

Fluconazol como alternativa terapéutica en infecciones asociadas a *Mycobacterium tuberculosis*

Fluconazole as a therapeutic alternative in infections associated with *Mycobacterium tuberculosis*

Sandrea, L.¹; Ramírez, C.²; Romay, Z.³

¹Práctica Profesional de Bacteriología. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

²Licenciado en Bioanálisis. Universidad del Zulia.

^{1,3}Centro de Referencia Bacteriológica, Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.
Autor de correspondencia lsandreat@gmail.com

Resumen

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) es un microorganismo cuya importancia como agente infeccioso ha permanecido a través de los años, pero que se ha convertido en una emergencia y un grave problema de salud pública, como respuesta a la evolución en su comportamiento ante los antimicrobianos de primera línea para su tratamiento y al surgimiento de cepas multi-resistentes, lo que amerita el uso de alternativas terapéuticas que permitan su control. El objetivo del trabajo fue evaluar el comportamiento in vitro de *M. tuberculosis* ante el antimicótico fluconazol, para su posible uso como alternativa terapéutica. Para ello, se evaluaron 6 cepas de *M. tuberculosis*: 2 resistentes a rifampicina, 2 resistentes a isoniazida y 2 sensibles a ambos antimicrobianos, Se utilizó el método de Concentración Inhibitoria Mínima, utilizando la técnica en microplaca con Azul de Alamar y la técnica de dilución en tubo. Ambas metodologías mostraron sensibilidad ante bajas concentraciones de fluconazol (0,0625 µg/ml). Todas las cepas fueron sensibles a la combinación fluconazol/isoniazida; mientras que, a la combinación fluconazol/rifampicina mostraron resistencia, indicando el efecto antagónico de la rifampicina sobre el fluconazol. Los resultados permiten concluir y sugerir el posible uso terapéutico del fluconazol ante las infecciones asociadas por *M. tuberculosis*.

Palabras clave: Pruebas de sensibilidad microbiana; fluconazol; *Mycobacterium tuberculosis*; rifampicina; isoniazida.

Abstract

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) is a microorganism whose importance as an infectious agent has remained over the years but which has become a recent emergency and a serious public health problem in response to the evolution in its behavior against first-line antimicrobials, for its treatment and the emergence of multi-resistant strains, which require the use of therapeutic alternatives that allow its control. The objective of the work was to evaluate the in vitro behavior of *M. tuberculosis* before the antifungal agent fluconazole, for its possible use as a therapeutic alternative. To this, six strains were evaluated *M. tuberculosis*: 2 resistant to rifampicin, 2 resistant to isoniazid and 2 sensitive to both antimicrobials. We used the method of Minimum Inhibitory Concentration, using the microplate technique with Alamar Blue and the tube technique. Both methodologies showed sensitivity to low concentrations of fluconazole (0.0625 µg/ml). All strains were sensitive to the fluconazole / isoniazid combination; whereas, when exposed to the fluconazole / rifampicin combination, the strains showed resistance, indicating the antagonistic effect of rifampicin on fluconazole. The results allow us to conclude and suggest the possible therapeutic use of fluconazole against infections associated with *M. tuberculosis*.

Keywords: Microbial sensibility test; fluconazole; *Mycobacterium tuberculosis*; rifampin; isoniazid.

Introducción

La tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo (1). En 2016, 10,4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,7 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0,4 millones de personas con HIV). Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos, siendo India, Indonesia, China, Filipinas el Pakistán y Sudáfrica los países que acaparan el 64% de la mortalidad total (1).

Se estima que en 2016 enfermaron de tuberculosis un millón de niños y que 250.000 niños murieron debido a esta causa (incluidos los niños con tuberculosis asociada al VIH). De hecho, la tuberculosis es una de las causas principales de defunción en las personas VIH-positivas: en 2016, el 40% de las muertes asociadas al VIH se debieron a la tuberculosis (1).

La tuberculosis multirresistente (TB-MDR) sigue constituyendo una crisis de salud pública y una amenaza para la seguridad sanitaria. Según las estimaciones de la OMS (2018), hubo 600.000 nuevos casos de resistencia a la rifampicina (el fármaco de

primera línea más eficaz), 490.000 de los cuales padecían TB-MDR.

Se estima que entre 2000 y 2016 se salvaron 53 millones de vidas gracias a la dispensación de servicios de diagnóstico y tratamiento contra la tuberculosis (1).

El ritmo de disminución anual es de aproximadamente un 3% para la tasa mundial de mortalidad y un 2% para la incidencia; el 16% de los casos de TB mueren por esta causa. Estas cifras tendrían que aumentar al 4–5% y 10% anual, respectivamente, para que se pudieran alcanzar las metas fijadas para 2020 como estrategia para dar fin a la TB (2).

La mayoría de las muertes por TB podrían evitarse con un diagnóstico precoz y un tratamiento apropiado. Cada año se diagnostican y tratan eficazmente millones de personas con TB, lo que evita millones de muertes (53 millones entre 2000 y 2016), pero sigue habiendo grandes lagunas en la detección y el tratamiento (1).

Según lo reportado por la OMS (3), de los 9 millones de personas que se calcula que contrajeron la TB en 2013, más de la mitad (56%) pertenecían a las regiones de Asia Sudoriental

y el Pacífico Occidental, y una cuarta parte a África, donde también se presentó las mayores tasas de incidencia y mortalidad en relación con el tamaño de la población. Solo India y China representaron el 24% y el 11% de los casos, respectivamente.

Aunado a lo anterior, la coinfección con el VIH y TB, plantea uno de los principales desafíos mundiales para el control y prevención de estos procesos infecciosos (4). Se calcula en el 2013, 9 millones de personas contrajeron la enfermedad; y 1,5 millones, de los cuales 360.000 eran VIH-positivos, fallecieron por esta causa. La TB va decayendo lentamente de año en año y se calcula que entre 2000 y 2013 se salvaron 37 millones de vidas gracias a diagnósticos y tratamientos eficaces. Sin embargo, dado que la mayoría de las muertes por TB son evitables, la mortalidad de esta enfermedad sigue siendo alta (5).

La persistencia de la TB como problema de salud pública mundial se asocia a diversos factores, particularmente de índole socioeconómico y sanitario, entre los que destacan la pobreza y la marginalidad en la que vive una proporción importante de la población, la desnutrición, la falta de rigurosidad en la aplicación de los programas de control de la enfermedad, la crisis económica mundial, así como el impacto de la pandemia por el VIH, que ha venido a incrementar el número de casos de tuberculosis activa (6, 7). Venezuela no escapa de esta realidad donde las poblaciones marginales e indígenas tienen tasas de tuberculosis dos a tres veces mayor que la tasa nacional de TB, según la data del Programa Nacional venezolano contra la tuberculosis. Además, los mecanismos de control, prevención, diagnóstico y acceso a medicamentos constituyen un grave problema nacional (1,8).

Esta problemática se complica por la circulación de cepas de TB-MDR, que expresan resistencia a los fármacos considerados de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis, como son INH y RIF; así como también, a la reciente aparición de cepas extremadamente resistentes (TB-XDR), que son cepas TB-MDR con resistencia añadida a fluoroquinolonas y a alguna de las tres drogas inyectables consideradas de segunda línea

(amikacina, kanamicina y capreomicina) (9,10,11).

A nivel mundial, se estima que para el año 2013, la tuberculosis multirresistente (TB-MDR) ha afectado alrededor de 650.000 pacientes. La mala gestión del tratamiento de MDR-TB ha provocado el desarrollo de la tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR). En algunos países, la MDR / XDR-TB constituye una importante amenaza para la salud pública y pone en peligro la lucha contra la TB (12).

Es por ello, que se hace necesario tener acceso a nuevas alternativas terapéuticas que permitan controlar el repunte de la multidrogorresistencia observada en los últimos años en *M. tuberculosis*. Teniendo como base otros estudios que demuestran el posible potencial de los azoles contra los bacilos tuberculosos, tanto en cultivos in vitro, como en ratones infectados con el bacilo (13,14), la presente investigación se planteó como objetivo evaluar el comportamiento in vitro de *M. tuberculosis* ante el antimicótico Fluconazol, para su posible uso como alternativa terapéutica.

Material y Método

El trabajo de investigación fue de tipo descriptivo, aplicándose un diseño prospectivo y no experimental. La población estuvo representada por 6 cepas de *M. tuberculosis*, provenientes de pacientes sintomáticos de tuberculosis, atendidos en el Laboratorio “Dr. Rafael Paris” de la Coordinación Regional de Tuberculosis del Estado Zulia de la ciudad de Maracaibo, en el lapso de enero a junio del 2016. Las cepas de *M. tuberculosis* a estudiar fueron seleccionadas según los siguientes criterios: 2 cepas resistentes a isoniazida (*MtbRI*), 2 cepas resistentes a Rifampicina (*MtbRR*) y 2 cepas sensibles a todos los agentes antituberculosos (*MtbS*).

Detección de la Susceptibilidad y Resistencia a fluconazol, isoniazida y rifampicina (15). Preparación de la Solución madre o stock de las drogas: Las soluciones madres o stock de INH, RIF y fluconazol se prepararon a partir de la droga pura. Para el caso de INH, se disolvió 1mg

de la droga en 1 ml de agua destilada, para obtener una concentración de 10.000 µg/ml (10 mg/ml), luego se diluyó 1:100 para obtener una solución de 100 µg/ml, seguidamente se diluyó 1:100 para tener como concentración final una solución stock de 1 µg/ml.

La solución madre o stock de RIF se preparó pesando 300 mg (de la droga comercial de Rifadin (Sanofi), la cual fue disuelta en 3 ml de metanol, luego se diluyó en 7 ml de agua destilada estéril obteniendo una concentración de 30 mg/ml (30.000 µg/ml), luego se procedió a diluir 1:100 con agua destilada estéril para obtener una solución de 300 µg/ml seguidamente otra dilución 1:100 resultando la solución de stock de 3 µg/ml.

En relación al fluconazol, se tomó de la ampolla de fluconazol (Diflucan 2 mg/ml de Pfizer), 0,1 ml y se diluyó en 9,9 ml de agua destilada estéril para obtener una concentración de 20 µg/ml luego se realizó otra dilución 1:10 para obtener una solución Stock de 2 µg/ml.

Todas las soluciones se almacenaron separadas en alícuotas de 0,5 ml en tubos estériles de microcentrífuga a -20°C .

Preparación de la solución de trabajo: Se rotularon 6 tubos de micro centrifuga: STI (Solución de trabajo de INH); STR (Solución de trabajo de RIF); STF (Solución de trabajo de fluconazol); STI/F (Solución de trabajo de INH / fluconazol); STR/F (Solución de trabajo de RIF/ fluconazol) y SC (Solución Control).

Se colocó 990 µl del Caldo Middelbrook 7H9-OADC en todos los tubos STI; STR; STF y SC, y 980 µl en los tubos STI/F y STR/F.

Se agregó 10 µl de la solución Stock de INH al tubo STI; 10 µl de solución Stock de RIF al tubo STR; 10 µl de solución Stock de Fluconazol al tubo STF; 10 µl de solución Stock de Fluconazol al tubo STI/F más 10 µl de la solución Stock de INH; y 10 µl de solución Stock de Fluconazol al tubo STR/F más 10 µl de la solución Stock de RIF. Al tubo Control (SC), no se agregó ningún antibiótico.

Preparación del Inoculo: Se mezcló 10 ml de agua destilada estéril y 40 µl de Tween

80 estéril en un tubo estéril (concentración final: 0,04%). Esta suspensión fue llamada solución A. Con una espátula se tomó de cada cepa *M. tuberculosis* en estudio, cultivada en Lowenstein-Jensen, la mayor cantidad posible de las colonias y se suspendió en un tubo estéril conteniendo 100 µl de la solución A, se mezcló y dejó reposar durante 5 minutos.

Se agregó 3 ml de la solución A y mezcló por 20 segundos hasta que la suspensión adquirió una turbidez uniforme (comparable con MacFarland Nro. 1), y se dejó reposar por 30 minutos. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril. De esta solución se tomó 5 µl y se colocó en un tubo con 5 ml del medio Middelbrook 7H9-OADC, siendo esta la suspensión del Inoculo lista para su uso.

A partir de estas soluciones de trabajo preparadas para cada droga y de la suspensión del inóculo de *Mtb*, se realizó la prueba colorimétrica de microplaca con azul de Alamar y la prueba en tubos con el fin de detectar su comportamiento ante las drogas rifampicina, isoniazida y fluconazol.

Prueba colorimétrica de microplaca con Azul de Alamar. (16): Esta prueba, también llamada de óxido – reducción, está basada en la reducción del indicador añadido (Azul de alamar) al medio de cultivo luego de que el *M. tuberculosis* ha sido expuesto in vitro a diferentes antibióticos; logrando detectar la resistencia con el cambio del color del indicador.

Para la prueba, se rotuló la microplaca con 48 pozos, marcándose las columnas y las filas de los pozos de la siguiente manera: Columnas 1 y 2: *MtbRI*_{1y2}; Columnas 3 y 4: *MtbRR*_{1y2}; Columnas 5 y 6: *MtbS*_{1y2}. Se rotularon las filas con las letras: A, B, C, D, E, F y G.

Se agregó a todos los pozos 100 µl de la suspensión del inoculo preparadas anteriormente en cada columna, respectivamente. Se agregó 100 µl de la SC en los pozos de la fila G, como control del proceso.

Posteriormente, se agregó 100 µl de STI en la fila A; 100 ul de STR en la fila B; 100 µl de STF en la fila C; 100 µl de STF/I en la fila D; 100 µl de STF/R en la fila E; y 100 µl de STF/

I/R. En los pozos sin usar alrededor de la placa se dispuso agua destilada estéril para evitar la sequedad de la microplaca.

Se selló la placa con papel parafinado y se incubó a 37 °C durante 8 días. El séptimo día de incubación se dispuso en cada micropozo 20 µl de resazurina y 12 µl de Tween 80 al 20%. La placa fue leída al siguiente día.

El crecimiento de *M. tuberculosis* en la microplaca fue visualizado por un color rosado, mientras que un resultado negativo fue definido por la presencia del color azul.

Detección de la Concentración Inhibitoria Mínima mediante la técnica de dilución en tubo. Para realizar este método se empleó el Caldo Middelbrook con los antimicrobianos: isoniazida, rifampicina y fluconazol, utilizando un caldo sin droga como control. Se utilizaron las mismas para preparar las diluciones al doble se utilizó la solución de trabajo o la solución madre de trabajo de cada droga y la suspensión del inóculo preparadas anteriormente. Se realizaron diluciones al doble de las drogas estudiadas a diferentes concentraciones en tubos conteniendo 10 ml de caldo Middelbrook (Tabla 1)

Tabla 1. Diluciones de las drogas estudiadas

Drogas Estudiadas		Concentración de la Droga (µg/ml)						
IZN	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0	
RIF	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0	
FLU	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0	
FLU/IZN	2,0/1,0	1,0/0,5	0,5/0,25	0,25/0,125	0,125/0,0625	0,0625/0,0312	0,0	
FLU/RIF	2,0/1,0	1,0/0,5	0,5/0,25	0,25/0,125	0,125/0,0625	0,0625/0,0312	0,0	

IZN: isoniazida; RIF: rifampicina; FLU: fluconazol

Los caldos fueron inoculados con 100 µl de la suspensión del inóculo de las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas. Los medios fueron incubados a 37 °C durante 8 días. Los tubos fueron visualizados por la turbidez del medio líquido. Se consideró como concentración inhibitoria mínima del fármaco aquella donde no se observó turbidez del medio indicando que inhibió el crecimiento del microorganismo. Esta prueba fue realizada por duplicado para asegurar los resultados de la misma, así como también fueron utilizados dos medios de control tanto positivo como negativo sin antibióticos para garantizar la viabilidad de la cepa estudiada. Los puntos de corte considerados para determinar la resistencia a la isoniazida: fueron: sensible (CIM <0,062 µg/ml), baja resistencia (CIM 0,125 – 0,5 µg/ml) y alta resistencia (CIM a 1,0 µg/ml). Las cepas fueron consideradas resistentes

a rifampicina de bajo nivel (CIM a 0,062 µg/ml) y alta resistencia (CIM >2 µg/ml). Para el fluconazol se utilizaron los puntos de cortes de sensibilidad (CIM <0,062 µg/ml) y resistencia (CIM >2 µg/ml) (17).

Resultados

Como se muestra en la figura 1, se confirmó la resistencia a isoniazida y rifampicina en las cepas de *MtbRI* (pozos marcados con el número 1) y *MtbRR* (pozos marcados con el número 5) (color rosado, respectivamente). Además, estas cepas al ser expuestas a la combinación de la isoniazida/fluconazol (pozos 10) fueron sensibles; mientras que, cuando fueron expuestas a la rifampicina/fluconazol (pozos 14), así como también a la combinación fluconazol/

rifampicina/isoniazida, las cepas resultaron resistentes (Fig. 1).

COLUMNNAS		1	2	3	4	5	6
FILAS	Cepas	MtRI-1	MtRI-2	MtRR-1	MtRR-2	MtS-1	MtS-2
	Sln Trabajo						
A	STI	1	1	2	2	3	3
B	STR	4	4	5	5	6	6
C	STF	7	7	8	8	9	9 X
D	STF/I	10	10	11	11	12	12
E	STF/R	13	13	14	14 X	15	15
F	STF/I/R	16	16 X	17	17	18	18
G	SC	19	19	20	20	21	21

Figura 1. Comportamiento de las cepas estudiadas ante las drogas isoniacida, rifampicina y fluconazol.

Color rosado: resistencia a la droga; Color azul: sensibilidad a la droga; *MtRI*: *M. tuberculosis* Resistente a Isoniazida; *MtRR*: *M. tuberculosis* Resistente a Rifampicina; *MtS*: *M. tuberculosis* Sensible a Isoniazida y Rifampicina; STI: Solución de Trabajo Isoniazida; STR: Solución de Trabajo Rifampicina; STF: Solución de Trabajo Fluconazol; STF/I: solución de Trabajo Isoniazida y Fluconazol; STF/R: Solución de Trabajo Rifampicina y Fluconazol; SC: Solución Control; Sln: Solución; X: pozos no tomados en consideración por no haber crecimiento.

En la Tabla 2, se muestran los resultados de la CIM obtenidos, en las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas, a las drogas rifampicina, isoniazida y fluconazol. En ella se observa resultados similares a los encontrados con la prueba Azul de Alamar (Fig. 1); sin embargo, con esta metodología no fue probada la susceptibilidad o resistencia de la bacteria ante la combinación fluconazol/rifampicina/isoniazida.

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ante las drogas probadas.

Cepa	DROGA				
	Rifampicina (µg/ml)	Isoniazida (µg/ml)	Fluconazol (µg/ml)	Fluconazol / Rifampicina (µg/ml)	Fluconazol / Isoniazida (µg/ml)
<i>MtbRR</i>	>2 (R)	0,0312 (S)	0,0625 (S)	>2 / >2 (R)	0,0625 / 0,0312 (S)
<i>MtbRI</i>	0,0625 (S)	>1 (R)	0,0625 (S)	>2 / >2 (R)	0,0625 / 0,0312 (S)
<i>Mtbs</i>	0,0312 (S)	0,0625 (S)	0,0625 (S)	>2 / >2 (R)	0,0625 / 0,0312 (S)

MtbRR: *M. tuberculosis* Resistente a Rifampicina; *MtbRI*: *M. tuberculosis* Resistente a Isoniacida; *MtbRI/RR*: *M. tuberculosis* resistente a Isoniacida y a Rifampicina; *Mtbs*: *M. tuberculosis* Sensible a Rifampicina e isoniacida; (R): Resistencia; (S): Sensibilidad.

Discusión

Como se observa en la figura 1 y en la tabla 2, las cepas estudiadas tuvieron comportamientos similares en ambas pruebas Azul de Alamar y prueba de dilución en tubo). Todas las cepas de *M. tuberculosis* (*MtbRR*; *MtbRI* y *Mtbs*) mostraron sensibilidad a bajas concentraciones de fluconazol (0,0625 µg/ml), resultados estos similares a los reportados por Ahmad y col (15), quienes evaluaron la actividad de dos azoles

sobre *Mycobacterium tuberculosis*, detectando una CIM de 0,120 µg/ml, poniendo en evidencia el potente papel inhibitor de los azoles sobre *M. tuberculosis*.

Se ha indicado el efecto antagónico de la rifampicina sobre la acción del fluconazol, donde se asegura que estos antituberculosos producen cambios en los parámetros farmacocinéticos del azol, incluyendo, la tasa de eliminación, el acortamiento de su vida media, disminución

en el área de la curva de tiempo/ concentración plasmática; así como también, disminución de la concentración máxima (19, 20, 21).

De igual modo, Fica (22) señala que los niveles plasmáticos de los compuestos triazólicos, como el fluconazol, pueden disminuir cuando otros compuestos aumentan significativamente la degradación de Ellos, provocando fracaso terapéutico, como ocurre con inductores del sistema microsomal hepático tales como rifampicina, que puede reducir en forma significativa (> 25%) la concentración plasmática del fluconazol. Otros autores son más específicos y han atribuido el efecto de la rifampicina sobre el azol a la predilección del antituberculoso por el citocromo P450 CYP3A4 (23, 24). De hecho, se ha aseverado que la inhibición de las enzimas del citocromo P-450 es el mecanismo que provoca la mayoría de las interacciones farmacocinéticas de los azoles con otros fármacos, lo que ocasiona una disminución del metabolismo de numerosas sustancias activas que requieren enzimas sintetizadas por el citocromo P-450, como es el caso de los antituberculosos (25).

En relación a ello, investigadores han encontrado una disminución estadísticamente significativa de la vida media (52%) y un 93% de depuración corporal total de fluconazol en pacientes tratados con rifampicina, los autores concluyeron que si es inevitable la administración concomitante de ambas drogas, esta debe ser monitoreada para evitar fallas en el tratamiento (20).

Otros autores han aseverado que los compuestos azólicos inhiben el metabolismo de otros compuestos debido a su interferencia con diferentes isoenzimas del complejo citocromo P-450 bacteriano, trayendo como resultado neto un potencial aumento de los niveles plasmáticos de otros fármacos facilitando la aparición de efectos adversos (22, 26). Sin embargo, la intensidad de este efecto depende del compuesto en particular y de las isoenzimas inhibidas, ya que como lo señalan Pea y Furlanut (27), en un determinado paciente coexisten al menos 3 sistemas citocromales P-450 (CYP1, CYP2 y CYP3) pudiendo tener cada uno de ellos diferentes isoenzimas.

De igual modo, otros estudios han considerado la sinergia entre ambas drogas (antituberculosos y azoles), como los realizados por Narang y col (30), quienes encontraron que los pacientes que recibían rifampicina y fluconazol tuvieron menos episodios de bacteriemia por *M. avium* complex que los pacientes que recibieron sólo rifampicina; señalando los autores que esto puede ser atribuido a la predilección del antituberculoso por el citocromo P450 CYP3A4 (23, 24).

Es bien sabido que los azoles inhiben la síntesis de ergosterol mediante la interacción con la enzima lanosterol 14 a' desmetilasa dependiente del citocromo P-450, necesaria para la conversión de lanosterol en ergosterol sustancia que altera la membrana celular, reduciendo la actividad enzimática asociada a ella y aumentando su permeabilidad, lo que provoca la inhibición del crecimiento y la replicación celular (25, 29).

Los resultados obtenidos en la presente investigación demostraron que a bajas concentraciones, el fluconazol es un potente inhibidor de *M. tuberculosis*, lo cual evidencia que este azol puede constituir una alternativa para el tratamiento de la TB; así como también, su posible asociación con las drogas antituberculosas, como la isoniazida y rifampicina.

Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa, Tuberculosis. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
2. Organización Mundial de la Salud. Informa mundial sobre la Tuberculosis 2017. Disponible en: http://www.who.int/campaigns/tb-day/2018/exe_summary_es.pdf

3. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. Informe mundial sobre la tuberculosis 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_execsummary_summary_es.pdf
4. Turner R.; Bothamley G. Cough and the transmission of tuberculosis. *The J Infect Dis.* 2015;211(9): 1367-1372.
5. Yan S, Chen L, Wu W, Fu Z, Zhang H, Li Z et al. Early versus Delayed Antiretroviral Therapy for HIV and Tuberculosis Co-Infected Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLOS ONE.* 2015; 10(5): e0127645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127645>
6. Lemus, D. 2007. Métodos rápidos para la detección de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de grado para optar al título de Doctor en Ciencias de la Salud. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IMTPK). La Habana: 136p.
7. Jurado, L.; Murcia M.; Hidalgo P.; Leguizamón J.; Gonzales L. Phenotypic and genotypic diagnosis of bone and miliary tuberculosis in an HIV positive patient in Bogotá, Colombia. *Biomedica,* 2014;35(1): 8-15.
8. Patiño, M.; Abadia, E.; Gómez, S.; Maes, M.; Muñoz, M.; Gómez, D.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* population structure and molecular epidemiological analysis in Sucre municipality, Miranda state, Venezuela. 2017; *Invest clin.* 55: 32-51.
9. Wang, D.; Yang, C.; Kuang, T.; Lei, H.; Meng, X.; Tong, A.; et al. Prevalence of multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in Beijing, China hospital-based retrospective study. *Japanese J Infect Dis.* 2010;63(5): 368-371.
10. Kant, S.; Maurya, A.; Kushwaha, R.; Nag, V.; Prasad, R. Multi-drug resistant tuberculosis: an iatrogenic problem. *Biosci Trends.* 2010;4(2): 48-55.
11. Eldhom, V.; Monteserin, J.; Rieux, A.; Rieux, A.; López, B.; Sobkowiak, B.; et al. Four decades of transmission of a multidrugs-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. *Nat Commun.* 2015;6:7119.
12. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). 2013. Eliminación de la TB. Tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB). Disponible en: <http://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/drtb/xdrtbspanish.pdf>
13. Lewis, J. M., & Sloan, D. J. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management.* 2015;11, 779-791.
14. Imperiale, B.R.; Cataldi, A.A.; Morcillo N.S. In vitro anti-tuberculosis activity of azole drugs against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Rev Argent Microbiol,* 2017;49(4):332-338.
15. Ahmad, Z., Sharma, S. & Khuller, G. K. The potential of azole antifungals against latent/persistent tuberculosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;258, 200-203.
16. Yajko, D.; Madej, J.; Lancaster, M.; Sanders, C.; Cawthon V.; Gee, B.; et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2324-2327
17. McLean, K.; Marshall, K.; Richmond, A.; Hunter, I.; Fowler, K.; Kieser, T.; et al. Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 mono-oxygenases and bacterial growth in *Mycobacterium* and *Streptomyces*. *Microbiol.* 2002;148: 2937-2949.

18. Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. 2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/index.htm>
19. Lazar, J.; Wilner, K. Drug interactions with fluconazole. *Rev Infect Dis.* 1990;12(3):327-333.
20. Nicolau, D.; Crowe, H.; Nidhtingale, C.; Quintiliani, R. Rifampicin-fluconazol interaction in critically ill patients. *Ann Pharmacother.* 1995;29(10):994-996.
21. Panomvana, A.; Thanompuangseeree, N.; Tansuphaswadikul, S. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of fluconazole in patients with AIDS. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(11):724-732.
22. Fica, C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: Fluconazol, Itraconazol y Voriconazol. *Rev Chilena Infectol.* 2004;21(1):26.
23. Tucker, R.; Denning, D.; Hanson, L.; Rinaldi, M.; Graybill, J.; Sharkey, P.; et al. Interaction of azoles with rifampin, phenytoin, and carbamazepine: in vitro and clinical observations. *Clin Infect Dis.* 1992;14(1): 165-174.
24. Fernández, A.; Hernández, D.; Londofio, A.; López, C.; Pineda, Y.; Wolff, J.; et al. Interacciones medicamentosas en pacientes bajo tratamiento con itraconazol para diferentes tipos de micosis. *Biornédica.* 1999;9(4):286-296.
25. Viudes, A.; Peman, J.; Canton, E.; Ubeda, P.; Gobernado, M. Actualización de las interacciones farmacológicas de los antifúngicos sistémicos. *Rev Esp Quimioter.* 1999;12(2).
26. Ruiz, N.; Arriaga, M.; Ocharán, M.; Sánchez, J.; Pérez, E.; Montes, M.; et al. Aspectos farmacocinéticos del fluconazol. *Rev Hosp Juárez de Méx.* 2013;80(1): 28-33.
27. Pea, F.; Furlanut, M. Pharmacokinetic aspects of treating infections in the intensive care unit. Focus on drug interactions. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(11): 833-868.
28. Narang, P.; Trapnell C.; Schoenfelder J.; Lavelle J.; Blanchine, J. Fluconazole and enhanced effect of rifabutin prophylaxis. *New England Journal Medical.* 1994;330: 1316-1317.
29. Seward, H.; Roujeinikova, A.; McLean, K.; Munro, A.; Leys D. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* P450 CYP121-fluconazole complex reveals new azole drug-P450 binding mode. *J Biol Chem.* 2006;281(51): 39437-43
30. Ahmad, Z.; Sharma, S.; Khuller, G.K. In vitro and ex vivo antimicrobial potential of azole drugs against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEMS Microbiol.* 2005;251: 19-22.