilli count for both the described microbiological variants using microscopic observation and digital images were significantly higher in ZN and AF compared the direct smear, increasing significantly the sensitivity in 7.1% and 2% for ZN and AF, respectively, which is in the range of improvements of similar studies.^[7,16,17]

Previous studies did not, to our knowledge, compare the sensitivity of of the “pellet” and the “diluted-pellet” microbiological variants of sputum processing, regarding the performance of the direct smear. It is important to highlight that the proposed microbiological variants are

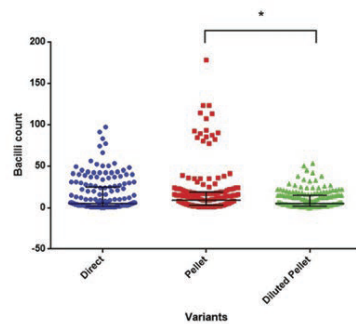


Figure 8: Auramine staining photographs were assessed by eye and bacilli counts quantified for all variants * $P < 0.05$

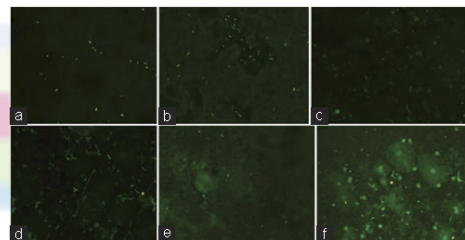


Figure 9: Detritus in representative positive and negative-filter images: scanty (a), regular (b), and high (c). Background in representative positive- and negative-pressure system images: scanty (d), regular (e), and high (f)

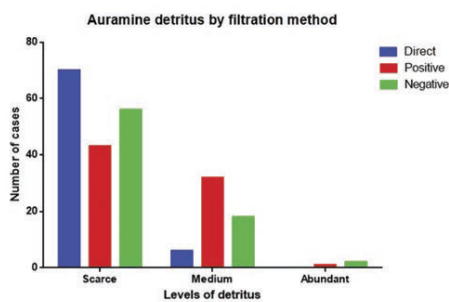


Figure 10: Detritus level in a positive-pressure system compared to a negative-pressure system ($P < 0.0001$)

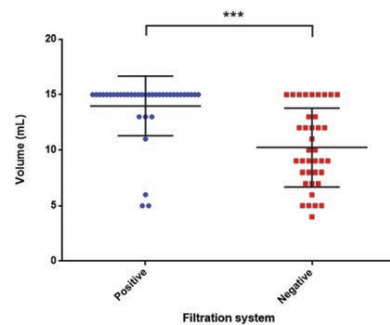


Figure 11: Filtered volume in a positive-pressure system compared to a negative-pressure system ($P < 0.0001$)

Coronel, *et al.*: Sputum processing variants to increase MTB sensitivity

is important to seek to reduce these events and for that further studies are needed to better liquefy sputum samples, without the introduction of too complex steps.

The cost of sputum filtration systems is relatively inexpensive, with the potential to be further reduced in the face of a mass production scenario. This is important to take into account, given the possibility of extending its use in a massive manner accompanied by a system or algorithms that identify the mycobacteria present.

CONCLUSION

The proposed variants increased the sensitivity, reduced debris and cleared the background of the sputum smear, facilitating and improving TB diagnostics, with a potential impact in areas with high rates of smear-negative cases.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge Jose Osada and DIACSA, as well as Jose Oliden and ARIOT, who built the prototypes of the filtering systems for negative and positive pressure, respectively, based on the plans and diagrams we provided.

Financial support and sponsorship

We acknowledge financial support from Círculos de Investigación 1473-2014-C1 CONCYTEC and the Wellcome Trust Intermediate Fellowship (grant 099805/Z/12/Z).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva: World Health Organization; 2018. Available from: <http://www.apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf>. [Last accessed on 2018 Dec 15].
2. Sohail M. Tuberculosis: A re-emerging enemy. *J Mol Genet Med* 2006;2:87-8.
3. Cook GM, Bemei M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, *et al.* Physiology of mycobacteria. *Adv Microb Physiol* 2009;55:81-182, 318-9.
4. Ghodbane R, Raoult D, Drancourt M. Dramatic reduction of culture time of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 2014;4:4236.
5. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970;51:196-206.
6. Xia H, Song YY, Zhao B, Kam KM, O'Brien RJ, Zhang ZY, *et al.* Multicentre evaluation of Ziehl-Neelsen and light-emitting diode fluorescence microscopy in China. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013;17:107-12.
7. Hooja S, Pal N, Malhotra B, Goyal S, Kumar V, Vyas L. Comparison of Ziehl Neelsen and Auramine O staining methods on direct and concentrated smears in clinical specimens. *Indian J Tuberc* 2011;58:72-6.
8. World Health Organization. Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. Geneva: World Health Organization; 2010. Available from: https://www.who.int/tb/laboratory/whopolicyframework_july10_revnov10.pdf. [Last accessed on 2018 Dec 15].
9. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, *et al.* Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006;6:664-74.
10. Smithwick RW, Stratigos CB. Acid-fast microscopy on polycarbonate membrane filter sputum sediments. *J Clin Microbiol* 1981;13:1109-13.
11. Fennelly KP, Morais CG, Hadad DJ, Vinhas S, Dietze R, Palaci M, *et al.* The small membrane filter method of microscopy to diagnose pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2012;50:2096-9.
12. Quincó P, Böhler-Sékula S, Brandão W, Monte R, Souza SL, Saraceni V, *et al.* Increased sensitivity in the diagnosis of tuberculosis in HIV-positive patients through the small-membrane-filter method of microscopy. *J Clin Microbiol* 2013;51:2921-5.
13. Boum Y 2nd, Kim S, Orikiriza P, Acuña-Villaorduña C, Vinhas S, Bonnet M, *et al.* Diagnostic accuracy of the small membrane filtration method for diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high-HIV-prevalence setting. *J Clin Microbiol* 2016;54:1520-7.
14. Jones-López E, Manabe YC, Palaci M, Kayiza C, Armstrong D, Nakiyingi L, *et al.* Prospective cross-sectional evaluation of the small membrane filtration method for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2014;52:2513-20.
15. UPCH. MODS A User Guide. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2008. Available from: http://www.modsperu.org/MODS_user_guide.pdf. [Last accessed on 2018 Dec 15].
16. Angeby KA, Alvarado-Gálvez C, Pineda-García L, Hoffner SE. Improved sputum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:684-7.
17. Uddin MK, Chowdhury MR, Ahmed S, Rahman MT, Khatun R, van Leth F, *et al.* Comparison of direct versus concentrated smear microscopy in detection of pulmonary tuberculosis. *BMC Res Notes* 2013;6:291.
18. Del Carpio C, Dianderas E, Zimic M, Sheen P, Coronel J, Fuentes P, *et al.* Computer Algorithm for Detection of Tuberculosis Bacilli in Ziehl Nelsen Sputum Smear Images Based on the Adjustment of RGB Primary Component Tones and Geometric Eccentricity. Proceedings of The 21st World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics (WMSCI 2017); 2017. Available from: <http://www.iis.org/CDs2017/CD2017Summer/papers/SA505WN.pdf>. [Last accessed on 2018 Dec 15].
19. Chew R, Calderón C, Schumacher SG, Sherman JM, Caviedes L, Fuentes P, *et al.* Evaluation of bleach-sedimentation for sterilising and concentrating *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. *BMC Infect Dis* 2011;11:269.

RESEARCH

Open Access



Evaluation of the broth microdilution plate methodology for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru

Zully M. Puyén^{1,2*}, David Santos-Lázaro¹, Aiko N. Vigo¹, Jorge Coronel³, Miriam J. Alarcón¹, Vidia V. Cotrina¹ and David A. J. Moore^{3,4}

Abstract

Background: Tuberculosis (TB) is a communicable, preventable and curable disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Peru is amongst the 30 countries with the highest burden of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) worldwide. In the fight against drug-resistant tuberculosis, the UKMYC6 microdilution plate was developed and validated by the CRyPTIC project. The objective of the study was to evaluate the use of the broth microdilution (BMD) plate methodology for susceptibility testing of drug-resistant MTB strains in Peru.

Methods: MTB strains isolated between 2015 and 2018 in Peru were used. 496 nationally-representative strains determined as drug-resistant by the routine 7H10 Agar Proportion Method (APM) were included in the present study. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 13 antituberculosis drugs were determined for each strain using the UKMYC6 microdilution plates. Diagnostic agreement between APM and BMD plate methodology was determined for rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide, kanamycin and levofloxacin. Phenotypes were set using binary (or ternary) classification based on Epidemiological cut-off values (ECOFF/ECV) proposed by the CRyPTIC project. Whole Genome Sequencing (WGS) was performed on strains with discrepant results between both methods.

Results: MIC distributions were determined for 13 first- and second-line anti-TB drugs, including new (bedaquiline, delamanid) and repurposed (clofazimine, linezolid) agents. MIC results were available for 80% (397/496) of the strains at 14 days and the remainder at 21 days. The comparative analysis determined a good agreement ($0.64 \leq k \leq 0.79$) for the drugs rifampicin, ethambutol, ethionamide and kanamycin, and the best agreement ($k > 0.8$) for isoniazid and levofloxacin. Overall, 12% of MIC values were above the UKMYC6 plate dilution ranges, most notably for the drugs rifampicin and rifabutin. No strain presented MICs higher than the ECOFF/ECV values for the new or repurposed drugs. Discrepant analysis using genotypic susceptibility testing by WGS supported half of the results obtained by APM (52%, 93/179) and half of those obtained by BMD plate methodology (48%, 86/179).

Conclusions: The BMD methodology using the UKMYC6 plate allows the complete susceptibility characterization, through the determination of MICs, of drug-resistant MTB strains in Peru. This methodology shows good diagnostic performances for rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide, kanamycin and levofloxacin. It also allows for the characterization of MICs for other drugs used in previous years against tuberculosis, as well as for new and repurposed drugs recently introduced worldwide.

*Correspondence: zpuyeng@gmail.com

¹ Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug susceptibility testing, Drug resistance, Antimicrobial agents, Minimum inhibitory concentration, Broth microdilution

Background

Tuberculosis (TB) is a communicable, preventable and curable disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). It is the 13th leading cause of death and the second leading infectious killer after COVID-19 (ranking above HIV/AIDS) [1]. It is estimated that in 2019, TB was diagnosed in 10 million (range 8.9–11 million) people and 1.4 million died worldwide from this disease [2]. The problem of managing and eliminating TB is further exacerbated by the presence of drug-resistant TB, a major public health problem that threatens progress made in TB care and control worldwide [3]. In 2019, about half a million people developed rifampicin-resistant TB, of which 78% were multidrug-resistant TB (MDR-TB) [2]. Also, in 2018 it was estimated that 6.2% of MDR-TB cases were extensively drug-resistant TB (XDR-TB) [3].

Peru has 14% of the estimated cases of tuberculosis in the Region of the Americas, with 27,000 new cases of active disease and 17,000 new cases of smear-positive pulmonary TB each year. In addition, it is one of the 30 countries in the world with the highest burden of MDR-TB [3]. TB and MDR-TB are distributed in the 24 Departments of Peru; however, the department of Lima (capital of Peru) and the constitutional province of Callao account for 61% of TB cases and 78% of MDR-TB and XDR-TB cases [4].

Different methodologies have been implemented over the years in Peru for the evaluation of resistance to the drugs used in the treatment of tuberculosis. Since 2004 the gold standard method at the National Mycobacterial Reference Laboratory for *Mycobacterium tuberculosis* complex susceptibility testing has been the 1% indirect 7H10 Agar Proportion Method (APM), which is laborious and requires 2–3 weeks from strain inoculation for results to become available [5].

The CRyPTIC (Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis: An International Consortium) research project has validated the UKMYC6 broth microdilution (BMD) plate to provide the simultaneous evaluation of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of several anti-tuberculosis drugs from a single clinical isolate of MTB. UKMYC6 plate is a variant of the original MYCOTB plate [6, 7] and contains 13 different anti-TB drugs, including two repurposed (linezolid and clofazimine) and two new (bedaquiline and delamanid) compounds [8]. The original MYCOTB microdilution plate showed good results of categorical agreement (92–100%)

for the determination of susceptibility to the conventional first- and second-line drugs [6, 7] evaluated by the APM; however, it was only with the development of the UKMYC5 plate that the incorporation of new and repurposed drugs was achieved [8]. During preliminary evaluation of this plate the drug para-aminosalicylic acid was eliminated and concentration ranges for the remaining drugs were optimized, giving rise to the UKMYC6 plate. In this way, the UKMYC6 microdilution plate provides quantitative MIC values and thus a higher resolution understanding of drug resistance, potentially facilitating improved, individualized treatment for each patient.

The objective of this study was to take advantage of the opportunity presented by the CRyPTIC study of genomic determinants of drug resistance to evaluate the performance of the BMD methodology using UKMYC6 plate for susceptibility testing of MTB strains to antituberculosis drugs in Peru when compared with the APM results. Furthermore, through selection of a nationally representative sample of MTB strains, the profile of TB drug MICs in drug-resistant strains nationally can be elucidated.

Methods

Design, settings and selection of MTB strains

The study was carried out by the National Reference Laboratory for Mycobacteria (LRNM [*Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias*]) of the National Institute of Health (INS [*Instituto Nacional de Salud*]) in collaboration with investigators at Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) and the London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM). Drug-resistant MTB strains (according to routine APM results), representative from all over Peru were selected. Strains were randomly selected by stratified sampling according to the local burden of MDR-TB in each one of the 24 departments (in addition to the constitutional province of Callao) of Peru, reported in the 2015–2018 period [4]. Each of the selected strains were previously isolated from samples of patients with pulmonary and/or extrapulmonary TB during the mentioned period. All strains had preliminary information on resistance profiles obtained by the routine APM and were obtained from the LRNM culture bank.

Routine susceptibility testing (APM testing)

The susceptibility tests were carried out under programmatic conditions by the LRNM in the period 2015–2018 using the APM. The procedures established by the

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [9] were followed and the phenotypic susceptibility was determined for the drugs rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide, kanamycin and levofloxacin, according to the critical concentrations (CC) recommended by the World Health Organization (WHO) at the date of testing (Table 1). Briefly, four quadrant Petri dishes containing Middlebrook 7H10 medium (Becton–Dickinson, Sparks, Md., USA) were used. MTB cultures on Lowenstein Jensen were transported to the LRNM from regional laboratories. The strains were sub-cultured in Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson, Sparks, USA) and incubated for 7 days at 37 °C. Subsequently, fresh broth cultures were standardized to a McFarland 0.5 turbidity scale. The standardized suspensions were diluted 10⁻² to allow the growth of countable colonies for interpretation. For each culture, the drug-containing quadrants, as well as the drug-free control quadrant, were inoculated with 100 µL of the diluted suspension. The plates were sealed in plastic bags and incubated at 37 °C for 21 days. The cultures were classified as resistant when the number of colonies developed in the drug quadrant was more than 1% of the number of colonies observed in the control quadrant, otherwise they were classified as susceptible.

Re-culture and susceptibility testing (BMD testing)

Drug susceptibility testing was performed using the UKMYC6 96-well microdilution plate format, designed by the CRyPTIC project (Thermo Fisher Inc., UK). The UKMYC6 plate allowed for the determination of susceptibility against 13 antituberculosis drugs composed of agents used in drug-susceptible TB treatment (rifampicin, rifabutin, isoniazid) as well as longer MDR-TB treatment corresponding to groups A (levofloxacin, moxifloxacin, bedaquiline, linezolid), B (clofazimine), C (ethambutol, delamanid, amikacin, ethionamide) and kanamycin (Table 1). Testing for each drug entailed between 5 and 10 concentrations obtained by serial doubling dilution (Additional file 1: Fig. S1). Previously cryopreserved strains were reactivated in 7H9 liquid medium, supplemented with “oleic acid albumin dextrose catalase” (OADC) (Thermo Fisher, Scientific Inc., USA), for 7 days at 37 °C. These were then subcultured in Middlebrook 7H10 media for 25–30 days at 37 °C. From the solid cultures in 7H10 medium, 0.5 McFarland scale suspensions were prepared in Tween saline with glass beads (Thermo Fisher, Scientific Inc., USA). Then, 100 µL of the suspension was diluted in a 7H9 broth tube supplemented with OADC to give an approximate inoculum of 1 × 10⁵ CFU/

Table 1 Drug concentrations values used for comparison between APM and BMD UKMYC6 plate methodology

Drug	APM CC (mg/L)	UKMYC6 ECOFF/ECV (mg/L)	UKMYC6 Borderline (mg/L)	UKMYC6 concentration ranges (mg/L)
Drugs used in drug-susceptible TB regimens				
Rifampicin	1.0	0.5	–	0.03–8
Rifabutin	–	0.12	–	0.06–2
Isoniazid	0.2	0.1	0.2, 0.4	0.025–12.8
Drugs used in MDR-TB regimens ^a				
Group A				
Moxifloxacin	–	1.0	–	0.06–4
Levofloxacin	1.0	1.0	–	0.125–8
Bedaquiline	–	0.25	–	0.008–1
Linezolid	–	1.0	–	0.06–4
Group B				
Clofazimine	–	0.25	–	0.03–2
Group C				
Ethambutol	5.0	4.0	4	0.25–32
Delamanid	–	0.12	–	0.008–0.5
Amikacin	–	1.0	–	0.25–16
Ethionamide	5.0	4.0	–	0.25–8
Additional				
Kanamycin	5.0	4.0	–	1–16

^a Groups A, B and C were set according to WHO update—2018 [10]

APM: 7H10 Agar Proportion Method, BMD: Broth Microdilution, CC: Critical Concentration, ECOFF/ECV: Epidemiological Cut-off Values

mL. Subsequently, using the automated Sensititre Autoinoculator[®]/AIM[®] equipment (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 100 μ L of inoculum was dispensed into each well of the UKMYC6 plate. The plates were sealed using clear plastic and incubated aerobically at 35–37 $^{\circ}$ C. The H37Rv ATCC 27294 strain was used to perform periodic quality control tests of the analyzed drugs, as well as to quality control for contamination and adequate growth in two positive control (drug-free) wells of each plate used. All laboratory work related to the culture of live bacteria was carried out in the biosafety level 3 facilities of the INS and UPCH.

Determination of MICs and susceptibilities

Plates were read using the semi-automated Vizion[™] instrument. The results of the plates were considered valid only when the positive control wells showed acceptable growth and free of contamination. The plates were read 14 days after inoculation, as established by the CRyPTIC project [8]. Additionally, in accordance with the Standard Operating Procedure (SOP), if the growth of the positive control was weak or insufficient, a second reading was carried out at 21 days. The Vizion[™] system captured and stored an image of the recorded MICs of each plate. The MIC of a drug was considered as the lowest concentration capable of inhibiting the visible growth of MTB in a given well. Based on the MICs, strains were categorized as susceptible, intermediate or resistant (ternary categorization) taking as reference the Epidemiologic Cut-off Values (ECOFF/ECV), as well as borderline concentrations (concentrations at which genetic mutations present different effects giving rise to mixed categories of susceptibility or resistance), established by the CRyPTIC project [11]. A result was determined as susceptible if the MIC was less than or equal to the established ECOFF/ECV; otherwise, it was defined as resistant. Isoniazid, ethambutol and ethionamide were categorized taking into account borderline concentrations (Additional file 1: Table S1).

DNA extraction and genomic sequencing

WGS was performed for all strains for the primary objective of the parent trial. For this study, genomic results were only used for discrepant analysis to resolve discordant results between the APM and BMD tests. DNA extraction and BMD test were performed starting from the same solid culture (7H10 culture) to minimize phenotypic and genotypic variation. Genomic DNA was isolated using the phenol–chloroform method (Additional file 1: Supplementary Method). Sequencing libraries were generated using the Nextera XT Library Preparation Kit, following the manufacturer's recommendations. WGS was performed at the University of

Oxford (UK) using the Illumina HiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Paired end 150 bp sequencing reads were generated and stored in fastq.gz files.

Bioinformatic analysis

The quality of the sequencing reads was evaluated using the FastQC v0.11.9 [12] program. The paired reads were filtered with the Trimmomatic v0.38 [13] program using default values and a minimum Phred score of 20. The filtered reads were mapped against the H37Rv reference genome (NC_000962.3) using BWA v0.7.17 [14]. The elimination of duplicate readings was carried out with the program Picardtools v2.18.25 [15]. The variant call was made using the GATK v4 [16] program. Resistance-associated genes were evaluated for genotypic resistance to rifampin (*rpoB*), isoniazid (*inhA*, *katG*, *ahpC*, *fabG1*, *kasA*), fluoroquinolones (*gyrA*, *gyrB*), and second-line injectables (*rrs*, *eis*, *tlyA*). The genetic variants found were validated using the list of mutations published by the WHO in the "Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance" [17]. Likewise, the resistance profiles were determined using the programs TBProfiler v3.0.4 [18] (database of mutations v. a2a234b) and Mykrobe v0.10 [19]. For each drug, the strains were classified as susceptible or resistant according to the absence or presence of mutations detected in the genes associated with resistance, respectively.

Statistical analysis

Descriptive analyses of the MICs obtained and development times were performed on the UKMYC6 plates. For the six drugs evaluated by both APM and BMD method, diagnostic performance indices (sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, categorical agreement and Cohen's Kappa coefficient) were determined by taking as reference values the results of the APM and comparing them to the susceptible/resistant categorization from the BMD method (results with borderline MICs were excluded from analysis). All the calculations were performed in the program R v4.0.5 [20] using the packages epiR v2.0.19 (<https://cran.r-project.org/web/packages/epiR>) and vcd v1.4 (<https://cran.r-project.org/web/packages/vcd>). To determine the strength of statistical agreement, the kappa (k) value was used and was graded as insignificant ($0 \leq k \leq 0.2$), medium ($0.2 < k \leq 0.4$), moderate ($0.4 < k \leq 0.6$), good ($0.6 < k \leq 0.8$) or almost perfect ($0.8 < k \leq 1$) according to the previously proposed classification [21].

Results

Samples

The study analysed 496 MTB drug-resistant strains of which 70% (347/496) were from Lima and Callao, while the rest came from the remaining 23 departments of Peru with a range of 1 to 18 strains per department (Additional file 1: Table S2).

Phenotypic resistance by APM

The percentages of strains with APM-defined phenotypic resistance included in the study for each one of the drugs were: 86% (427/496) resistant to rifampicin, 94% (464/496) to isoniazid, 45% (218/489) to ethambutol, 31% (155/493) to ethionamide, 11% (56/495) to kanamycin and 11% (54/486) to levofloxacin. In addition, according to the classification of drug resistance profile of the year 2020 [2], 5% (24/496) presented rifampicin mono-resistant TB (RR-TB), 12% (61/496) isoniazid mono-resistant (HR-TB), 76% (376/496) MDR-TB, with a further 5% (27/496) XDR-TB, and 2% (8/496) had different patterns of drug resistance.

MIC determination using UKMYC6 plate

The microbiological evaluation by the BMD system using the UKMYC6 plate determined that 80% (397/496) presented final growth readings at 14 days and 20% (99/496) at 21 days. Overall, 99% of the readings obtained for each of the drugs showed valid results (MICs inside and outside evaluated ranges). Of these, overall 12% of MIC readings were above the dilution range of the UKMYC6 plate, most frequently rifampicin (68%, 326/480) and rifabutin (46%, 229/494) (Additional file 1: Table S3).

Comparison between APM and BMD methodology

Comparative analysis was performed between the APM phenotypic test results and UKMYC6 MICs for 6 drugs: rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide, kanamycin and levofloxacin. The phenotypically susceptible or resistant strains by APM were graphed separately by means of histograms showing the MICs values obtained from the UKMYC6 plates (Fig. 1A). The drugs rifampicin, isoniazid, kanamycin, and levofloxacin showed visibly different MIC distributions for APM-susceptible and resistant strains. However, there was considerable overlap of the MIC distribution for strains defined as resistant and susceptible to ethambutol and ethionamide by APM (Fig. 1A; Additional file 1: Fig. S2). For the remaining drugs (rifabutin, amikacin, moxifloxacin, bedaquiline, delamanid, clofazimine, and linezolid) no reference drug susceptibility test (susceptible/resistant) assignment result was available so the MIC distributions for all strains were plotted together (Fig. 1B). The drugs

rifabutin, amikacin and moxifloxacin showed the presence of strains with high and low MICs values for which the use of ECOFF/ECVs established the presence of 68% (336/494), 6% (29/491) and 9% (43/495) prevalence of resistant strains, respectively. However, none of the strains presented MICs higher than the ECOFF/ECVs values for the new or repurposed drugs, so they were defined as phenotypically susceptible strains by the BMD plate methodology (Fig. 1B).

For isoniazid, ethambutol, and ethionamide borderline MICs were demonstrated in 16% (77/496), 25% (121/492), and 6% (32/495) of strains, respectively. In the case of isoniazid, all borderline MICs were determined in strains categorized as resistant by APM; while in the cases of ethambutol and ethionamide, borderline MICs were determined in both susceptible and resistant strains (Table 2).

Performance of the BMD plate methodology compared to APM for categorical susceptible/resistant determination

Using the UKMYC6 ECOFF/ECVs values to categorise strains as susceptible or resistant (excluding results with borderline MICs) and comparing these data with APM results available for the six drugs mentioned above resulted in an average categorical agreement of 0.93. The highest categorical concordances were obtained for rifampicin, isoniazid, kanamycin and levofloxacin. Using APM category as the reference, the sensitivity of BMD UKMYC6 plate for detection of drug resistance was highest for isoniazid (0.98) and rifampicin (0.93) and lowest for ethionamide (0.66) and kanamycin (0.68). Specificity was high for all drugs, from 0.91 for isoniazid to 1.0 for kanamycin (Table 3).

WGS used for the analysis of discordant results

Initially, 266 discordant results (present in 191 different strains) were identified for all six drugs tested by the BMD plate method and APM, which included 30 results for rifampicin, 9 for isoniazid, 117 for ethambutol, 83 for ethionamide, 17 for kanamycin, and 10 for levofloxacin (Additional file 1: Table S4). More than 75% (200/266) of the discordant cases were due to results for ethambutol and ethionamide. Subsequent analyses excluding borderline MIC results considerably reduced the number of discordant results. For ethambutol, 68 'BMD-susceptible/APM-resistant' results were excluded, of which 97% (66/68) presented mutations associated with resistance. In contrast, for ethionamide 19 'BMD-susceptible/APM-resistant' discordant results were excluded, of which 47% (9/19) presented mutations associated with resistance. No strain was excluded for the isoniazid results.

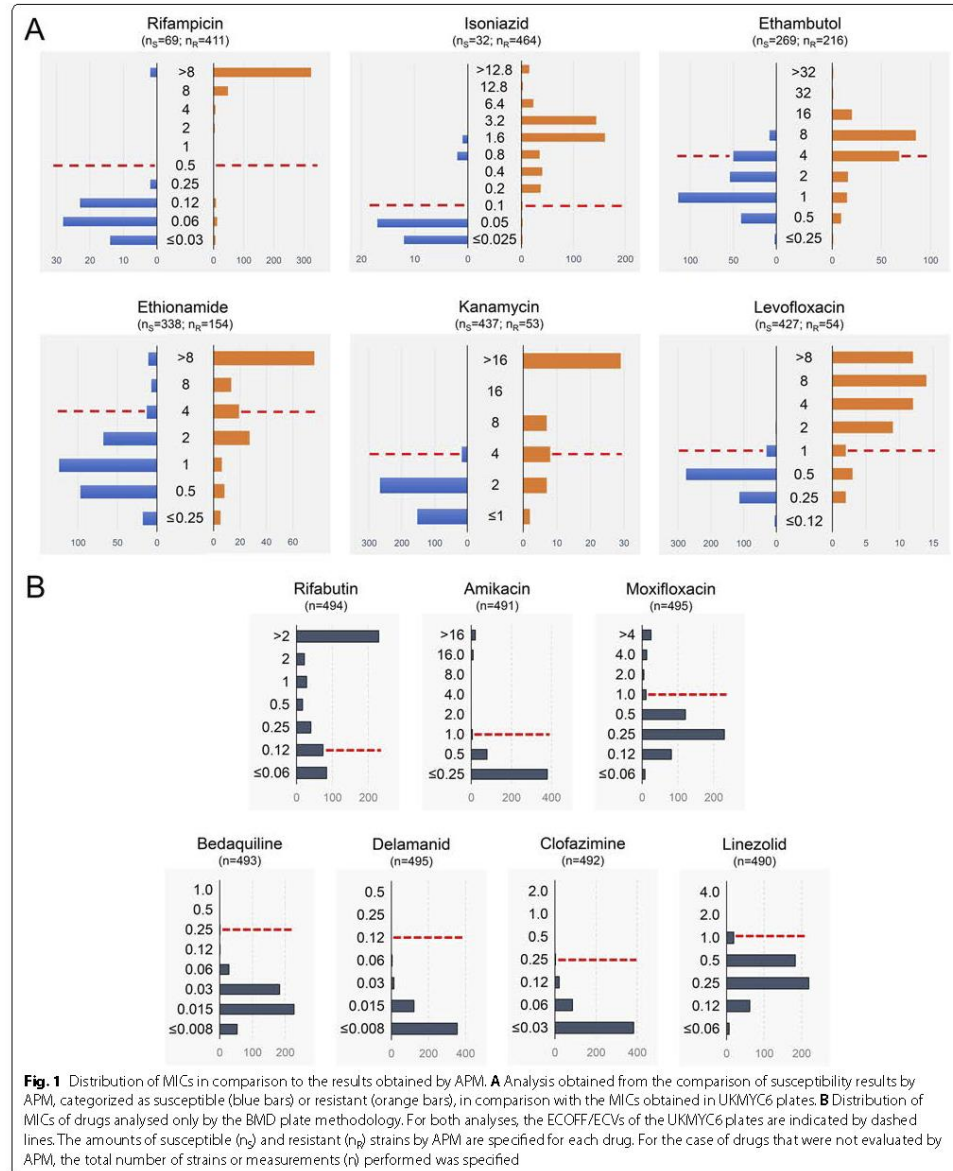


Table 2 Phenotypic characterization by APM of results with borderline MICs values

Drug	APM CC (mg/L)	Borderline MIC (mg/L)	APM			Total
			S	R	NA	
Isoniazid	0.2	0.2	0	37	0	77
		0.4	0	40	0	
Ethambutol	5	4	50	68	3	121
Ethionamide	5	4	13	19	0	32

APM: 7H10 Agar Proportion Method, CC: Critical Concentration, MIC: Minimum Inhibitory Concentration, R: Number of phenotypically resistant strains, S: Number of phenotypically susceptible strains, NA: Not Available

Table 3 Performance of BMD UKMYC6 plate methodology compared to APM for drug resistance determination

Drug		BMD		Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)	Categorical agreement	Cohen's kappa
		R	S						
Rifampicin	R	383	2	0.93 (0.90, 0.95)	0.97 (0.90, 1.00)	0.99 (0.98, 1.00)	0.71 (0.60, 0.79)	0.94	0.78
	S	28	67						
Isoniazid	R	381	3	0.98 (0.97, 0.99)	0.91 (0.75, 0.98)	0.99 (0.98, 1.00)	0.83 (0.66, 0.93)	0.98	0.85
	S	6	29						
Ethambutol	R	107	8	0.72 (0.64, 0.79)	0.96 (0.93, 0.98)	0.93 (0.87, 0.97)	0.84 (0.79, 0.88)	0.87	0.71
	S	41	211						
Ethionamide	R	89	18	0.66 (0.57, 0.74)	0.94 (0.91, 0.97)	0.83 (0.75, 0.90)	0.87 (0.83, 0.90)	0.86	0.64
	S	46	307						
Kanamycin	R	36	0	0.68 (0.54, 0.80)	1.00 (0.99, 1.00)	1.00 (0.90, 1.00)	0.96 (0.94, 0.98)	0.97	0.79
	S	17	437						
Levofloxacin	R	47	3	0.87 (0.75, 0.95)	0.99 (0.98, 1.00)	0.94 (0.83, 0.99)	0.98 (0.97, 0.99)	0.98	0.89
	S	7	424						

Results with borderline MICs were excluded from the analysis

APM: 7H10 Agar Proportion Method, BMD: Broth Microdilution, R: Number of phenotypically resistant strains, S: Number of phenotypically susceptible strains, PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value, 95% CI: 95% Confidence Interval

Finally, 179 discordant results were obtained (present in 122 different strains). There were no 'BMD-resistant/APM-susceptible' discrepancies for kanamycin but for all other agents there were discordant results in both directions. Ethambutol and ethionamide had the highest degrees of disagreement with 13% (49/367) and 14% (64/460), respectively. For most agents the results of genotypic susceptibility testing by WGS gave similar levels support to the results obtained by APM (52%, 93/179) and those obtained by the BMD system (48%, 86/179), with the exception of rifampicin, in which a greater support towards APM results was observed (Table 4).

Discussion

This is the first description of the comprehensive drug resistance profile, with MIC distribution of a nationally representative sample of drug-resistant strains of *M. tuberculosis* in Peru. Such analyses are of fundamental importance when considering the local design of standardized treatment regimens for MDR-TB [22]. The study

also provided the opportunity to compare indirect drug susceptibility testing (DST) by the proportion method on 7H10 agar against MIC testing using liquid culture by the BMD method.

Overall, there was no resistance to the new and repurposed drugs identified with no strains exceeding the ECOFF/ECV for bedaquiline, delamanid, clofazimine or linezolid. This results agree with previous studies in the Americas region [23] as well as in other contexts [24, 25]. This reflects the sparse usage of these agents within a compassionate use framework prior to their incorporation into national guidelines in 2018 [26] and indicates their introduction into a favourable environment from that timepoint onwards; comparison now with a similarly representative sample of contemporary TB-MDR strains would be instructive and important.

The BMD plate is a convenient tool for the analysis of MICs to any of the drugs used in the treatment of TB [6, 27, 28]. The methodology facilitates addition of new drugs and the range of MICs being tested can be adapted, if necessary, in certain settings [8]. The WHO-recommended

Table 4 Analysis of discordant results between APM and BMD UKMYC6 plate methodology

Drug	Total	APM	BMD	WGS		APM results supported by WGS (%)	BMD results supported by WGS (%)
				S	R		
Rifampicin	30	S	R	1	1	22 (73)	8 (27)
		R	S	7	21		
Isoniazid	9	S	R	2	1	4 (44)	5 (56)
		R	S	4	2		
Ethambutol	49	S	R	0	8	23 (47)	26 (53)
		R	S	18	23		
Ethionamide	64	S	R	7	11	29 (45)	35 (55)
		R	S	24	22		
Kanamycin	17	S	R	0	0	9 (53)	8 (47)
		R	S	8	9		
Levofloxacin	10	S	R	1	2	6 (60)	4 (40)
		R	S	2	5		

The genotypic result obtained by WGS is shown. Results with borderline MICs were excluded from the analysis

APM: 7H10 Agar Proportion Method, BMD: Broth Microdilution, WGS: Whole Genome Sequencing, R: Number of resistant strains, S: Number of susceptible strains

critical concentrations for new and repurposed drugs are still provisional [29, 30] and further work to define MIC distributions in a diversity of settings can contribute to refinement [31, 32]. Recently, the WHO has highlighted the great feasibility of the BMD plate methodology for the phenotypic evaluation of various anti-TB drugs, meeting all quality control requirements. Because of this, it has begun to analyze the performance of various BMD systems, including the UKMYC6 plate, in order to provide guidelines for the development of an optimized BMD system that can be recommended for clinical use [33].

The detection of discordant results is a fact that has been documented in previous studies for the different antituberculosis drugs and for both phenotypic and genotypic tests [34], which have been studied in countries with a high burden of drug-resistant strains, including Peru [35]. The fact that the highest percentage of discordant results between the APM and BMD methods have been detected in ethambutol and ethionamide drugs corroborates the existing problem of obtaining inconsistent results for both drugs [36–38]. This was also previously identified as a problem by the WHO, acknowledging that phenotypic DST lacks sufficient reproducibility and is not recommended for these drugs [39]. The considerable decrease in discordant cases through the application of borderline concentrations demonstrates the big challenge of defining a binary susceptible/resistant phenotype for certain drugs. These findings highlight the well-recognized imperfections of all approaches to *M. tuberculosis* DST. Sometimes there is no 'one right answer'.

The BMD system is presented as an alternative to susceptibility determination against traditional systems such

as APM. The latter has longer incubation times and is aimed at only evaluating critical concentrations of a limited number of drugs [39]. Against this, the use of BMD plates allows the simultaneous evaluation of between 12 to 14 drugs including traditional drugs, as well as new and recently repurposed ones [6, 8]. This generates advantages such as: the simultaneous evaluation of a range of concentrations for each drug, a reduction in the times for obtaining results for the complete set of drugs from months to only 14 days, and simplification of workflows in the laboratory [8]. Likewise, the practicality of the design and manufacture allow the BMD system plates to be personalized with different drugs and concentration ranges that best fit the reality of drug resistance prevalence in each country or study [33, 40]. Simultaneous analysis of various anti-tuberculosis drugs would be a great advantage in countries with a high burden of drug resistance such as Peru, where traditional flows establish that a filter is first carried out by means of a susceptibility test against first-line drugs (FLD). Only those with demonstrated FLD resistance are evaluated for susceptibility to second-line agents, including new and repurposed drugs, resulting in further delay in time to results and additional cost. On the other hand, it is estimated that the replacement of drugs and readjustment of concentrations evaluated in microdilution plates would not cause a significant increase in production costs in each country [8].

What is the clinician to make of the information provided by the laboratory and how should the laboratory present it? There is a reluctance to share MIC data with clinicians who lack the training to interpret

it. Few laboratory scientists and even fewer clinicians understand the complexities of the pharmacokinetics of TB drugs and how this relates to the MIC for a particular drug for a particular strain, so it still seems reasonable to try to simplify the message to the binary susceptible/resistant call where possible.

The value of MIC data lies in understanding the drift in the distribution in well characterised populations over time (public health usage) and in case management when therapeutic options are very limited but dosage increases might facilitate efficacy (clinical usage) [41]. Periodically re-evaluating the national MIC distribution profile, in particular for the new and repurposed drugs which have been introduced since this strain sample was obtained, would shed important light upon the speed at which drug-resistant strains are (or are not) emerging, information which might not be immediately apparent from simply looking at the binary susceptible/resistant data.

An important strength of this analysis is the national representativity. All strains identified nationally during the study period should have been sent to the National Mycobacteria Reference Laboratory for further testing so stratified sampling of the strain bank according to MDR-TB burden during the study period ensured a comprehensive and proportionate national coverage. The availability and use of WGS for discrepant analysis was a critically important enhancement that reinforced the importance of not depending upon a single methodology as the 'gold standard'. A limitation of the analysis was the lack of APM data for the new and repurposed agents, reflecting the earlier time period during which the original proportion method testing was done, and highlighting the power and versatility of the BMD plate methodology in accommodating a large number of drugs within a single assay.

The rapid expansion of the use of WGS for TB DST [42, 43], the growing library of identified resistance-conferring SNPs for all drugs and the tumbling cost (sequencing of the MTB genome is now no more expensive than MGIT phenotypic DST for 4 agents in the UK), place WGS as a likely near-horizon successor to phenotypic DST in settings where the infrastructure allows. Web-based tools for WGS interpretation can deliver (almost instantaneously) a 'resistance probability' for every drug based upon SNP identification in an uploaded sequence. This is derived by comparison with a large iterative database of paired phenotypic-genotypic data combined with some prediction modelling. Crucially for the clinician, the 'probability' acknowledges the uncertainty inherent in the result, allowing for a more intelligent and informed decision-making.

Conclusion

The susceptibility determination system by the BMD method using the UKMYC6 plate allows the complete susceptibility characterization, through the determination of MICs, of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Peru. This methodology shows good diagnostic performance for rifampicin, isoniazid, ethambutol, ethionamide, kanamycin and levofloxacin. It also allows the characterization of MICs for additional first and second-line drugs as well as for new and repurposed drugs.

Abbreviations

APM: 7H10 Agar Proportion Method; BMD: Broth Microdilution; CC: Critical Concentration; CFU: Colony-Forming Unit; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; CRyPTIC: Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis: an International Consortium; DST: Drug Susceptibility Test; ECOFF/ECV: Epidemiological Cut-off Value; ENA: European Nucleotide Archive; INS: Instituto Nacional de Salud; LRNM: Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias; LSHTM: The London School of Hygiene & Tropical Medicine; MDR-TB: Multidrug-resistant tuberculosis; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; OADC: Oleic acid Albumin Dextrose Catalase; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; TB: Tuberculosis; UPCH: Universidad Peruana Cayetano Heredia; WGS: Whole Genome Sequencing; WHO: World Health Organization; XDR-TB: Extensively drug-resistant tuberculosis.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07677-9>.

Additional file 1: Supplementary Method: DNA extraction procedure. **Fig. S1:** UKMYC6 microdilution plate design and range of concentrations. **Fig. S2:** Simplified histogram of MIC distribution and APM results for compared drugs. **Table S1:** Ternary categorization system based on MICs obtained by the Broth microdilution UKMYC6 plate. **Table S2:** Geographical distribution of the MTB Peruvian strains included in the study. **Table S3:** Summary and classification of MIC readings obtained in the BMD UKMYC6 plate methodology. **Table S4:** Discordant results between APM and BMD UKMYC6 plate methodology.

Acknowledgements

We express our thanks to all staff of the LRNM of the INS and to the Peruvian network of tuberculosis laboratories, for the routine work in the isolation and identification of different strains that were included in this study. We are grateful to the CRyPTIC Consortium for the fruitful collaboration, logistical support and generosity in sharing of expertise.

Author contributions

Conceptualization: ZMP, DAJM, DSL, JC; Project administration: ZMP, DAJM. Methodology: ZMP, DSL, ANV, JC, MJA, VVC, DAJM. Data analysis and writing of the manuscript: ZMP, DAJM, DSL, JC. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Peruvian National Institute of Health and PROCIENCIA (contract No. 230-2018-FONDECYT); the 'Dirección de Investigación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas', Lima-Peru (A-055-2021-2); Newton Fund Institutional Links award (414591184 Moore PER); Wellcome Trust/Newton Fund-MRC Collaborative Award (200205/Z/15/Z to CRyPTIC) and Bill and Melinda Gates Foundation (OPP1133541 to CRyPTIC).

Availability of data and materials

The raw sequence data (fastq.gz files) are available from the European Nucleotide Archive (ENA) under the project accession number: PRJEB41199 (individual accession codes are listed in Additional file 1: Table S4).

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

The Institutional Research Ethics Committee from the INS approved the study (Reference: OC-020-19). Additionally, the CRyPTIC associated study [44] (for which the objective was identification of the genomic determinants of MTB drug resistance by WGS) was reviewed and approved by the Research Ethics Committees of the INS, UPCH and LSHTM institutions. The study did not involve human samples so no informed consent was required. Instead, the study included MTB strains stored in the culture bank of the LRNM culture bank of the INS. The specific permission to use the preserved MTB strains was obtained from the National Centre for Public Health of the INS.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. ²Escuela de Medicina, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima, Perú. ³Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú. ⁴London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK.

Received: 29 April 2022 Accepted: 26 July 2022

Published online: 24 August 2022

References

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. 2021. <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>. Accessed 10 Feb 2021.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>. Accessed 17 Dec 2021.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714>. Accessed 5 Dec 2021.
- Ministerio de Salud. Dirección de Prevención y Control de la Tuberculosis - Portal de Información peruano. 2021. <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/MapasTB.aspx>. Accessed 2 Feb 2021.
- Timperi R, Han LL, Sloutsky A, Becerra MC, Nardell EA, Salazar JJ, et al. Drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: five years' experience and insight into treatment strategies for MDR-TB in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 2005;9:175–80.
- Lee J, Armstrong DT, Sengooba W, Park J-A, Yu Y, Mumbowa F, et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:11–8.
- Hall L, Jude KP, Clark SL, Dionne K, Merson R, Boyer A, et al. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex against first- and second-line agents. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3732–4.
- Rancoita PMW, Cugnata F, Gibertoni Cruz AL, Borroni E, Hoosdally SJ, Walker TM, et al. Validating a 14-drug microtiter plate containing bedaquiline and delamanid for large-scale research susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e00344–e418.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. 2nd edition. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- World Health Organization. Rapid communication: key changes to treatment of multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis (MDR/RR-TB). 2018. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CD5-TB-2018.18>. Accessed 7 Jun 2020.
- The CRyPTIC Consortium, Fowler PW. Epidemiological cutoff values for a 96-well broth microdilution plate for high-throughput research antibiotic susceptibility testing of *M. tuberculosis*. 2021.
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed 12 Nov 2019.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114–20.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010;26:589–95.
- Broad Institute. Picard: A set of Java command line tools for manipulating high-throughput sequencing (HTS) data and formats such as SAM/BAM/CRAM and VCF. Broad Inst. GitHub Repos. 2019. <https://broadinstitute.github.io/picard/>. Accessed 20 Nov 2019.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The genome analysis toolkit: a Map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20:1297–303.
- World Health Organization. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>. Accessed 20 Jul 2021.
- Phelan JE, O'Sullivan DM, Machado D, Ramos J, Oppong YEA, Campino S, et al. Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs. *Genome Med*. 2019;11:41.
- Hunt M, Bradley P, Lapiere SG, Heys S, Thomsit M, Hall MB, et al. Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with Mykrobe. *Wellcome Open Res*. 2019;4:191.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput. 2013. <http://www.R-project.org/>. Accessed 2 Jan 2020.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159–74.
- Mendoza-Ticona A, Moore DA, Alarcón V, Samalvides F, Seas C. Propuesta de esquemas de tratamiento antituberculosis basados en la susceptibilidad a isoniazida y rifampicina. *Rev Peru Med Exp Salud Publ*. 2013;30:197–204.
- Lopez B, Siqueira de Oliveira R, Pinhata JMW, Chimara E, Pacheco Ascencio E, Puyén Guerra ZM, et al. Bedaquiline and linezolid MIC distributions and epidemiological cut-off values for *Mycobacterium tuberculosis* in the Latin American region. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74:373–9.
- Ismail NA, Ismail F, Joseph L, Govender N, Blows L, Kaniga K, et al. Epidemiological cut-offs for Sensititre susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: interpretive criteria cross validated with whole genome sequencing. *Sci Rep*. 2020;10:1013.
- Yang JS, Kim KJ, Choi H, Lee SH. Delamanid, bedaquiline, and linezolid minimum inhibitory concentration distributions and resistance-related gene mutations in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in Korea. *Ann Lab Med*. 2018;38:563–8.
- Ministerio de Salud. Modificatoria de la Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectadas por tuberculosis. 2018. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/186788-752-2018>. Accessed 19 Dec 2018.
- Sengooba W, Nakayita G, Namaganda CC, Joloba ML. Agreement of Middlebrook 7H10 with Lowenstein-Jensen and accuracy of the Sensititre MYCOTB plate using either method as a reference standard for *Mycobacterium tuberculosis* first line drug susceptibility testing. *PLoS ONE*. 2018;13: e0199638.
- Yu X, Ma Y-F, Jiang G-L, Chen S-T, Wang G-R, Huang H-R. Sensititre® MYCOTB MIC plate for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 2016;20:329–34.
- World Health Organization. Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB. 2018. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260470>. Accessed 5 Feb 2019.

30. World Health Organization. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/339275>. Accessed 18 Apr 2021.
31. Dusthacker A, Saadhali SA, Thangam M, Hassan S, Balasubramanian M, Balasubramanian A, et al. Wild-type MIC distribution for re-evaluating the critical concentration of anti-TB drugs and pharmacodynamics among tuberculosis patients from South India. *Front Microbiol.* 2020;11:1182.
32. Pasipanodya J, Srivastava S, Gumbo T. New susceptibility breakpoints and the regional variability of MIC distribution in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:5428.
33. World Health Organization. Optimized broth microdilution plate methodology for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047419>. Accessed 15 Apr 2022.
34. Banu S, Rahman SMM, Khan MSR, Ferdous SS, Ahmed S, Gratz J, et al. Discordance across several methods for drug susceptibility testing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a single laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52:156–63.
35. Zürcher K, Reichmuth ML, Ballif M, Loiseau C, Borrell S, Reinhard M, et al. Mortality from drug-resistant tuberculosis in high-burden countries comparing routine drug susceptibility testing with whole-genome sequencing: a multicentre cohort study. *Lancet Microbe.* 2021;2:e320–30.
36. Zhang Z, Wang Y, Pang Y, Kam KM. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 2014;52:638–41.
37. Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, et al. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3976–9.
38. Li M, Chen R, Lin S, Lu Y, Liu H, Li G, et al. Detecting ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China: a comparison between phenotypic drug susceptibility testing methods and DNA sequencing of *embAB*. *Front Microbiol.* 2020;11:781.
39. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018.
40. CRyPTIC Consortium. Epidemiological cutoff values for a 96-well broth microdilution plate for high-throughput research antibiotic susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *Eur Respir J.* 2022;2200239.
41. Xu Y, Wu J, Liao S, Sun Z. Treating tuberculosis with high doses of anti-TB drugs: mechanisms and outcomes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16:67.
42. World Health Organization. Technical guide on next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. 2018. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274443>. Accessed 2 Dec 2018.
43. Hasan Z, Shakoor S, Hasan R. Importance of next-generation diagnostics in control of tuberculosis in LMICs. *EBioMedicine.* 2021;74: 103753.
44. CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, Allix-B guez C, Arandjelovic I, Bi L, Beckert P, Bonnet M, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *N Engl J Med.* 2018;379:1403–15.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



XI.3. ANEXO 3. Artículo 3

Evaluation of lens-free microscopy for interpretation of MODS cultures and facilitation of tuberculosis diagnosis.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is considered the most lethal infectious disease since the dawn of mankind, persisting even today as a significant global public health concern, especially in developing nations. According to statistics provided by the World Health Organization (WHO) in 2021, one third of the world's population is infected with TB. There have been 9.9 million new cases and 1.5 million deaths attributable to this disease, making it the second leading cause of death by infectious agent, second only to COVID-19 (1). A staggering 95% of these cases occur in developing countries and mainly affect the economically active population between 15 and 50 years of age, which has a devastating effect both socially and economically.

The high number of detected cases is largely attributed to co-infection in individuals with the human immunodeficiency virus (HIV), which weakens the immune system, increasing the risk of infection, reactivation and fatality. This is evidenced by the 214,000 cases of deaths reported by WHO in 2020 (1). At the same time, the emergence of drug resistance has reinforced the severity of the disease, a situation that is aggravated by challenges in adherence to treatment, delayed diagnosis and drug susceptibility testing, which is slow, costly and difficult to access, favoring the spread of resistant bacilli and complicating patient recovery.

Multidrug-resistant TB (MDR-TB) is currently defined as TB resistant to isoniazid and rifampicin, first-line and key drugs in treatment. As of January 2021, the World Health Organization (WHO) categorizes the most severe cases of resistance as pre-extremely resistant TB (pre-TB-XDR), which corresponds to MDR-TB with additional resistance to any fluoroquinolone such as levofloxacin or moxifloxacin; and extremely resistant TB (XDR-TB), which meets the definition of pre-XDR-TB but adds resistance to a Group A drug, either bedaquiline or linezolid (2). In instances of resistant TB, the WHO reports that only one-third of those affected access treatment. Treated cases decreased by 15% between 2019 and 2020, with a disappointingly low success rate of 59%. New MDR-TB cases account for 3-4% of the total, while cases of previously treated patients are between 18-21%. In 2018, 13,068 XDR-TB cases were reported in 81 countries, with Belarus, India, the Russian Federation, South Africa and Ukraine reporting the highest number of cases (2). In the Americas, Peru tops the list with 116 cases, being the country with the highest number of notifications in the region (3).

In recent years, the MODS method, or drug susceptibility testing by microscopic observation, has proven to be a robust, sensitive, specific and widely used tool that facilitates the simultaneous diagnosis of TB and MDR-TB from a sputum sample (4,5,6). In addition, recent studies have standardized the MODS test for the detection of resistance to pyrazinamide, a crucial drug used in first- and second-line therapy (7,8).

The MODS method involves a series of microbiological steps: The sample needs to be digested, decontaminated and concentrated. It is then mixed with supplemented Middlebrook 7H9 liquid culture medium, distributed in 24-well cell culture plates with and without antimicrobial agents and incubated at 37°C. Detection of characteristic colony

growth in the liquid medium occurs between 7-9 days using an inverted microscope at 100X total magnification, which forms the basis of microbiological diagnosis.

Mycobacterium tuberculosis (MTB) colonies from a positive MODS culture show a particular morphological growth pattern during incubation in liquid medium (9). Mainly in the first 5-6 days, MTB colonies appear very small, with a "comma" shape, under 100X total magnification. Between days 7 and 10 of culture, the colonies begin to develop, adopting the form of larger cords, detectable even at 40X magnification. After 10 days, the development of the cords is much greater and they begin to aggregate to form clusters or groups of cords detectable at 40X (Figure 1). Laboratories that process MODS base their diagnosis on the identification of cord-like colonies between days 7 and 10 of incubation, looking for the presence of five particular morphological characteristics to consider a culture as positive: length within a certain range, thickness within an established range, sinusoidal curve shape, pointed ends and a greater brightness in the central axis of the cord, while the edges present a degree of opacity (9). These characteristics have been used to develop automatic crop recognition algorithms by detecting patterns in digital microscopic images (9,10).

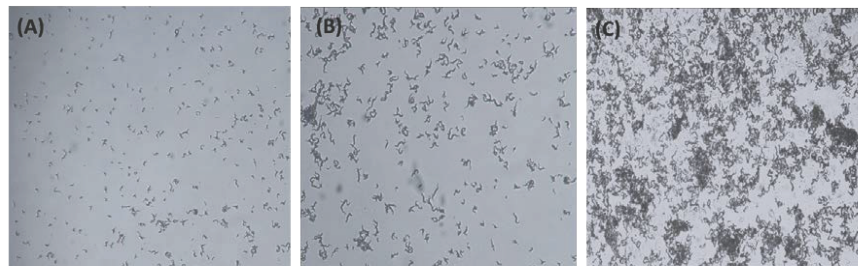
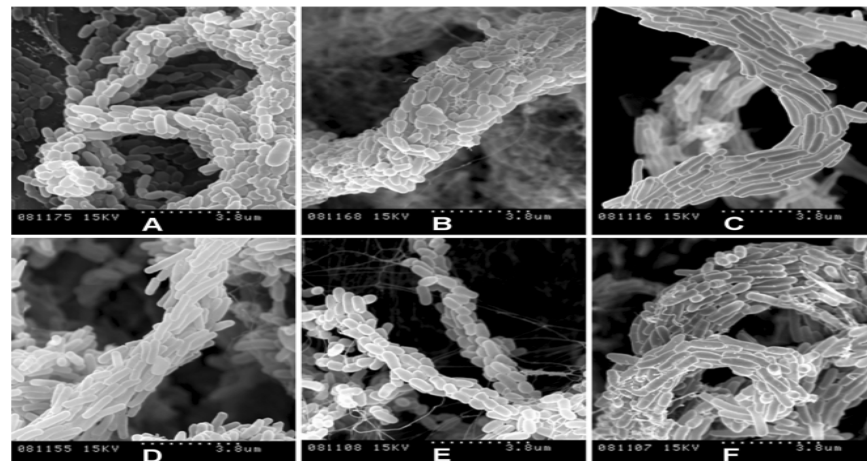


Figure 1: Characteristic growth pattern of MTB cords in MODS cultures observed at 100X total magnification. (A) Day 6 culture; (B) Day 8 culture; (C) Day 13 culture. The cords observed between days 7-9 are very specific and clear for MTB diagnosis.

Despite the advantages and the recognized use of the MODS method in various laboratories around the world, there are still challenges to be faced in order to expand its application. MODS requires an inverted microscope, an instrument that is often expensive (11), as well as trained personnel dedicated to the specific characteristic recognition that MTB shows in the liquid medium. In addition, evaluating a MODS culture involves reading four wells per sample in a 24-well plate, which requires 1 to 2 minutes per well by an expert observer (12). On the other hand, advances in the field of microbiology, together with innovations in the area of microscopy, have greatly facilitated the detection and morphological classification of microscopic organisms using higher resolution microscopes. However, these advances are often accompanied by high costs and high complexity for their use. In this regard, previous studies have demonstrated the possibility of capturing images of sufficient quality of MODS cultures using an ad-hoc inverted microscope of simple and low-cost technology (12), and recently it has been shown that, through 3D printing technology, an inexpensive inverted microscope capable of obtaining images of MODS cultures of sufficient quality for their correct analysis and interpretation can be constructed (13).

In addition, lens-free microscopy, also known as holographic microscopy or online digital holography, is a type of microscopy that uses computational methods to reconstruct the image of a sample without the need for traditional lenses (14). This technique involves illuminating the sample with a coherent light source, such as a laser, and capturing the light scattered by the sample on a digital sensor, such as a CMOS or CCD sensor. The scattered light waves interfere with the unscattered light waves, creating a hologram containing information about the sample. This hologram is processed by computational algorithms to extract phase and amplitude information from the scattered light waves, which can be used to reconstruct an image of the sample. By not requiring lenses, lens-free microscopy offers several advantages over traditional microscopy techniques, such as lower cost, simpler setup, and the ability to image larger samples in a single field of view. Lens-free microscopy is especially beneficial for applications that require high-throughput or large-area imaging, such as cell counting, microbiology, and pathology (14,15,16).

Although lens-free microscopy allows detection of bacterial cells and colonies, the reason this technique is viable for TB diagnosis in MODS cultures is because, although an MTB bacillus is too small to be appreciated (1-10 μm long by 0.2-0,7 μm wide) and 100X magnification is needed with a conventional microscope, MTB colonies formed in liquid culture are composed of hundreds of bacilli, stacked linearly side by side, forming cords of characteristic morphology that can be detected and distinguish MTB colonies (Figure 2) (17).



Taken from: "Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria" by Julián E, Roldán M, Sánchez-Chardi A, Astola O, Agustí G, Luquin M, 2010, J Bacteriol Apr; 192(7) p. 1757 doi: 10.1128/JB.01485-09. Epub 2010 Jan 22. PMID: 20097851; PMCID: PMC2838037.

Images of mycobacteria forming cords in liquid medium. The images obtained with scanning electron microscopy show details of the bacilli arranged along the longitudinal axis of the cord formed in the liquid medium by colonies of *M. chubuense* (A), *M. gilvum* (B), *M. marinum* (C), *M. obuense* (D), *M. parafortuitum* (E) and *M. vaccae* (F). (Roldan et al.,2010, p. 1757).

In a proof-of-concept, our team succeeded in demonstrating that a prototype CMOS sensor-based lensless imaging system could digitally capture characteristic MTB cords in a 24 mm² field of a MODS culture well in a single pass, with sufficient magnification and quality (18). Recently, a portable and commercial lensless inverted microscope, Cytonote (Iprasense, France), proved to be effective in monitoring cells in cell cultures, efficiently imaging densely populated cells and allowing their motility, morphology, and growth to be studied (19). The present work describes the evaluation of the Cytonote lens-free microscopy platform for the recognition of the characteristic cords of MODS cultures and its performance in the diagnosis of TB from digital imaging of strains (pure cultures) and sputum samples. This platform will contribute to efforts to facilitate the use of MODS and achieve rapid TB diagnosis in high incidence populations.

2. Materials and Methods

2.1. Biological samples

Sixty-two sputum samples with negative (N=X) and positive (N=x) smears, and 38 strains (pure cultures) of TB were collected anonymously from leftovers of routine culture processes performed in the biosafety level 3 mycobacteria laboratory of the infectious diseases research laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). The sputum samples correspond to a previous study with authorization from the ethics committee of UPCH to use the leftovers indicated (SIDISI 100252). The present study has the approval of the ethics committee of UPCH.

2.2. MODS culture

Processing of sputum samples: MODS Culture was performed following the protocol described previously [4,5,6]. Briefly, 2 mL of sputum was decontaminated according to standard methodology with 4 % NaOH mixed 1:1 vol./vol. with 2.9 % sodium citrate and 0.5 % N-acetyl-L cysteine for 15 minutes, then 14 mL of sterile Phosphate Buffer pH 6.8 was added and the solution was concentrated by centrifugation at 3,000 g for 15 minutes. The sediment was mixed with 5 mL of Middlebrook 7H9 liquid medium supplemented with 10% OADC and 100 µL of PANTA antimicrobial supplement.

Strain processing (pure cultures): MTB strains were processed according to the methodology used for positive controls in the MODS assay. Briefly, each strain contained in Petri dishes with Middlebrook 7H10 solid medium was pre-adjusted to a MacFarland scale 1 solution (3×10^8 cfu/mL) with water-tween solution (Final tween concentration = 0.04 %) and then 5µL of the bacterial suspension was dispensed into 5 mL of 7H9-OADC 10% liquid medium.

After obtaining the suspensions of each sample or strain, 900 µL was distributed into 4 wells of a 24-well plate previously containing 100 µL of 7H9 liquid medium supplemented with 10% OADC in well 1 and 2. Wells 3 and 4 contained 100 µL of isoniazid and rifampicin at the concentrations of 4 and 10 µg/mL respectively (The final concentration in the wells was 0.4 µg/mL for isoniazid and 1.0 µg/mL for rifampicin). The plates with their lids were sealed with parafilm and incubated at 37°C.

Plates were examined on days 7, 8 and 9 of culture by a specialist in MODS culture readings using a NIKON Eclipse TS100-F inverted microscope with a total magnification of 40X and 100X for searching for characteristic MTB cords in the liquid culture medium.

2.3. Description of the Cytonote lensless imaging system

The lens-free inverted video microscope evaluated for this study was the Cytonote 1W portable one-well model, purchased from Iprasense, France. Cytonote is a simple and robust platform of small size (12x11x10 cm), designed to capture and monitor cell growth through real-time image capture in a large field of view of 29.4 mm² without the need to manually adjust focus or brightness (15).

General operation of the platform

Briefly, the equipment emits a beam composed of different intensities of red (636 nm), green (521 nm) and blue (452 nm) light onto the sample through a 150 µm pinhole attached to a multichip LED. When the beam is incident on the sample, it forms a diffraction pattern that is captured by a 10-megapixel CMOS sensor. Subsequently, the diffraction pattern (hologram) is reconstructed into an enlarged image interpretable by humans using a holographic algorithm implemented in Horus v. 5.2.2.0 software (Iprasense, France), similar to what is observed in an optical inverted microscope and captured on a computer monitor (Figure 3-A).

General image acquisition setup and procedure

For all measurements, Horus was configured to automatically select a focus value within a specific range to reconstruct the diffraction pattern. In addition, the software was programmed to perform a noise filtering step during the reconstruction. The specific autofocus ranges and the nature of the filtering algorithm used for each scan depended on whether the image was obtained during the optimization or evaluation phase, as described below. Apart from these parameters, the following procedures were held constant for all image acquisitions. For analysis with the Horus software, a cell suspension culture type was specified for the MODS culture images obtained. Before each measurement, hot air was blown on the surface of the MODS plates to remove condensation on the inside of the lid, which prevented the algorithm from focusing the image correctly. Next, light intensities and acquisition times were calibrated by placing a random well of the MODS plate to be measured over the CMOS sensor and covering the system with a cover box to prevent incoming light from affecting the measurement. Image acquisition after calibration was also performed by placing the corresponding well over the sensor and covering the system. If the reconstruction failed due to an error in the autofocus algorithm, resulting in a strange and blurred image, the manual focus function of Horus was used. In this mode, Horus allows the user to manually enter the corresponding focus value. The images were reconstructed by increasing the focus value from 0 to 4000 in steps of 50, thus generating a set of 200 photos. All reconstructed images were then visually inspected to select the best focused one. To avoid entering the focus values 200 times, the focus increment was automated with an internal Python script communicating with Horus.

2.4. Evaluation

To assess the applicability of the Cytonote lensless microscope in the diagnosis of MODS cultures, three phases were performed: The initial one addressed the optimization of Horus parameters using Cytonote 1W to acquire images from culture strains and MODS cultures from sputum samples. The second phase analyzed the morphological characteristics of MODS strands in images obtained with Cytonote, and the third evaluated the performance of images captured with Cytonote for TB diagnosis.

2.4.1 Phase 1: Optimization of Horus parameters for MODS imaging

The Cytonote device was primarily devised to image eukaryotic cell lines inside an incubator (15). Consequently, it was necessary to adjust the default reconstruction parameters of the holographic algorithm to capture MTB strands. Two parameters were of particular interest: the noise filtering algorithm and the autofocus range.

The Horus software provides three alternatives for filtering background noise: a mean, a median and a third-order algorithm. To determine the most appropriate option for this application, five MODS cultures of isolated strains and five sputum samples with positive sputum smears (distributed in four wells of a MODS plate) were used. The presence of characteristic MTB cords in these samples was verified using a conventional inverted microscope. From each well, two images were obtained with Cytonote, employing each of the three noise filtering algorithms and maintaining the default autofocus range. In total, 240 images were analyzed (10 samples x 4 wells per sample x 2 images per well x 3 noise filtering algorithms).

Once the best noise filtering algorithm was determined, a subset of 63 of the 240 digitized images was used to optimize the autofocus range. This subset corresponded to the images obtained with the optimal filtering method and that provided a positive TB diagnosis according to the inverted microscopy evaluation. Their manual or autofocus values were retrieved and the samples were grouped according to culture type (either isolated strain cultures or sputum cultures). The distribution type and mean values of each group were compared using the Kolmogorov-Smirnov test and the independent T-Student test (equal variances, tested using Levene's test) to verify whether the distributions of the two groups were equivalent and to validate whether merging the dispersion of their focus values is an adequate approach to obtain an autofocus range.

2.4.2. Phase 2: Evaluation of the morphological characteristics of MODS cords in the images generated by Cytonote microscopy

For the morphological evaluation of MODS cords, from the images captured with Cytonote, 6 strains (pure cultures) from MDR-TB patients and 15 sputum samples with positive 1+ and 2+ bacilloscopy were used. The strains and samples were processed with MODS and incubated at 37°C. From day 7 to day 9, the positive or negative diagnosis of all cultures was determined using a conventional optical inverted microscope. Then, images were captured with the Cytonote microscope, obtaining four digital images per day for each sample or strain (one image for each of the four wells of the MODS plate). The same specialist who interpreted the MODS cultures on the inverted microscope analyzed the MTB strands obtained from the images. The evaluation started with the pure cultures and then with the sputum samples.

For the evaluation of the cords in each image, three previously defined aspects were considered: The first was to determine whether the morphological characteristics presented by the MTB cords in the liquid culture medium, when observed under an inverted microscope, are similar in the images (sinusoidal shape, of variable length and thickness, with single pointed ends and greater brightness along the central axis of the cord) generated in the Cytonote microscope. The second was to detect in the images whether the cords show any special characteristics during their development, since MODS experts recognize microscopically that cords remain suspended in the liquid culture medium and then, as they continue to develop, tend to precipitate to the bottom of the well to form clusters. The third was to recognize in the images the presence of detritus and/or cells,

which are artifacts typical of a sputum sample processed with MODS, a detail commonly distinguished in the microscopic examination and which tends to concentrate in the central part of the wells, and may hinder the early detection of the cords if found in high quantity during conventional diagnosis.

2.4.3. Phase 3: Evaluation of the images generated by the Cytonote microscope for TB diagnosis

The Cytonote microscope, a lens-free imager, was configured according to the parameters obtained in phase 1. Sputum samples and TB strains were processed with MODS and incubated at 37°C. After seven days of incubation and for two consecutive days, the positive or negative diagnosis of all cultures was determined using a Nikon Eclipse inverted microscope coupled to a Nikon DS-L2 5.4-megapixel digital camera to maintain an image record of each well evaluated. After the microscopic reading, images were generated by placing each well of the MODS plate on the CMOS sensor of the Cytonote microscope (Figure 3-B).

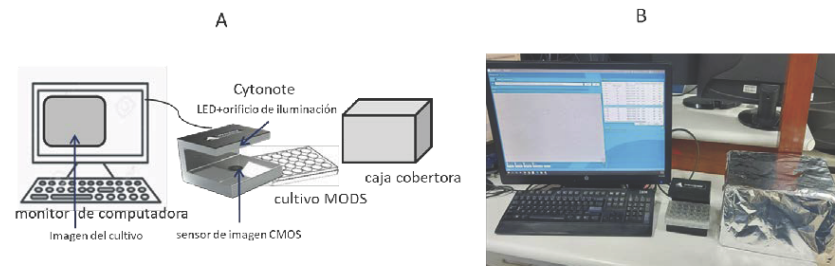


Figure 3. Cytonote System Configuration for MTB Image Acquisition of MODS Crops (A) Schematic diagram of the Configuration (B) Photograph of the Configuration.

Eight digital images were obtained daily for each sample or strain (two images for each of the four wells of the MODS plate). The same specialist who interpreted the MODS cultures with the commercial optical inverted microscope interpreted the images displayed on a computer monitor. Each image was classified as positive or negative. Positivity for TB was established if two or more characteristic cords were observed in each image, according to the standard interpretation of the conventional MODS culture. The autofocus quality of each image was classified as: good, fair or poor.

3. Results

3.1. MODS culture

As previously explained, TB colonies growing in a MODS culture go through three growth phases that are easily distinguishable visually (Figure 1). On average, during the first 5-6 days, small "comma" structures emerge. Between days 7 and 9, growth increases and they

acquire a "cord-like" shape, a distinctive feature for TB diagnosis. From day 10 onwards, the colonies agglomerate to form "clusters". Different studies with MODS corroborate that the average period for detecting TB growth in cultures is 7-9 days after incubation (4,5,6). Therefore, for this study it was determined to evaluate the plates for three consecutive days starting on the seventh day of incubation, which is considered the optimal time to obtain a positive MODS culture detectable through an image captured by the Cytonote single lens system. In all cases, the positive samples analyzed showed morphological characteristics typical of a conventional MODS culture.

3.2. Optimized parameters

Evaluation of the filtering methods concluded that the median algorithm was more appropriate for recognition of MTB cords, as it minimized the intensity of clusters in the image (Figure 4-A). Clusters are the accumulation of multiple MTB cords and do not contribute to image recognition, as opposed to individual cords that are the basis for accurate positive diagnosis of TB with MODS (9).

The Kolmogorov-Smirnov null hypothesis was not rejected ($P = 0.5011$), supporting that the distributions of the focus values of both isolates and sputum samples follow the same pattern. Furthermore, no significant differences were found between the variances of the groups (Levene's test, $P = 0.4405$). Finally, group means were also not significantly different (t-test for equal variances, $P = 0.2658$). Taken together, these results suggest that the distributions of the focus values for both crop types derive from the same continuous distribution and share the same parameters. This is correlated by the visually similar distributions (Figure 4-B). For this reason, for subsequent analyses both groups were combined. A permissive estimation of the optimal autofocus range (the one that maximizes the chances of containing a correct value for almost all samples) was performed by taking the range formed by rounding the minimum and maximum focus values of this combined distribution. The resulting optimal autofocus value was 2000-4000 μm .

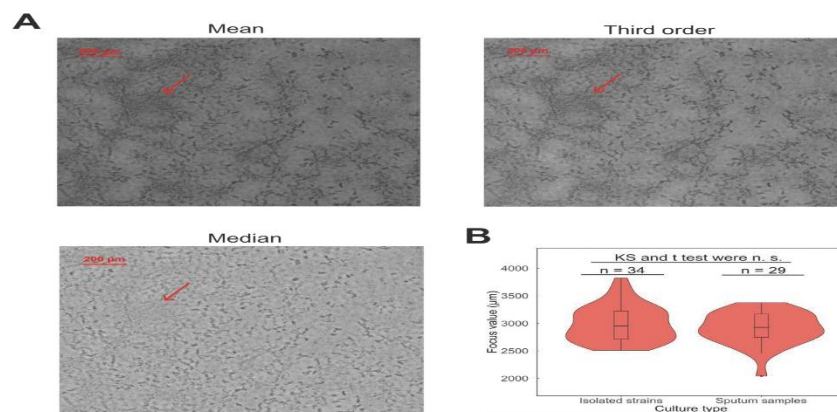


Figure 4. Optimization of noise filtering parameters and autofocus range. (A) The three images show the same area reconstructed using the three noise filtering algorithms implemented in Horus. The arrow indicates a reference cluster. It can be seen that the median-based filtering algorithm almost completely reduced the visibility of the cluster. (B) Violin plots representing the distribution of focus values by crop type. The shapes of the

distributions are very similar. This corresponds to the fact that the Kolmogorov-Smirnov (KS) test yielded nonsignificant P-values. Furthermore, it is observed that the distributions are centered towards similar values.

3.3. Evaluation of the morphological characteristics of MODS cords in the images captured with the Cytonote lensless microscope.

A total of 252 digital images of 7- to 9-day MODS cultures were analyzed. Of these, 72 were from cultures with pure TB strains and 180 from sputum samples with positive sputum smears from TB patients. Initial evaluation determined that Cytonote produces clear images of TB cords with MODS and that their morphology is visualized with minimal differences compared to what is observed on an inverted microscope (Figure 5-A). Positivity was detected in all images. Visual evaluation began with pure strain cultures, where cords are most clearly detected against a noise-free background (Figure 5-B). Subsequently, cords were evaluated in sputum samples, where it is common to find cells or detritus (Figure 5-C). Visual analysis determined that the sinusoidal shape of the cords, with their variable length and thickness, are the most important morphological features for visual recognition of TB in the images. Subjective evaluation concluded that the cords take on a dark or black color in most images, which would correspond to developing cords settling in the wells. In some images, thin gray cords were detected, identifiable mainly by zooming in on the computer monitor during visual recognition. These fainter cords would correspond to young cords suspended in the liquid culture medium (Figure 6). As for the recognition of detritus and/or cells in the images of the sputum samples, these are not clearly distinguishable. This difficulty is also present in cords that form clusters.

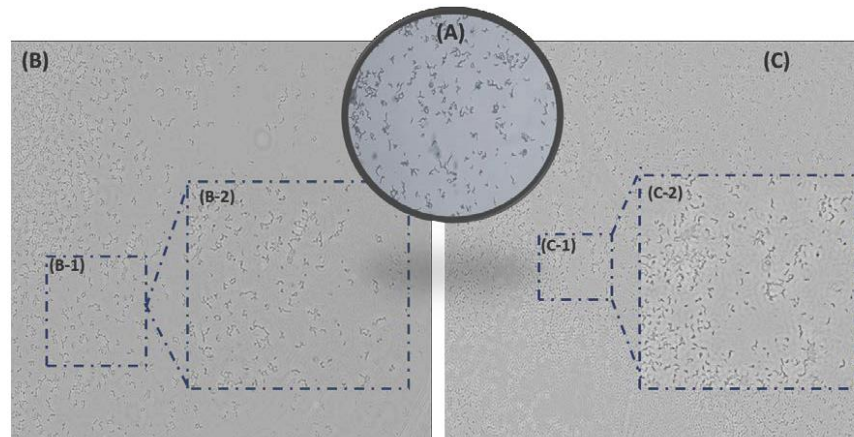


Figure 5: Comparison of digital images of positive MODS cultures at day 8 of culture. Corresponds to: (A) Image of a sputum sample observed under an inverted microscope and captured with Nikon DS-L2 digital camera (B) Image of pure MTB strain captured with Nikon DS-L2 digital camera (C) Image of sputum sample captured with Nikon DS-L2 digital camera

Cytonote (C) Image of MTB positive sputum sample captured with Cytonote. (B-1) and (C-1) segments of original Cytonote image; (B-2) and (C-2) segments of zoomed Cytonote image.

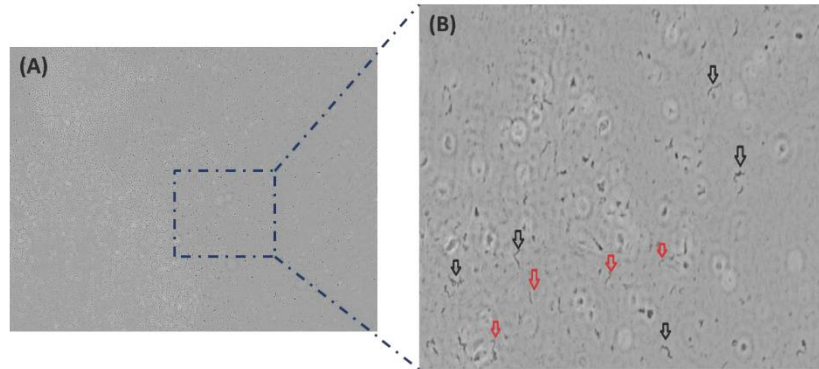


Figure 6: Cytonote digital image of a MODS-positive culture at day 8 of culture. (A) Original digital image (B) Zoomed-in segment of the original image: black arrows indicate characteristic black MTB cords and red arrows indicate thinner lead-colored developing MTB cords.

Depending on the area of the MODS well from which the images are obtained, 3 areas can be detected: the central area of the well, predominantly with dark spots, which corresponds to the area most saturated with cells or debris (Figure 7-A); the intermediate area surrounding the central area, which presents clear but not well-defined circular configurations, corresponding to scattered cells (Figure 7-B); and the outermost area, which presents areas mostly without noise and where MTB strands are most frequently detected (Figure 7-C). If there are cords where debris and/or cells are concentrated, or if there are conglomerate cords of MTB in any field of the image, these are not detected and are perceived as white spots (Figure 7).

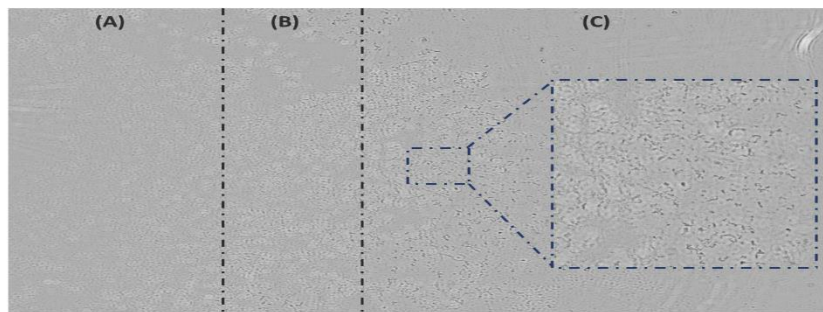


Figure 7: Cytonote digital image from a sputum sample processed with MODS at day 7 of incubation. Detected zones: (A) Dark zone, corresponds to the central zone of a MODS well

where detritus, material typical of a sputum sample, is concentrated; (B) Intermediate zone, presents mostly cells; (C) Outer zone, the lightest zone where MTB cords are detected. The detritus and cells are not recognizable and if there are MTB cords in these zones they are not detected.

3.4. Evaluation of Cytonote imaging for TB diagnosis

A total of 2361 images were obtained from 7- to 9-day MODS cultures with Cytonote. Of the total, 911 were from pure strain cultures and 1450 from sputum samples. Evaluation of the images for TB diagnosis with Cytonote was performed according to the settings already described and under standard laboratory conditions.

In general, most of the images were adequately reconstructed using Horus software, showing an appropriate focus that allowed a correct interpretation of the MODS cultures. Images obtained with good focus allow to clearly distinguish the morphological structures of the MTB colonies, revealing the sinuous shapes of the cords. Length, thickness and shape are the morphological features that are clearly visible in the digital images reconstructed by the Horus software (Figure 5). The sharp ends and increased brightness at the edges of the cords are not apparent in the reconstructed images. However, this does not hinder correct interpretation and diagnosis.

Images corresponding to pure strain cultures showed higher definition and clarity, facilitating better recognition compared to images corresponding to sputum cultures (Figure 5-B and 5-C). Notably, the background of the image corresponding to a pure strain culture is cleaner and with less noise than that frequently observed in sputum culture photos.

Of the 911 pure strain culture images, 112 (12.3%) and 143 of the 1450 sputum culture images (9.9%) showed low focus level, which made reliable interpretation difficult. In these cases, the low-focus images were reconstructed for different focus values. After a manual review of each of the reconstructed images for the same sample or strain, at least one image with adequate focus was identified that allowed for reliable interpretation and diagnosis. 95.85% of these samples could be evaluated, after identifying the reconstructed image with the proper focus.

Table 1: Cytonote performance compared to MODS culture for MTB image detection in pure strain images and sputum samples.

Variables	Automatic focus				Manual focus			
	MODS strains		MODS sputum		MODS strains		MODS sputum	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Cytonote Pos	729	0	289	21	819	0	356	21
Cytonote Neg	112	70	122	1018	22	70	55	1018
Sensitivity %	86.7		70.3		97.4		86.6	
Specificity %	100		98		100		98	
PPV%	100		93.2		100		94.4	
NPV%	38.4		89.3		76.1		94.9	
Kappa	0.5		0.74		0.85		0.87	

Pos=positive, Neg=negative, PPV=positive predictive value, NPV=negative predictive value

After identifying suitable reconstructed images and performing manual classification of all interpretable images obtained with the Cytonote microscope, comparison with images for the same samples obtained conventionally showed 97.59% agreement for pure strain cultures and 94.76% agreement for sputum cultures. When considering evaluation by the standard MODS method with the conventional optical inverted microscope, lens-free microscopy showed a sensitivity of 70.32% for sputum cultures, and a sensitivity of 86.68% for pure strain cultures.

4. Discussion

This study represents the first report of the use of lens-free microscopy, specifically the Cytonote device, to diagnose TB. We confirm that this technology is useful for the inspection of MODS cultures and for the detection of MTB. Lens-free microscopy offers speed and simplicity as primary advantages. However, there is one notable limitation: in certain cases, it requires inspection of reconstructed images for different focusing Z-parameters. Despite this, lens-free microscopy is a valuable tool to facilitate MODS testing in TB diagnosis.

The MODS method has proven to be a robust and low-cost tool for the diagnosis of TB and MDR-TB due to its simple methodology, its high sensitivity and specificity for liquid culture, and the characteristic growth of cord-like morphologies of MTB colonies observed after 7-10 days of incubation (4,5,6). These attributes support its potential utility in the fight to eradicate TB.

Lens-free microscopy provides a simple way to image live cells and allows the monitoring of cell cultures directly from the incubator. Its wide field of view and the absence of manual focus adjustment between shots facilitate real-time image analysis. Based on these features, we hypothesized that the Cytonote could generate images of MODS cords for subsequent morphological study, facilitating the identification and diagnosis of MODS cultures as positive or negative.

A remarkable aspect of this study is that it allowed the identification and evaluation of MODS cords in a complete image within a 29.4 mm² field of view using a 10-megapixel CMOS sensor. However, we encountered limitations when confronted with cultures with high amounts of detritus and/or cells, especially in sputum samples with abundant cords forming clusters. In these cases, the images were not as easily distinguishable as with the human eye during microscopic examination.

The analysis of morphological features and the evaluation of Cytonote images for TB diagnosis are subjective and complicated to standardize. Hence, the results are highly dependent on the experience of the personnel performing MODS. However, correct interpretation of a MODS well image can expedite diagnosis without the need for an inverted microscope.

Our study supports the proof of concept that lens-free microscopy is effective for interpreting MODS cultures in the diagnosis of TB. However, certain limitations should be recognized and should be addressed in future studies.

Among the difficulties encountered, the mathematical processing required to reconstruct the real physical image from the diffraction patterns (holograms) generated by the scanning microscopy stands out. During this process, a parameter related to the Z-axis focusing needs to be optimized, which requires prior evaluation. In our study, we found that in about 11%

of cases, images reconstructed using a single optimized focus/Z-axis parameter were blurred and difficult to interpret. To address this problem, we reprocessed the hologram using Horus software with different values of the focus/Z-axis parameter. In each case, at least one focus/Z-axis parameter provided a sufficiently clear image for reliable diagnosis. The reason that nearly 11% of MODS cultures require a customized focus/Z-axis parameter may be because colony-associated cord structures do not necessarily form in the same plane with respect to the well level. TB cords may acquire a complex three-dimensional structure or could grow in different planes on contaminant debris, requiring optimized focus/Z-axis parameters for each sample. Although this is a major limitation, we believe that an upgrade of the reconstruction software to automatically reconstruct hologram images for different focus/Z-axis parameters could be a possible solution.

Another limitation identified was condensation on the lids of the MODS plates upon removal from the incubator, which degraded the quality of the images. However, this drawback was solved by applying heat to the plate with a hot air blower.

Our study supports that Cytonote lens-free microscopy enables early and automatic detection of MODS cultures, satisfying basic user needs. Furthermore, this study lays the groundwork for the development of new fully automatic imaging devices that allow simultaneous detection and monitoring of a full 24-well plate in an incubator, facilitating MDR-TB diagnosis in a short time.

In conclusion, the Cytonote lens-free microscope system emerges as a promising platform that generates images of MODS cultures, facilitating the diagnosis of tuberculosis in a shorter time. This tool could contribute significantly to efforts to control this disease. Future research should address the identified limitations to further optimize the use of this technology in TB diagnosis.

References

- 1- World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: WHO; c2022 [cited 2022 Mar 10]. Global Tuberculosis Report 2021. 57p. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- 2- World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021 [accessed 2021 Jul 12]. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018662>
- 3- Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://doi.org/10.37774/9789275324479>.
- 4- Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, Berg DE, Montenegro-James S. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1203-8. doi: 10.1128/JCM.38.3.1203-1208.2000. PMID: 10699023; PMCID: PMC86377.
- 5- Moore DA, Mendoza D, Gilman RH, Evans CA, Hollm Delgado MG, Guerra J, Caviedes L, Vargas D, Ticona E, Ortiz J, Soto G, Serpa J; Tuberculosis Working Group in Peru. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4432-7. doi: 10.1128/JCM.42.10.4432-4437.2004. PMID: 15472289; PMCID: PMC522377.

- 6- Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, Sánchez E, Piñedo Y, Saravia JC, Salazar C, Oberhelman R, Hollm-Delgado MG, LaChira D, Escombe AR, Friedland JS. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med*. 2006 Oct 12;355(15):1539-50. doi: 10.1056/NEJMoa055524. PMID: 17035648; PMCID: PMC1780278.
- 7- Alcántara R, Fuentes P, Antiparra R, Santos M, Gilman RH, Kirwan DE, Zimic M, Sheen P. MODS-Wayne, a Colorimetric Adaptation of the Microscopic-Observation Drug Susceptibility (MODS) Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide Resistance from Sputum Samples. *J Clin Microbiol*. 2019 Jan 30;57(2):e01162-18. doi: 10.1128/JCM.01162-18. PMID: 30429257; PMCID: PMC6355525.
- 8- Alcántara R, Fuentes P, Marin L, Kirwan DE, Gilman RH, Zimic M, Sheen P. Direct Determination of Pyrazinamide (PZA) Susceptibility by Sputum Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS) Culture at Neutral pH: the MODS-PZA Assay. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 23;58(5):e01165-19. doi: 10.1128/JCM.01165-19. PMID: 32132191; PMCID: PMC7180241.
- 9- Alva A, Aquino F, Gilman RH, Olivares C, Requena D, Gutiérrez AH, Caviedes L, Coronel J, Larson S, Sheen P, Moore DA, Zimic M. Morphological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* in a MODS culture for an automatic diagnostics through pattern recognition. *PLoS One*. 2013 Dec 16;8(12):e82809. doi: 10.1371/journal.pone.0082809. PMID: 24358227; PMCID: PMC3865090.
- 10- Lopez-Garnier S, Sheen P, Zimic M. Automatic diagnostics of tuberculosis using convolutional neural networks analysis of MODS digital images. *PLoS One*. 2019 Feb 27;14(2):e0212094. doi: 10.1371/journal.pone.0212094. PMID: 30811445; PMCID: PMC6392246.
- 11- Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, Pai M. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Current standards and challenges. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2008 Mar;19(2):169-72. doi: 10.1155/2008/857901. PMID: 19352448; PMCID: PMC2605858.
- 12- Zimic M, Velazco A, Comina G, Coronel J, Fuentes P, Luna CG, Sheen P, Gilman RH, Moore DA. Development of low-cost inverted microscope to detect early growth of *Mycobacterium tuberculosis* in MODS culture. *PLoS One*. 2010 Mar 23;5(3):e9577. doi: 10.1371/journal.pone.0009577. PMID: 20351778; PMCID: PMC2843629.
- 13- Salgado M, Zarate G, Coronel J, Comina G, Gilman RH, Sheen P, Oberhelman R, Zimic M. Low-cost 3D-printed inverted microscope to detect *Mycobacterium tuberculosis* in a MODS culture. *Tuberculosis (Edinb)*. 2022 Jan;132:102158. doi: 10.1016/j.tube.2021.102158. Epub 2021 Nov 30. PMID: 34864388; PMCID: PMC8818028.
- 14- Wu Y, Ozcan A. Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring. *Methods*. 2018 Mar 1;136: 4-16. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.08.013. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28864356.
- 15- Serabyn E, Liewer K, Lindensmith C, Wallace K, Nadeau J. Compact, lensless digital holographic microscope for remote microbiology. *Opt Express*. 2016 Dec 12;24(25):28540-28548. doi: 10.1364/OE.24.028540. PMID: 27958498.
- 16- Paquin P, Durmort C, Paulus C, Vernet T, Marcoux PR, Morales S. Spatio-temporal based deep learning for rapid detection and identification of bacterial colonies through lens-free microscopy time-lapses. *PLOS Digit Health*. 2022 Oct

5;1(10):e0000122. doi: 10.1371/journal.pdig.0000122. PMID: 36812631; PMCID: PMC9931332.

- 17- Julián E, Roldán M, Sánchez-Chardi A, Astola O, Agustí G, Luquin M. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *J Bacteriol.* 2010 Apr;192(7):1751-60. doi: 10.1128/JB.01485-09. Epub 2010 Jan 22. PMID: 20097851; PMCID: PMC2838037.
- 18- Solis L, Coronel J, Rueda D, Gilman RH, Sheen P, Zimic M. Evaluation of a lens-free imager to facilitate tuberculosis diagnostics in MODS. *Tuberculosis (Edinb).* 2016 Mar;97:26-32. doi: 10.1016/j.tube.2015.12.001. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26980492.
- 19- Allier C, Morel S, Vincent R, Ghenim L, Navarro F, Menneteau M, Bordy T, Hervé L, Cioni O, Gidrol X, Usson Y, Dinten JM. Imaging of dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy. *Cytometry A.* 2017 May;91(5):433-442. doi: 10.1002/cyto.a.23079. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28240818.