

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA Y PERFIL GENÉTICO DE  
CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* AISLADAS DE PACIENTES  
QUE ACUDIERON AL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS  
DURANTE EL AÑO 2002.**

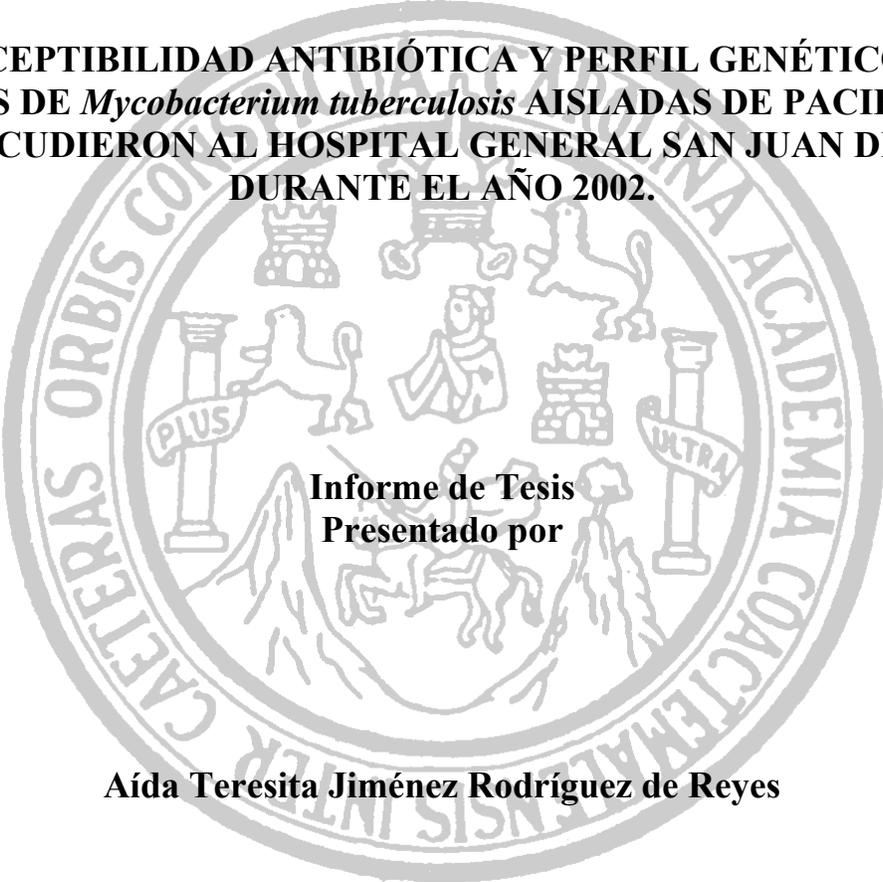
**AÍDA TERESITA JIMÉNEZ RODRÍGUEZ DE REYES**

**Química Bióloga**

**GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2004.**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA Y PERFIL GENÉTICO DE  
CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* AISLADAS DE PACIENTES  
QUE ACUDIERON AL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS  
DURANTE EL AÑO 2002.**

The seal of the Universidad de San Carlos de Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, surrounded by various symbols including a lion, a castle, and a cross. The text "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CAETERAS ORBIS COLONIA" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Informe de Tesis  
Presentado por**

**Aída Teresita Jiménez Rodríguez de Reyes**

**Para optar al título de  
Química Bióloga**

**GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2004.**

## **JUNTA DIRECTIVA**

MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Roberto José Garnica Marroquín	Vocal IV
Br. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal V

## **ACTO QUE DEDICO**

A Dios y la Virgen María

Por todo el bien que le han hecho a mi vida permitiéndome culminar los estudios de mi carrera universitaria.

A mis dos amores

Edin y mi pequeña Andrea Salomé por darme fortaleza, amor y paz en mi camino.

A mis padres

Luís Rodolfo Jiménez y María Teresa Rodríguez de Jiménez por su apoyo incondicional, su ejemplo, amor y comprensión.

A mis hermanos

Juan Ramón y Ana Isabel por compartir y acompañarme en esta etapa de mi vida.

A mi amiga Dalia por su amistad, sus enseñanzas y apoyo tanto en mi vida personal como en la elaboración de este estudio.

A mis amigos universitarios

Claudia, Evelyn, Margia, Lucky, Carmen, Renato, Débora, Tania, Verónica, Fabiola, por todos los momentos que compartimos a lo largo de nuestra carrera y quienes han dejado una huella para siempre en mi vida.

A mis asesoras de Tesis

MSc. Blanca Samayoa, MSc. Ana María Xet, Licda. Dalia Lau Bonilla, no solamente por su asesoramiento en este estudio sino por su amistad y apoyo en todo momento.

A todos mis catedráticos universitarios

Por todos los conocimientos transmitidos hacia mi persona para hacerme una buena profesional.

A todos mis catedráticos de práctica de EDC y EPS

Porque fue a través de ellos por quienes puse en práctica los conocimientos que son la base de mi carrera.

## AGRADECIMIENTO

A mis padrinos de Graduación

Lic. Luís Rodolfo Jiménez Solórzano

Licda. Dalia Mei Ling Lau Bonilla

Por el ejemplo de dedicación y esfuerzo que me enseñaron a cultivar y que día a día manifiesto en mi vida.

A la “Clínica Familiar Luís Ángel García”

Por permitirme ser parte de todos ustedes y al mismo tiempo humanizar más mi vida sirviendo a las personas viviendo con VIH/SIDA.

A la Licda. Tamara Velásquez Porta

Por todos los conocimientos transmitidos y apoyo en todo momento.

A mis revisores de Tesis

Licda. María Luisa García de López

Lic. Martín Néstor Gil Cabrera

Por haber guiado mi estudio de tesis.

Al equipo de la Escuela de Biología

Licda. Antonieta Rodas Retana

Licda. Patricia Landaverde

Licda. Claudia Calderón García y

MSc. Sergio Melgar Valladares,

Por su valiosa colaboración y el tiempo dedicado para la finalización de la parte genética en este estudio.

A Fundación Marco Antonio

Por la fe que han depositado en mí, su apoyo y su paciencia.

## INDICE

	Página
I. Resumen	01
II. Introducción	02
III. Antecedentes	04
A. Epidemiología de la tuberculosis	04
B. Características de <i>M. tuberculosis</i>	05
C. Transmisión	06
D. Síntomas	07
E. Diagnóstico	08
F. Susceptibilidad antibiótica (Método indirecto de las proporciones)	11
G. Tratamiento	12
H. Tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB)	14
I. Epidemiología molecular de tuberculosis	19
J. MDR-TB y perfiles genéticos	22
IV. Justificación	24
V. Objetivos	25
VI. Hipótesis	26
VII. Materiales y Métodos	27
VIII. Resultados	34
IX. Discusión de resultados	44
X. Conclusiones	50
XI. Recomendaciones	51
XII. Referencias	52
XIII. Anexos	58

## I. RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad reemergente causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* y que infecta a un tercio de la población mundial.

Los principales objetivos de este estudio fueron determinar la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *M. tuberculosis*, identificar la presencia de cepas multirresistentes y caracterizar los perfiles genéticos de las cepas comparándolos con los datos epidemiológicos y la susceptibilidad antibiótica.

Se estudiaron 95 cepas caracterizadas como *M. tuberculosis* de los pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002. Para realizar la susceptibilidad antibiótica se utilizó el método directo de las proporciones y para el análisis genético, la técnica de DRE-PCR. Para recaudar la información epidemiológica se acudió a la entrevista directa con los pacientes y la revisión de expedientes clínicos. Los resultados se almacenaron en el programa Epi info 6 y fueron analizados a través de un análisis de frecuencias y univariado con uso de la prueba de Chi cuadrado y t student cuando fuera necesario. Ambas a un nivel de significancia del 0.05 ( $\alpha= 0.05$ ).

Los resultados obtenidos describen a una población que en su mayoría fueron hombres, entre 26-45 años y provenientes principalmente de Guatemala, Suchitepequez y Escuintla. La mayoría de pacientes estaban hospitalizados y 61% eran PVVS. De la muestra que más se aislaron micobacterias fue de esputo (55%) y de las 95 cepas aisladas, 81 (85.3%) fueron identificadas como *M. tuberculosis*. Sesenta y un (82.4%) cepas fueron susceptibles y 13 (17.6%) presentaron algún tipo de resistencia, siendo cinco cepas las caracterizadas como tuberculosis multidroga-resistente (MDRTB). De estas 13 cepas, 9 pertenecían a PVVS. Para el análisis genético fue posible procesar 89 muestras, de las cuales 64 amplificaron y de ellas 41 formaron patrones genéticos agrupados que indicaron una infección reciente y 23 formaron patrones únicos que sugieren una reactivación de una infección pasada. Se concluye que la mayoría de estos casos de TB se deben a infecciones recientemente adquiridas y por ende significa que en Guatemala la transmisión de la misma es continua y poco controlada, por lo que se recomienda crear nuevos y funcionales programas de salud para disminuir los casos de TB principalmente multidroga-resistente e incluir la población con VIH+TB como una prioridad, debido a que la probabilidad de infectarse se incrementa de un 17-37% tras la exposición a este microorganismo.

## II. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, llamado también bacilo de Koch. Es una de las principales causas de muerte alrededor del mundo; en la que se estima que cada año existen 8.8 millones de casos nuevos.

En Guatemala, la incidencia para el año 2000 fue de 22.57/100,000 habitantes que corresponden a 1623 casos. La aparición del VIH ha acelerado la propagación de la tuberculosis, aumentando hasta 30 veces el factor de riesgo que en la población en general.

Esta enfermedad se transmite principalmente por el aire, de una persona a otra al toser, estornudar o hablar. La persona infectada puede desarrollar una infección latente en la que no se presentan síntomas, o una infección activa, dependiendo de su estado inmune.

El diagnóstico clínico está basado en la sintomatología y rayos X de tórax; en el laboratorio éste se fundamenta en el examen de la piel PPD<sup>1</sup>, la presencia de bacilos alcohol ácido resistentes y el aislamiento de *M. tuberculosis*. Existen otros métodos diagnósticos más avanzados pero son menos utilizados actualmente.

Para el tratamiento se utilizan varios medicamentos para evitar la aparición de resistencias por mutaciones naturales en la micobacterias. Las drogas de primera línea son rifampicina, isoniacida, estreptomycin, pirazinamida y etambutol; entre las drogas de segunda línea se pueden citar la ofloxacina, cicloserina y etionamida. Todas las drogas tienen cierto grado de toxicidad pero son relativamente seguras y pocos efectos secundarios.

El uso inadecuado de estos medicamentos son la principal causa de la tuberculosis multidroga resistente (MDR-TB), un problema que se incrementa constantemente a nivel mundial a causa de la epidemia del VIH/SIDA y el deterioro en la infraestructura de salud pública, entre otros. La terapia en estos pacientes es más larga, más tóxica y más cara que una terapia de tuberculosis susceptible.

Es por ello que la determinación de la susceptibilidad antibiótica ha llegado a ser una herramienta útil e importante, principalmente en pacientes que no responden a tratamiento y que por lo tanto se sospecha que están infectados con cepas resistentes de

-----  
<sup>1</sup>Derivado purificado de proteína (PPD por sus siglas en inglés)

*M. tuberculosis* a una o más drogas. A nivel de salud pública la misma se utiliza para establecer la presencia de cepas resistentes que circulan en la población general.

En Guatemala existen muy pocos estudios de multirresistencia a drogas de *M. tuberculosis*, además de no contar con los perfiles genéticos de estos microorganismos.

Una técnica utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el método de DRE-PCR que está basado en la amplificación de los segmentos de ADN de la micobacteria localizados entre dos copias de elementos repetidos, el IS6110 y la secuencia repetitiva polimórfica rica en guanina-citocina (PGRS).

La aplicación de este método puede proveer importante información: se puede interpretar qué patrones de cepas de *M. tuberculosis* están relacionados genética y epidemiológicamente y si existe o no una correlación directa entre una cepa y otra y distinguir multirresistencia antibiótica.

En este estudio se propuso identificar y definir las huellas genéticas de cepas de *M. tuberculosis* en Guatemala, determinar si existe resistencia asociada a cepas con patrones genéticos individuales o agrupados, hacer un análisis epidemiológico entre los perfiles genéticos y la susceptibilidad antibiótica obtenida.

Estos objetivos se alcanzaron utilizando la técnica de DRE-PCR, el método directo de las proporciones para determinar la resistencia y la revisión de historias clínicas de cada uno de los pacientes pertenecientes a estas cepas, respectivamente.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Epidemiología de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, transmisible, causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (1-4) o también bacilo de Koch (del nombre Roberto Koch, médico que lo identificó por primera vez en el año de 1882) (2,5,6) y en menor grado por *Micobacterium bovis* y *Micobacterium africanum* (3,5,7).

En la última década, la TB se ha convertido en una enfermedad reemergente y una de las principales causas de muerte (3 millones anualmente alrededor del mundo) (3,5-8). Se estima que cada año existen 8.8 millones de nuevos casos, lo que corresponde a 52,000 muertes por semana o más de 7,000 casos por día, que se traduce en más de 1,000 nuevos casos cada hora, cada día (3,4,7-12). La TB es el mayor problema de salud pública alrededor del mundo (4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 1999, en las Américas existían más de 117 millones de personas infectadas, se reportaron 560,000 casos nuevos y 220,000 muertes. En el año 2000 se reportó 233,558 casos en 37 países, con una tasa de 28/100,000 habitantes, sin embargo debe considerarse el subregistro que en algunos países alcanza hasta el 80%, por lo que este dato puede llegar a cuadruplicarse (13).

En Guatemala la incidencia de TB alcanzó una tasa de 22.57/100,000 habitantes, en el año 2000, que correspondieron a un total de 1643 casos; aunque lo estimado por la OMS fue de 108/100,000 habitantes (80.7%) (3). En un reporte publicado en 1996, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) incluyó a Guatemala entre nueve naciones de Latinoamérica que afrontaban severas tasas de incidencia de TB sobre 85/100,000 habitantes (14).

La población más afectada es aquella que se encuentra en la etapa económicamente productiva, entre 15 y 49 años. La epidemia del SIDA y la declinación de los estándares socioeconómicos han contribuido al resurgimiento de la enfermedad en naciones industrializadas (4,5,15,16). Otros factores importantes incluyen pobreza, incremento de emigrantes y un soporte inadecuado, tanto de la infraestructura de salud pública como en los programas de control para TB (8,17,18).

La emergencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) no solo ha acelerado la propagación de la TB y producido un impacto dramático en la epidemiología sino ha influido en la historia natural de la enfermedad desde principios de los años ochenta (3,8,15).

Este virus destruye los mecanismos de defensa del organismo, aumentando hasta 30 veces el riesgo de enfermarse de TB y de transmitir la enfermedad (3). La experiencia clínica indica que del 25-50% de todos los pacientes con infección por VIH enfermarán de TB a lo largo de su vida (2).

Desde el inicio de 1994 el diagnóstico de TB pulmonar en un paciente seropositivo a VIH constituye un “caso de SIDA” a efectos de vigilancia epidemiológica. En España, durante el año 1995 se notificó 20.4% de TB extrapulmonar, 20.1% de TB pulmonar y 2.2% de otras enfermedades causadas por micobacterias en los pacientes con SIDA (2).

En la actualidad estar infectado con VIH constituye el mayor factor de riesgo para sufrir una TB (2,8). En Nueva York, en el año de 1995, de 2,445 casos nuevos de tuberculosis, 33% fueron reportados en pacientes VIH seropositivos, 31% en pacientes VIH seronegativos y el resto en pacientes sin datos serológicos (8).

## B. Características de *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* es un bacilo aerobio estricto, no esporulador e inmóvil que mide 0.2-0.6 x 1-10  $\mu\text{m}$ . Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y es resistente al frío, congelación y desecación. Se desarrolla lentamente, requiere 3-8 semanas para su aislamiento. Las colonias típicas se observan con apariencia rugosa, color crema a amarillo y bien adheridas al medio (2,4,5,19,20,21).

La pared celular es rica en lípidos, por lo que su superficie es hidrófoba; razón por la que las micobacterias son resistentes a muchos desinfectantes y tinciones de laboratorio, así mismo son resistentes a la decoloración con ácidos, de donde proviene el nombre de **bacilos acidorresistentes** (19-21).

### C. Transmisión:

La TB se propaga a través de aerosoles de una persona a otra al toser, estornudar o hablar. Las personas que inhalan estas bacterias pueden llegar a infectarse (1,2,4,5,11,19,21). Una ruta de transmisión menos común incluye aquella por alimentos contaminados (usualmente leche) o por una inoculación directa (trabajadores de la salud) (4,5,21).

Presentar la infección de TB significa que las bacterias están en el cuerpo, pero en estado “inactivo”. En la mayoría de los casos, después de que las bacterias de la TB entran en el cuerpo, las defensas del mismo las controlan, creando una pared alrededor de ellas. Las micobacterias pueden permanecer vivas dentro de estas paredes en un estado inactivo por años. Mientras estén de esta forma, no pueden hacer daño, ni contagiar a otras personas. La persona está infectada pero no enferma de TB (1,2). A esta forma se le llama *tuberculosis latente* (1).

Muchas personas que tienen TB latente nunca desarrollarán la enfermedad, pero en otras, debido a factores predisponentes<sup>1</sup>, la bacteria puede activarse y causar la enfermedad (1,2,21); por esta razón se considera como una de las infecciones oportunistas más comunes en las personas que viven con VIH/SIDA (PVVS); se estima que estar infectado con el VIH incrementa 113 veces el factor de riesgo para desarrollar una tuberculosis activa y la enfermedad del SIDA 170 veces (*ver anexo 1*) (5,8,22,23,24).

La bacteria puede depositarse primariamente en los pulmones, que es la forma más común (80-85% de los casos), comenzar a extenderse a través de la sangre a la forma extrapulmonar que incluye, por ejemplo, en orden de frecuencia: TB pleural, linfática, urogenital, osteoarticular, meníngea y miliar (representa diseminación hematogena de la enfermedad) aunque cualquier órgano o tejido del organismo puede ser afectado (1,4,5,21).

En los pulmones, *M. tuberculosis* infecta a los macrófagos alveolares, donde los bacilos comienzan a multiplicarse y acaban destruyendo las células fagocitarias. De esta manera, se produce un ciclo posterior de fagocitosis por los macrófagos y linfocitos, que emigran hacia el foco de infección; finalmente se produce la destrucción celular. Los macrófagos infectados diseminan el proceso hacia los ganglios linfáticos locales en la fase inicial de la enfermedad, así como hacia el torrente circulatorio y otros tejidos (4,22).

-----

<sup>1</sup>Edad, bajo peso, una enfermedad grave, abuso de drogas o alcohol, sistema inmune deficiente.

Después de desarrollar una inmunidad adquirida por el hospedero, los macrófagos son activados por los linfocitos T para matar a los bacilos intracelulares y regular la multiplicación de *M. tuberculosis*. En la lesión pulmonar o en cualquier otro sitio en el que el bacilo se haya desarrollado, un granuloma tuberculoide característico, puede formar una lesión cronicante e inactivar así los bacilos (4). Al detenerse la infección en esta fase, los únicos signos de infección son una prueba cutánea positiva que se mantiene durante toda la vida y los signos radiológicos de calcificación de los focos inicialmente activos en el pulmón u otros órganos (19).

La reactivación de los bacilos latentes puede ocurrir años después de que desaparezca la respuesta inmunológica, ya sea como consecuencia del envejecimiento, enfermedades inmunosupresoras (p. e. diabetes, cáncer, leucemia, enfermedad de Hodgkin, VIH) y/o ciertos tratamientos o sustancias de abuso (1,5,19).

#### D. Síntomas:

La TB carece de manifestaciones clínicas propias que permitan diferenciarla de otras enfermedades respiratorias, como por ejemplo aquéllas causadas por hongos. El comienzo es, la mayoría de las ocasiones, insidioso y poco alarmante por lo que pueden pasar varios meses hasta que se llegue al diagnóstico de certeza. De ahí la importancia que el médico ponga en marcha las exploraciones complementarias ante la más mínima sospecha clínica y que sea necesario conocer a la perfección los síntomas y signos sugestivos de la TB, hecho que conllevará una mayor sospecha de la enfermedad haciendo a la vez un diagnóstico diferencial y precoz. Los signos y síntomas dependen del lugar en el que la bacteria esté situada (5,19).

La **infección pulmonar** activa se manifiesta por síntomas inespecíficos, como malestar general, pérdida de peso, tos persistente por más de 2 semanas de evolución y sudoraciones nocturna. Otros síntomas más específicos son: dolor en el pecho, cansancio constante, fiebre no cuantificada por termómetro, pérdida del apetito, expectoración mucopurulenta o con sangre, entre otros (1,2,4,11,19,21,22).

En la **tuberculosis extrapulmonar**, los síntomas varían de acuerdo al lugar en el que ocurre la enfermedad, pero generalmente ocurren síntomas como fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso (2,5,21).

En pacientes inmunocomprometidos, en especial en PVVS, los síntomas son menos específicos y dependen del grado de inmunosupresión que presenten. El 50% de PVVS con tuberculosis pulmonar, presentan muestras de esputo negativas a la observación de BAAR en comparación con las personas que no presentan infección por el VIH/SIDA (8,22).

La TB extrapulmonar se presenta comúnmente en PVVS, lo cual constituye un factor más que dificulta el diagnóstico de la enfermedad (2,5,8,22).

Los pacientes con una infección por VIH y una tuberculosis pulmonar pueden presentar imágenes de rayos X de tórax atípicas, infiltrados lobulares, con o sin adenopatía o infiltrados difusos que se parecen al patrón intersticial que se observa en una neumonía por *Pneumocystis carinii*. La imagen de rayos X de tórax es normal en 10 a 20% de los pacientes con SIDA y en ellos la enfermedad cavitaria es menos común, posiblemente reflejando la disfunción inmune en pacientes con una infección avanzada por el VIH (22). La tuberculosis es la primera manifestación clínica en los pacientes infectados por VIH (8).

#### E. Diagnóstico:

El diagnóstico clínico de la TB pulmonar está basado en la sintomatología característica y los rayos X de tórax. Sin embargo estos datos por sí solos no son fiables por no ser específicos, solamente indican que se debe realizar el estudio microbiológico diferencial (hongos, bacterias, etc.) y utilizar otros métodos clínicos y de laboratorio que se presentan a continuación:

##### 1. Prueba de Tuberculina

La prueba de tuberculina por el método de Mantoux o derivado purificado de proteína, (PPD por sus siglas en inglés) es un examen selectivo estándar que contiene un antígeno (tuberculina) que se encuentra en la micobacteria y que es usado generalmente para identificar individuos infectados, enfermos con tuberculosis, o personas que hallan estado en contacto con el microorganismo. La PPD está indicada en todas las situaciones en

que interese confirmar o descartar infección tuberculosa (*ver anexo 3*), no existiendo contraindicaciones para la misma. Es la prueba normalizada por la (OMS) desde 1964, que básicamente consiste en la inyección intradérmica de la PPD en la cara anterior del brazo izquierdo y la realización de una lectura a las 48-72 horas de la prueba, en la que se mide la zona de induración que se ha producido (no la zona de eritema) (2,4,5).

La positividad de la prueba depende de los factores de riesgo de la persona y su estado inmunológico (*Ver Anexo 2*). En Guatemala, por ser un país endémico, se considera positiva una zona de induración mayor o igual a 10 mm, que no significa lo mismo que una infección activa. La excepción la constituyen los sujetos vacunados con BCG, en los 10 años previos a la realización de la prueba. En ellos se considera positiva una induración mayor o igual a 14 mm (2,5,10).

En los pacientes con infección por el VIH, independientemente de si están o no vacunados con BCG, toda induración igual o mayor de 5 mm se considera positiva. Sin embargo, existen pacientes que expresan resultados falsamente negativos debido a la inmunosupresión, que impide el desarrollo de la pápula y zona indurada (anergia cutánea) (*Ver anexo 4*) (2,5).

El mayor valor predictivo positivo de esta prueba en el diagnóstico de TB activa se obtiene en los niños, donde la prevalencia de infectados es baja y donde un paciente con una PPD positiva y clínica sospechosa tiene muchas probabilidades de padecer la enfermedad (2,10,21).

## 2. Tinción de Bacilos Alcohol Ácido Resistentes

El método de diagnóstico más utilizado es la observación directa de material clínico, generalmente esputo o de especímenes concentrados para la detección de bacilos alcohol ácido resistente (BAAR) por medio de la coloración de Ziehl Neelsen o Kinyoun. Aunque este método es rápido y de bajo costo, tiene varias limitantes, entre ellas: requiere 10,000 organismos/ml. para observarlos, lo que resulta en una baja sensibilidad (30-70% comparado con el cultivo de la micobacteria) y no permite distinguir *M. tuberculosis* de otras micobacterias (4,5,8,22,25).

La sensibilidad en la observación de los frotos en el microscopio depende también de otros factores tales como el tipo y la calidad del espécimen, número de especímenes

examinados, la experiencia observacional, condiciones clínicas y el número de BAAR presentes en la muestra (4,8,25).

### 3. Cultivo para *Mycobacterium tuberculosis*

El método de referencia o “el estándar de oro” es el cultivo en medio sólido (Lowenstein-Jensen o Middlebrook 7H10 y 7H11). Este microorganismo crece muy lentamente, debido a que sus tiempos de generación son de 2 a más de 20 horas, a diferencia de las bacterias de crecimiento rápido cuyos tiempos de generación son de algunos minutos. Las micobacterias parecen dividirse por fisión binaria simple, aunque otros autores han postulado un ciclo de vida más complejo. Se requieren 3-8 semanas para obtener colonias visibles. Las condiciones de incubación incluyen alto porcentaje de humedad y una temperatura entre 35°C –37°C. El rango de pH óptimo para su crecimiento es de 6.5-7.0. La mayoría de especies se adaptan rápidamente para crecer en sustratos simples, usando amonio o ácidos de amonio como fuentes de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono en presencia de sales minerales. La morfología de la colonia es rugosa y ligeramente amarilla (4,5,21,25,26).

La identificación de *M tuberculosis* de otras especies de micobacterias se realiza por medio de pruebas bioquímicas que incluyen: prueba de niacina, catalasa, ureasa, producción de arilsulfatasa, reducción de nitratos, tolerancia a cloruro de sodio, hidrólisis del tween 20, producción de pigmento, entre otras (21,27).

### 4. Otros métodos diagnósticos

En los últimos años han sido introducidas diversas técnicas nuevas, en respuesta a la necesidad de un diagnóstico más eficiente y que permitan la recuperación de la micobacteria en menor tiempo que en cultivo sólido; entre estos están el cultivo en medio líquido (Middlebrook 7H9) y métodos automatizados o semi automatizados como el sistema BACTEC™, Septi-Chek AFB y MGIT (BBL™), aplicaciones de cromatografía, y otros (4,8,22,28).

#### F. Susceptibilidad antibiótica de *M. tuberculosis*

Un método utilizado para la determinación de la susceptibilidad de *M. tuberculosis* es el **método modificado de las proporciones**. Los resultados de este método son reportados como un porcentaje del total de la población bacteriana resistente a una droga determinada, la cual es definida por la cantidad de crecimiento en un medio que contiene el medicamento, comparada con el crecimiento en un medio control libre de medicamento (23,29). Cuando más del 1% de la población bacilar es resistente a la concentración crítica de la droga, la micobacteria se considera resistente. La concentración crítica del medicamento es aquella a la cual se inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias (17,22,24,29-32).

El principio del método modificado de las proporciones, se basa en que una suspensión estandarizada del organismo a evaluar se inocula en placas de agar 7H10 conteniendo un agente antimicrobiano, generalmente drogas de primera línea (Isoniacida –INH-, rifampicina –RIF-, estreptomycinina –SM- y etambutol –EMB-) y también en un agar control sin droga (22,30). A continuación se incuba a 36°C por 3 semanas, el crecimiento en el medio con el antimicrobiano se compara con el crecimiento en el medio libre de medicamento, y dependiendo de la cantidad de crecimiento, el organismo se categoriza como susceptible o resistente (22,32).

Entre las ventajas de este método se pueden citar que de los métodos que existen en la actualidad éste es el más accesible y aplicable para la mayoría de los laboratorios de salud del país. Entre las desventajas están, que las micobacterias algunas veces se agrupan en grumos, o no crecen satisfactoriamente por lo tanto es difícil obtener suspensiones homogéneas del inóculo y esto puede afectar los resultados. Además, se requiere de personal capacitado por ser un método muy laborioso en cuanto a tiempo y al procedimiento en sí. El medio de cultivo que se utiliza es muy enriquecido y si no se tiene el equipo y las condiciones de esterilidad que exige el método, puede contaminarse fácilmente (32).

El test de susceptibilidad antibiótica para *M. tuberculosis* puede hacerse también con el uso de técnicas radiométricas en medios líquidos adicionados con las drogas INH, RIF, SM, EMB y pirazinamida (PZA) en los que se determina si las cepas en estudio son susceptibles o resistentes a las drogas antituberculosas dependiendo del crecimiento de la

micobacteria, el cual se detecta por la liberación de  $C^{14}$  del medio como consecuencia del metabolismo de la bacteria (33). Este método reduce el tiempo en la obtención de resultados (5 días en comparación con 3 semanas, en promedio, con el uso del método de las proporciones) (24,33).

Los test de susceptibilidad desempeñan un papel muy importante en epidemiología, debido a que detectan la aparición de resistencia provocada por fallas en la administración o en la supervisión de un tratamiento adecuado (34).

En Guatemala las pruebas de sensibilidad a fármacos no se llevan a cabo rutinariamente, lo cual hace surgir la posibilidad de esquemas inadecuados de tratamiento para pacientes con cepas multirresistentes (14).

## G. Tratamiento de la tuberculosis

El tratamiento de TB está condicionado al tipo de bacilo que se encuentre. A partir de un bacilo se origina una colonia en la que unos de ellos estarán multiplicándose rápidamente, otros estarán creciendo de un modo intermedio, otros crecerán lentamente y algunos otros estarán en un estado inerte, sin metabolismo activo. Al alcanzar cierto número de bacilos se empiezan a producir mutaciones naturales y espontáneas. Esta mutación da lugar a la aparición de resistencias de tipo cromosómicas y por ello irreversibles, que están en relación con el número de bacilos presentes y el fármaco considerado. Esta situación ocasiona que no todos los elementos de la colonia tengan el mismo comportamiento frente a las diferentes drogas antituberculosas, y por ello el tratamiento administrado debe ser una combinación de estas drogas (2,4,22,35).

### 1. Drogas de Primera línea

Cinco medicamentos son los llamados de *primera línea*: INH, RIF, SM, EMB y Pirazinamida -PZA-, por su actividad y baja toxicidad (1,5,8,11,36,21). La INH ha sido la droga más utilizada desde su introducción. Su dosis usual es de 300 mg diarios y posee baja toxicidad para el hígado (22,36-38) La RIF, descubierta en 1966, es otra droga potente contra la TB. Su dosis usual es de 600 mg diarios y como la INH, también es hepatotóxica

(22). El uso de la PZA se ha incrementado en los últimos años, usualmente en dosis de 25 mg/kg/día, es hepatotóxica y provoca hiperuricemia (2,39,40).

El EMB puede usarse como bacteriostático (15 mg/kg/día) y como bactericida (25 mg/kg/día). En su dosis más baja su toxicidad es raramente encontrada (22,35).

Aunque la SM fue la primera droga descubierta, en la actualidad su uso es limitado debido a su forma de administración (vía intramuscular) y a que, como otros aminoglicósidos, la SM causa citotoxicidad y disfunción renal, por lo que tiene una toxicidad media en un paciente con TB (22,36,41).

## 2. Drogas de segunda línea

Las drogas de segunda línea son poco utilizadas, excepto en las áreas en las que existen grandes rangos de resistencia a drogas. En este grupo se pueden citar la ofloxacina, cicloserina, capreomicina, etionamida, tiacetazona, kanamicina/amikacina, y PAS, del cual ahora se sabe, puede causar hepatitis y retención de fluidos entre otros (2,5,21,22,36,41).

## 3. Esquemas de tratamiento

Existe un gran número de pautas de tratamiento derivadas de las diferentes combinaciones que se pueden realizar con las drogas antituberculosas. A nivel mundial los esquemas de tratamiento utilizados son los recomendados por la OMS (*Ver Anexo 5*) (42).

En Guatemala se utilizan dos esquemas de tratamiento: El esquema A, para pacientes nuevos que nunca han tomado tratamiento; dura 6 meses y comprende 4 medicamentos: INH, RIF, PZA, EMB (17,21,43). El esquema B, para pacientes previamente tratados; dura 8 meses y comprende 5 medicamentos: SM, además de las 4 drogas mencionadas (43).

En ambos casos, el tratamiento se divide en dos etapas: La fase intensiva, durante la cual se toma el tratamiento todos los días. La fase de continuación, durante la cual los medicamentos se toman dos veces por semana si es el esquema A y 3 veces por semana si es el esquema B (42,43).

Estos tratamientos, tomados adecuadamente y bajo supervisión estricta, permiten curar al paciente y así cerrar las fuentes de infección (18,43).

La duración de la terapia en pacientes con VIH es desconocida. Algunos autores sugieren que 6 meses son adecuados, mientras que otros han reportado un fracaso para un tratamiento durante este período (22).

Cuando se sospecha infección latente, existen varias opciones de tratamiento. La droga más utilizada es la INH durante 6 a 9 meses, sin embargo los niños y las PVVS necesitan tomar este medicamento por más tiempo y lo más pronto posible para prevenir la enfermedad (1). Sin embargo con pocas excepciones, el tratamiento es muy satisfactorio, tanto en PVVS como en aquellas que no lo son (8).

#### H. Tuberculosis multirresistente a drogas

La tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB por sus siglas en inglés) es una enfermedad iatrogénica que se ha convertido en el mayor problema de enfermedades infecciosas a nivel mundial (6,23,31,36,44).

MDR-TB es definida como el caso de TB causado por *M. tuberculosis* que es resistente al menos a isoniacida y rifampicina, con o sin resistencia a otras drogas. (15,18,45).

*M. tuberculosis* puede desarrollar resistencia a las drogas antituberculosas espontáneamente o bajo una presión selectiva de antibióticos (21). En general hay dos drogas claves en el tratamiento de la tuberculosis: INH y RIF (2,22). La frecuencia de desarrollar resistencia espontánea para la INH es 1 en  $10^5$  a 1 en  $10^6$ , para la RIF es de 1 en  $10^8$  y para ambas es de 1 en  $10^4$  (23). Por lo tanto es muy difícil para *M. tuberculosis* volverse resistente a ambas drogas (6,23).

La resistencia a una o varias formas de tratamiento ocurre cuando las bacterias desarrollan la capacidad de soportar el ataque antibiótico y de transmitir esa capacidad a su progenie (44). La terapia para una tuberculosis resistente es más larga, más tóxica y más cara que una terapia de tuberculosis susceptible (22,46).

La resistencia puede ser **primaria**, que es la que se presenta en un paciente que nunca había recibido tratamiento antituberculoso previo y que se infecta con una cepa resistente; o **secundaria** que es la que ocurre cuando en un paciente, la cepa que lo infecta era originalmente susceptible y se hace resistente dentro del organismo del mismo paciente

como consecuencia de un tratamiento incorrecto. Esta a su vez ocasiona resistencias primarias cuando nuevos individuos se infectan con estas cepas (2,21,44,45).

Las principales razones para que las resistencias secundarias surjan son: incumplimiento del tratamiento, quimioprofilaxis con INH sin descartar antes una TB activa, utilización de esquemas de tratamientos incorrectos: monoterapia, poco tiempo, etc. (9,23,44).

## 1. Mecanismos de Resistencia

Un análisis genético y molecular de resistencia a drogas en *M. tuberculosis* sugiere que esta resistencia usualmente es adquirida ya sea por alteración de la bacteria en los sitios de acción de la droga producida por mutaciones o por dilución de la droga debido a una sobreproducción de sitios de acción. Las cepas MDR-TB aparecen principalmente por acumulación de mutaciones en genes que codifican los sitios de acción para cada droga (10,15).

La probabilidad de resistencia es muy alta para los medicamentos antituberculosos menos efectivos como tiacetazona, etionamida, capreomicina, cicloserina y vomicina ( $10^3$ ); intermediaria para drogas como INH, SM, EMB, kanamicina y ácido paraminosalicílico ( $10^{-6}$ ); y menor para RIF ( $10^{-8}$ ). Consecuentemente la probabilidad de una mutación es directamente proporcional a la carga bacteriana, cuando esta carga es de  $10^9$  puede contener muchos mutantes resistentes a cualquier droga antituberculosa (15,34).

La exposición a las drogas antituberculosas no induce mutaciones, solamente permite la replicación de los mutantes ya presentes, mediante la destrucción de las bacterias susceptibles a la droga que de otra manera competirían por los nutrientes (15,34,48).

La resistencia a drogas confiere ventaja selectiva a la bacteria cuando ésta se expone a la droga. Bajo estas circunstancias, las cepas sensibles son eliminadas y se desarrollan los mutantes resistentes a cada una de ellas (15).

*M. tuberculosis* adquiere resistencia a las drogas antituberculosas mediante mutaciones cromosomales y éstas se producen con una frecuencia baja, pero constantemente, lo que implica la transmisión de cepas resistentes en una comunidad. Esto influencia drásticamente su aplicación y supervisión en los esquemas de terapia antituberculosa. En general, una infraestructura inadecuada y un bajo nivel de interés

constituyen un problema serio para erradicar la transmisión de estas cepas resistentes (15,34,48,49).

Cuando el paciente se expone a una segunda terapia de drogas con una droga más dentro del esquema del primer tratamiento, se seleccionan los mutantes resistentes a la nueva droga y eventualmente el paciente puede tener bacilos resistentes a dos o más drogas (11,15,49).

La selección seriada de resistencia a drogas es el mecanismo predominante para el desarrollo de cepas MDR; un paciente con cepas MDR constituye un “pool” de infecciones crónicas, que propagará MDR con resistencia primaria (15,47,48). Además de la acumulación de mutaciones en los genes que codifican los sitios de acción para cada droga, la permeabilidad de la barrera impuesta por la pared celular de *M. tuberculosis* puede contribuir al desarrollo de resistencia a drogas en bajo nivel (15).

## 2. Epidemiología de MDR-TB

Los factores asociados con el incremento en la incidencia de MDR-TB incluyen la epidemia del SIDA, incremento de los casos de TB especialmente en poblaciones con fácil acceso a las drogas antituberculosas, el deterioro en la infraestructura de salud pública y la inadecuada capacitación del personal médico sobre la epidemiología de la TB (17,18,23,50). Sin embargo uno de los mayores factores de riesgo para el establecimiento de MDR-TB es una terapia administrada inadecuadamente (5,23,42).

El tratamiento para una MDR-TB tiene mejor rendimiento en pacientes no infectados por el VIH, que en pacientes VIH positivo. En un estudio realizado a 171 personas entre 1973 y 1983 se reportó que la mitad de los pacientes fueron curados, un cuarto curados quirúrgicamente y el resto no tuvo éxito en el tratamiento (22).

En las PVVS, con MDR-TB es más frecuente encontrar una enfermedad pulmonar y extrapulmonar simultáneamente. La mortalidad se incrementa altamente en estos pacientes, observándose un tiempo de vida de 1-3 meses (22). Un diagnóstico tardío, una prueba de susceptibilidad retrasada y una MDR-TB no tratada rápidamente pueden ser fatales en estos pacientes (23, 31, 44).

En epidemias recientes, más de 200 PVVS desarrollaron MDR-TB. La mortalidad excedió el 80% y el intervalo entre el diagnóstico y la muerte de estos pacientes fue de solo

4 a 16 semanas. Durante las mismas epidemias, 18%-50% de los trabajadores de salud mostraron conversión en los resultados de la prueba de PPD (6,8,23,24).

La MDR-TB es relativamente poco común en los países subdesarrollados donde la prevalencia de TB es alta. En algunos países las drogas antituberculosas no están al alcance de la población que más lo necesita, sin embargo en los países en los que los medicamentos pueden obtenerse fácilmente, los rangos de prevalencia de MDR-TB tienden a ser más altos (23).

En Rusia se han llevado a cabo estudios de multirresistencia a drogas para la tuberculosis. En Estonia, se encontró 37% de resistencia a una o más drogas en casos nuevos de TB (resistencia primaria) y un 14% de multirresistencia. En Ivanovo se examinaron 514 muestras y se encontraron 26 (5%) con MDR-TB primaria (51,52).

En diversas investigaciones se ha encontrado que estar encarcelado o trabajar en una prisión, es un factor que incrementa el riesgo de contraer no solo TB sino una MDR-TB. Por ello se enfatiza en la necesidad de mejorar los programas de control de la TB en estos lugares (25).

Además, los prisioneros presentan una alta prevalencia de infección con el VIH, comparado con la población en general. Un diagnóstico tardío, condiciones inadecuadas de hacinamiento entre los prisioneros y la transferencia frecuente de los mismos entre una prisión a otra dan como resultado epidemias de MDR-TB en estos lugares así como también en hospitales (45,53,54).

La epidemiología de la MDR-TB varía geográficamente ya sea entre hospital y hospital, entre ciudad y ciudad y entre un país y otro (22,23).

Los cinco países con incidencia más alta de MDR-TB son: India, China, Indonesia, Bangladesh y Paquistán (52).

Rodríguez JM y colaboradores realizaron en Guatemala en el año de 1998 un estudio de resistencia primaria a drogas y observaron 4.7% de este tipo de resistencia en 198 muestras analizadas. La alta tasa de resistencia primaria encontrada en este estudio confirma que existe una transmisión activa de tuberculosis resistente (14).

También se reportó que 17.6% de las muestras presentaron algún tipo de resistencia, siendo la INH y la SM las drogas que resultaron ser el patrón más frecuente de resistencia (17.6%). Adicionalmente, se observó una multidrogarresistencia primaria de 4.7%, lo cual

es preocupante, ya que la INH y la RIF constituyen el bastón principal de la terapia anti-TB no solamente en Guatemala, sino en otros países subdesarrollados (14).

Este estudio fue comparado con otro estudio realizado en Quetzaltenango (Julio 1993-Junio 1994) observándose una gran similitud en los resultados de resistencia a cualquier fármaco (21.3% en Quetzaltenango y 26.4% en este estudio) así mismo una multiresistencia de 2.6% y 4.7% respectivamente (14,17).

A la larga es obvio que la resistencia primaria a drogas se da como consecuencia a la resistencia adquirida y por lo tanto es el resultado de errores en la prescripción de drogas, en el manejo de suplementación de éstos, el manejo de casos individuales o el despacho de drogas al paciente (14).

### 3. Tratamiento de la MDR-TB

El tratamiento de MDR-TB incluye el uso de drogas de segunda línea, sin embargo el costo de estos medicamentos es tan alto que prácticamente imposibilita su uso en países con escasos recursos económicos, por lo que para disminuir este problema debe actuarse en dos direcciones: ejecutar medidas en los programas de control de TB que eviten que aparezcan más casos de MDR-TB e intentar conseguir un banco básico de fármacos de segunda línea que permita ofrecer una cura a estos pacientes (55).

La duración sugestiva para la terapia de una MDR-TB varía en un rango de 6 a 12 meses. Para las PVVS y pacientes con otras condiciones inmunosupresivas se recomienda una terapia de al menos 12 meses (22-24).

### 4. Prevención de MDR-TB

No existe un consenso en el uso de terapia preventiva para las personas infectadas con una MDR-TB, sin embargo la INH después de más de 40 años sigue siendo la droga de elección por su efecto bactericida sobre *M. tuberculosis* (12,23).

Cuando una cepa de *M. tuberculosis* es resistente a INH pero susceptible a RIF, ésta puede ser efectiva como profilaxis; sin embargo si la exposición fue con una cepa resistente a múltiples drogas, las opciones de tratamiento son limitadas. La pirazinamida y el etambutol son las drogas alternativas para el uso en la prevención de una MDR-TB (2,22,24).

Las epidemias más recientes de MDR-TB han ocurrido en hospitales. Por ello, debe administrarse una terapia preventiva a los trabajadores de la salud, quienes consecuentemente pueden llegar a ser el mayor reservorio para patógenos nosocomiales (23,31).

Además de la terapia preventiva otras acciones deben llevarse a cabo para interrumpir la transmisión de la tuberculosis resistente a múltiples drogas lo cual puede lograrse por medio del monitoreo del cumplimiento en la toma de los medicamentos, ya que éste el mayor factor de riesgo para desarrollar una MDR-TB (13,22).

La terapia acortada estrictamente supervisada –TAES- (DOT, por sus siglas en inglés), es un sistema en el cual el paciente es observado diariamente al momento de administrársele tratamiento (8,44). Esta terapia se ha adoptado recientemente por muchos centros e instituciones de salud, sin embargo la implementación de este sistema ha sido difícil en países como Guatemala, debido a la dificultad de acceso a servicios de salud de la mayor parte de la población (12,23,52).

Para la prevención de la MDR-TB en cárceles y hospitales, se necesita: vigilancia regular y sistemática de la TB, terapia preventiva para quienes presentan un examen positivo, diagnóstico, aislamiento y tratamiento inmediato de TB, asegurando además un continuo control tanto dentro como fuera de estos lugares (46,54).

A pesar de que se han delineado medidas contra la propagación de la MDR-TB a los contactos cercanos, está claro que la adecuada prevención de esta entidad principia con un tratamiento individual apropiado y un buen programa de control de TB (14).

En junio de 1998 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó la primera droga nueva para el tratamiento de la TB después de 25 años. Su nombre es *rifapentine* (Priftin) y entre sus ventajas más relevantes es que en los últimos 4 meses de tratamiento, esta droga puede ser tomada una vez por semana, comparado con dos veces por semana para el régimen estándar (44).

## I. Epidemiología molecular de tuberculosis

La aplicación de técnicas moleculares, principalmente de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) ha sido de gran ayuda para comprender la

biología y epidemiología de la TB (56,57). Además ha permitido un diagnóstico más rápido y la optimización de la terapia antituberculosa (8,57,58).

El principio fundamental del PCR es la amplificación de un fragmento específico de ADN a través de ciclos sucesivos de replicación exponencial hasta obtener una cantidad de producto suficiente para ser visualizado. De esta manera, una simple molécula puede generar más de un billón de copias de sí misma, después de 30 ciclos de replicación exponencial. Cada ciclo de amplificación consiste en tres temperaturas diferentes, en las cuales los ingredientes de la reacción de PCR experimentan diferentes procesos físicos y bioquímicos para que el ADN sea replicado (59).

La técnica de PCR se ha utilizado para detectar polimorfismos genéticos, como pequeñas diferencias en las secuencias, variaciones en la distribución de elementos repetitivos o sitios de restricción y diferencias en la organización genómica (57,58).

La técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), es un análisis basado en las huellas genéticas que identifica específicamente a las cepas de *M. tuberculosis* y se considera el método de referencia para la identificación de patrones genéticos (15,57,60-63). Este método se basa en el elemento repetido IS6110, descrito por Thierry *et al.* el cual se encuentra en miembros del complejo *M. tuberculosis* en una proporción de 0-20 copias distribuidas en todo el cromosoma (64,65). Una de las mayores desventajas del método es que para su ejecución se debe contar con un laboratorio de investigación sofisticado, el tiempo de ejecución es prolongado y el procedimiento es laborioso. Necesita una cantidad suficiente de ADN y por ende un crecimiento abundante en el cultivo primario de la cepa o si es necesario la realización de un subcultivo para tener suficiente cantidad de colonias (45,58,63,64). Después del crecimiento del cultivo, el procedimiento implica la extracción del ADN, tratamiento con endonucleasa de restricción, separación de los productos por medio de electroforesis e hibridización, la cual requiere múltiples pasos y reactivos. Por lo tanto, el procedimiento completo de RFLP puede llevar de 3 a 4 semanas para la interpretación de sus resultados (56,58,64,66).

Actualmente existe un método nuevo basado en la amplificación de los segmentos de ADN de *M. tuberculosis* localizados entre dos copias de elementos repetidos, llamado de dobles elementos repetidos (DRE-PCR) (31,57,63,64).

Los elementos repetidos son el IS6110 y la secuencia polimórfica rica en Guanina-Citocina (PGRS). Este último elemento fue descrito por Ross *et al.* en las cepas de *M. tuberculosis* así como también en otras especies de *Mycobacterium* (45,64). En *M. tuberculosis* el elemento PGRS se presenta en al menos 30 copias, situación que varía en número y distribución entre cepa y cepa (64,66).

Los primers que corresponden a las secuencias terminales de los elementos de inserción IS6110 y PGRS fueron diseñados de modo que se amplifiquen los segmentos entre las secuencias de los elementos repetidos (64,65).

Este método se basa en el hecho de que la distancia entre los elementos repetidos y el número de copias de IS6110 y PGRS varía de cepa en cepa. Esta variación permite diferenciar tamaño y número de fragmentos de ADN que serán amplificados, permitiendo un patrón único para las cepas de *M. tuberculosis* (45,57,64,65).

Aunque el método de RFLP se considera el método de referencia para *M. tuberculosis*, la técnica de DRE-PCR ha sido validada a través de diversos estudios comparativos entre ambos procedimientos (62,64,67).

En el Hospital de Nueva York, Friedman CR y colaboradores analizaron en 1995 167 cepas de *M. tuberculosis* y se encontraron un valor predictivo positivo entre el DRE-PCR y el RFLP, de 96% (64,67). Otro estudio realizado en Cuba en el año de 1997 por Montoro y colaboradores, validó la prueba para Latinoamérica, analizando 41 cepas con ambas técnicas (RFLP y DRE-PCR) obteniendo resultados de 24 y 25 patrones genéticos únicos respectivamente. Asimismo, se observó una similitud entre ambos estudios de 5 y 4 patrones agrupados (clusters<sup>1</sup>) para cada técnica (62).

Con estos dos estudios se observaron las ventajas del DRE-PCR sobre RFLP, mostrando la accesibilidad del método y que con él se obtiene la misma información epidemiológica. Las ventajas incluyen que es un método rápido que puede llevarse a cabo directamente del cultivo primario de *M. tuberculosis* y cuyo resultado puede ser interpretado en menos de dos días (62,64,67), requiere de menos ADN, también se elimina la necesidad de subcultivar la cepa de un cultivo primario; no necesita usar elementos radiactivos en su procedimiento y tampoco de un laboratorio sofisticado (62,64,66).

-----  
<sup>1</sup>Cluster: Dos o más patrones genéticos idénticos

## J. MDR-TB y Perfiles genéticos

La determinación de resistencia a drogas en conjunto con el análisis de las huellas genéticas por metodologías moleculares, confiere importante información acerca de la relación entre la resistencia a drogas y los patrones genéticos agrupados (68,69).

Los estudios de epidemiología molecular también proveen evidencia de la transmisión de *M. tuberculosis* entre pacientes cuyas cepas muestran patrones genéticos idénticos (clusters). Sin embargo la transmisión entre pacientes que tienen cepas con patrones de ADN similares pero no idénticos (por ejemplo, que difieran en una sola banda) no ha sido bien documentado (68).

Pineda L y colaboradores, en 1997, reportó el primer estudio para Honduras de multirresistencia a drogas y perfiles genéticos utilizando para ello el sistema BACTEC y RFLP respectivamente. En este estudio se encontró que 13 de 85 pacientes (15%) con TB pulmonar tenía resistencia a drogas y fue común la resistencia adquirida. Este nivel de resistencia es intermedio con respecto a lo reportado en otras ciudades de Latinoamérica, cuyo nivel más bajo (7%) se encontró en Argentina y el más alto (43%) en Perú (69).

En este estudio, se realizó tipificación epidemiológica para todas las cepas resistentes y algunas cepas susceptibles. Con una sola excepción, las cepas exhibieron patrones de restricción diferentes, y no pudo ser identificada la diseminación de ningún clon resistente que infectara a varios pacientes (69).

La MDR-TB es claramente un problema público emergente. Una alta incidencia de MDR-TB tiene serias implicaciones, no sólo por el tratamiento individual del paciente sino por el manejo de los contactos de estos casos (69).

En otro estudio realizado por Pineda L y colaboradores, en Honduras en 1997, se reportó que las cepas de *M. tuberculosis* que mostraban regiones idénticas de IS6110 estaban más unidas epidemiológicamente. Los pacientes infectados con estas cepas probablemente adquirieron la infección a través de una vía común o relacionada, mientras que los pacientes infectados con cepas con un patrón único tenían más afinidad a tener recaídas o que fueron infectados por diferentes vías. Sin embargo, en una población con alto porcentaje de cepas de *M. tuberculosis* que pertenecen a clusters debe sospecharse que está ocurriendo una diseminación significativa de la infección. Las huellas genéticas

idénticas de diferentes cepas indican una transmisión reciente de persona a persona o una vía común de infección (70).

El principal hallazgo en este estudio fue un alto grado de diversidad entre los patrones genéticos de *M. tuberculosis* y que no hubo un solo clon infectivo, en pacientes con MDR-TB o SIDA (70).

Similarmente, Tuyen LTK y colaboradores, en su estudio de 1998, aplicaron el método de RFLP a 168 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Vietnam del Norte y del Sur . Ellos reportaron la ausencia de correlación entre los patrones de RFLP, la susceptibilidad antibiótica o la infección por VIH (71).

Entre 1990 y 1992 el Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) recibió reportes de más de 12 clusters de MDR-TB que se desarrollaron mayormente en PVVS. En contraste, solamente 4 clusters se observaron en personas no infectadas con el VIH (23).

Una asociación entre la infección de VIH y resistencia a drogas fue reportada en EEUU, mientras que otro estudio realizado en Kenya no encontró dicha relación (69). En estos estudios tampoco se demostró que existiera una relación directa entre la resistencia a drogas y la agrupación de las cepas MDR-TB con patrón genético único (69,70).

En Guatemala no se han realizado investigaciones que demuestren que existe este comportamiento entre las cepas de *M. tuberculosis* que infectan a la población.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La multirresistencia a drogas es un problema serio que se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial. En los países donde no se cuenta con programas adecuados de control de TB se observa un mayor índice que en aquéllos que cuentan con buenos programas de control. En este escenario, la vigilancia de la multirresistencia parece ser una herramienta útil para evaluar la eficiencia de programas de control, ayudando de manera importante en las decisiones terapéuticas iniciales.

En los últimos años, Guatemala ha sido incluida por la OPS entre las nueve naciones de Latinoamérica que afrontan tasas de incidencia de TB sobre 85/100,000 habitantes, ya que se considera que existe subregistro de hasta el 80% en los datos reportados por el Programa Nacional (*ver anexo 6*).

En Guatemala, existen muy pocos estudios de multirresistencia a drogas de *M. tuberculosis*, tanto en la población en general como en las PVVS. Así lo demuestran los estudios de Harrow EM, *et al.* y Rodríguez JM, *et al.*, quienes observaron una resistencia general a cualquier droga de 21.3% hasta 26.4% y una multirresistencia de 2.6% hasta 4.7%. En estos reportes se observó similitud en la resistencia obtenida y resalta que la multirresistencia se ha incrementado en las últimas décadas. En ambos estudios, el tamaño de muestra fue pequeño, no representativo de la población en general y no incluyó a las PVVS.

Además de haber pocos estudios, no se cuenta con los perfiles genéticos de estos microorganismos, a través de la técnica de PCR, ampliamente usada en la epidemiología de enfermedades infecciosas. La aplicación de la técnica de DRE-PCR puede proveer importante información en la patogénesis de TB y ayudar a describir los perfiles genéticos de cepas de *M. tuberculosis*. Esta técnica también permite saber si las cepas están epidemiológicamente relacionadas entre las PVVS o de aquéllas que no lo son y distinguir entre una cepa multirresistente de *M. tuberculosis*.

Por lo anterior es necesario contar con información acerca de las huellas genéticas de cepas de *M. tuberculosis* en Guatemala y la resistencia asociada a cepas con patrones genéticos individuales o agrupados y por último determinar si la multirresistencia tiende a ser mayor o es exclusiva en estos patrones.

## V. OBJETIVOS

### A. Generales

1. Determinar la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del año 2002.
2. Identificar la presencia de cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* a los medicamentos de primera elección.

### B. Específicos

1. Caracterizar los perfiles genéticos de las cepas a través de la técnica de DRE-PCR.
2. Comparar los perfiles genéticos de cada cepa y susceptibilidad antibiótica existente entre ellos.
3. Comparar los datos epidemiológicos entre los perfiles genéticos y la susceptibilidad antibiótica.

## **VI. HIPÓTESIS**

Existen patrones genéticos y de susceptibilidad antibiótica similares entre las cepas que circulan en la población guatemalteca que asistió al Hospital General San Juan de Dios en el año 2002.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo de trabajo

Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas durante el año 2002.

### B. Muestra

95 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002

### C. Medios

#### 1. Recursos Humanos

Br. Aída Teresita Jiménez Rodríguez de Reyes

Asesora: MSc. Blanca Samayoa

Asesora: MSc. Ana María Xet

Asesora: Licda. Dalia Mei Ling Lau Bonilla

#### 2. Recursos Materiales

##### a. Susceptibilidad Antibiótica

#### i. Equipo:

- Pipetores Cornwall
- Plato caliente con mecanismo de agitación magnética
- Mezclador Vórtex
- Microscopio estereoscópico (de disección) (30x a 60x)
- Incubadora de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  con  $\text{CO}_2$  5 a 10%
- Campana de seguridad biológica tipo 2
- Horno
- Refrigeradora
- Congelador ( $-20^\circ\text{C}$ )

**ii. Reactivos**

- Agua destilada
- Agar base Middlebrook 7H10 deshidratado (25°C)
- Caldo Middlebrook 7H9 deshidratado (25°C)
- Enriquecedor de ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC) (2 a 8°C)
- Glicerol (25°C)
- Soluciones stock de antimicrobianos preparadas a 1,000 µg/ml (-20°C o menos; preferiblemente a -70°C)
  - Etambutol
  - Isoniacida (INH)
  - Rifampicina
  - Estreptomicina
- Cajas con agar Middlebrook 7H10 (2 a 8°C)
- Dimetil sulfóxido (solvente para rifampicina y etionamida) (25°C)

**iii. Instrumentos**

- Cajas de Petri plásticas, estériles (15 por 100 mm) con cuatro compartimientos (cajas con cuadrantes).
- Estándar de turbidez McFarland 1.0
- Agitadores magnéticos
- Pipetas serológicas estériles de 1-, 5-, y 10 ml y bulbo para pipetas
- Bolsas de polietileno plásticas permeables al CO<sub>2</sub> (de 6 por 8 pulgadas) para cajas (15 por 100 mm)
- Filtros de membrana de 0.22 µm de diámetro de poro
- Tubo de polipropileno estériles (17 por 100 mm)
- Termómetro
- Jeringas de 1, 10, 20, 40 ml
- Gradillas

**iv. Cristalería**

- Probeta de 100 ml
- Probeta de 500 ml
- Perlas de vidrio (3 mm de diámetro)
- Erlenmeyer de 2 litros
- Erlenmeyer de 1 litro
- 6 balones de 500 ml
- Tubos de vidrio estériles (13 por 100 mm)
- Pipetas Pasteur con algodón
- Varillas de agitación
- Beaker de 1000 ml
- Tubos con rosca de 13x100mm
- Tubos con rosca
- Frascos de 500 ml con tapón de rosca

**b. Técnica de DRE-PCR****i. Equipo**

- Bloque caliente (100°C)
- Agitador vórtex
- Microcentrífuga
- Pipetas ajustables de 0.5-10 µl, P1000, P200 y P20 µl
- Termociclador
- Balanza analítica
- Horno de microondas
- Fuente de poder
- Sistema de documentación Fotodyne

**ii. Reactivos**

- Agua destilada
- Cultivos de *M. tuberculosis* en medio de Lowenstein-Jensen
- Buffer 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl)

- 20 Mm DNTPs total (5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- *Taq* polimerasa (5U/ul)
- Aceite mineral
- Primers<sup>1</sup>
- Control positivo<sup>2</sup>
- Glicerol 50%
- Azarosa
- 1X TBE<sup>3</sup>
- Buffer de cargada (loading buffer)<sup>4</sup>
- Bromuro de etidio<sup>5</sup>
- Marcador de ADN (escalera de 100-2000 pares de bases (bp) GIBCO)
- Cloro (1.5% hipoclorito de sodio)

### iii. Instrumentos

- Puntas de pipeta amarillas y azules estériles
- Gradillas para tubos de microcentrífuga
- Servilletas de papel
- Mechero
- Guantes
- Parafilm
- Asa bacteriológica
- Pipetas pasteur estériles
- Lápiz y marcadores permanentes
- Hielera
- Bandeja para el gel

-----  
 1 Ris 1: 5'-GGC TGA GGT CTC AGA TCA G  
 Ris 2: 5'-ACC CCA TCC TTT CCA AGA AC  
 Pntb1: 5'-CCG TTG CCG TAC AGC TG  
 Pntb2: 5'-CCT AGC CGA ACC CTT TG

2 Cepa de referencia de *M. tuberculosis* con un patrón de DRE-PCR de al menos 3 fragmentos.

3 Buffer de Tris borato EDTA (Buffer de corrida del gel).

4 Glicerol 50%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.1%, xilen cyanol 0.1%.

5 Utilice guantes todo el tiempo que maneje este carcinógeno.

- Peines
- Cámara de electroforesis
- Cinta de color adhesiva
- Anteojo protectores contra luz UV

**iv. Cristalería:**

- Beaker de 250 ml
- Tubos de 0.5 y 1.5 ml
- Tubos de 1.5 con tapón de rosca estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos de 1.5 ml estériles
- Tubos de 0.5 ml estériles
- Perlas de ebullición
- Frasco erlenmeyer de 250 ml
- Probeta de 100, 250 ml y 1.0 litro

### 3. Métodos

#### a. Susceptibilidad Antibiótica: Método modificado de las proporciones (*descripción detallada ver anexo 7*)

A partir de una suspensión de la micobacteria estandarizada al 1.0 de McFarland, se preparan diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  y se inocula cada dilución en cajas de Petri con cuatro divisiones (cuadriplate) preparadas con agar 7H10. El cuadrante 1 de cada caja contiene agar 7H10 y representará el control de crecimiento, los cuadrantes restantes contienen agar y una de las drogas de primera línea (Isoniacida –INH-, rifampicina –RIF-, estreptomicina –SM- y etambutol –EMB-) en concentraciones específicas. Se incuban a  $36^{\circ}\text{C}$  por 3 semanas, al cabo de las cuales se realiza la lectura de las cajas y la interpretación de los resultados, de la siguiente manera: el número de colonias en el cuadrante con el antimicrobiano se compara con el número de colonias en el cuadrante libre de droga (cuadrante control), si excede el 1%, la cepa evaluada se categoriza como resistente a la droga presente en ese cuadrante; si el número de colonias en el cuadrante con droga es menor del 1% del crecimiento en el cuadrante control, la cepa se categoriza como susceptible (21,27,29).

#### b. Técnica de DRE-PCR (*descripción detallada ver anexo 8 y 9*)

Esta técnica genera un único patrón de fragmentos amplificados, conocidos como “huellas genéticas”. Esto se logra usando dos pares de primer, uno de ellos localiza la secuencia de inserción repetitiva IS6110, mientras que el otro es dirigido a la secuencia PGRS. Los primers se orientan de modo que cada par amplifica hacia afuera entre los elementos repetitivos, puesto que estos elementos se han distribuido diferentemente a través del genoma de la bacteria en las distintas cepas de *M. tuberculosis*, se genera un patrón distinto para cada cepa (59).

Se lleva a cabo una suspensión estandarizada del cultivo puro de *M. tuberculosis* a 1.0 de McFarland, se extrae el ADN de las micobacterias y luego se prepara la mezcla para PCR con la que se hará la amplificación en el termociclador a las temperaturas establecidas. Una vez amplificado el ADN se efectúa el análisis del producto en una cámara de electroforesis y para ello se prepara un gel de agarosa 0.2%. Las muestras se colocan en el

gel a 50 voltios (v) durante 5 a 10 minutos y luego a 100 v hasta que éstas hayan recorrido  $\frac{3}{4}$  partes del gel (70-80%) (59).

Al terminar el gel es observado en una cámara con luz ultravioleta (UV), proyectando la imagen a una computadora con un programa específico para tomar las fotografías y analizar las huellas genéticas que presenta cada muestra (59).

c. Diseño de la Investigación

Estudio observacional descriptivo, retrospectivo en una muestra no probabilística por conveniencia de 95 pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002.

d. Análisis de los datos

Los resultados se almacenarán en una base de datos en el programa Epi info 6 y serán analizados a través de un análisis de frecuencias y univariado con uso de la prueba de Chi cuadrado y t student cuando sea necesario. Ambas a un nivel de significancia del 0.05 ( $\alpha = 0.05$ ).

i. Formas de recolección de datos

Información epidemiológica de expedientes médicos de los pacientes, en una hoja de colección de datos.

## VIII. RESULTADOS

De un total de 95 cepas de micobacterias recolectadas, fue posible documentar los datos epidemiológicos de las provenientes de 56 pacientes. En la *Tabla 1* se presenta la información más importante de esta muestra de pacientes.

Se observó que la mayoría de muestras provenían de 30 (53.6%) pacientes hospitalizados que acudieron al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002.

La mayoría de pacientes, 39 (69.6%), eran hombres y solamente 17 (30.3%) fueron mujeres. De todos ellos 30 (53.6%) pacientes correspondían a edad reproductiva entre 26-45 años. De la ciudad capital provenían 22 (39.3%) pacientes, pero se resaltó que una cantidad similar, 20 (35.7%) venía del interior de la República y 5 (8.9%) de ellos de la República de El Salvador. En alguna etapa de su vida, 23 (41%) de los pacientes habían estado hospitalizados y 13 (23%) encarcelados. Las muestras que provenían de personas viviendo con VIH/SIDA (PVVS) fueron 34 (60.7%) y de personas sin VIH 22 (39.3%).

Diecisiete (30.3%) personas tenían hijos y 21 (37.5%) no, mientras que de 18 de ellos (32.1%) no se obtuvo este dato.

Veintisiete (74%) pacientes habían tomado tratamiento anti-tuberculoso, lo que significa que la mayoría de éstos había padecido y se había tratado la enfermedad de tuberculosis en alguna etapa de su vida (ver *Tabla 1*).

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes proveedores de las cepas de *M. tuberculosis* (N=56)

Característica	Frecuencia	(%)
<b>Tipo de Usuario</b>		
Ambulatorio	26	46.3
Hospitalizado	30	53.6
<b>Género</b>		
Masculino	39	69.6
Femenino	17	30.3
<b>Edad</b>		
1-25 años	15	26.8
26-45 años	30	53.6
46-60 años	8	14.3
>60 años	3	5.4
<b>Lugar de nacimiento</b>		
Guatemala	22	39.3
Suchitepequez	5	8.9
Escuintla	5	8.9
Alta Verapaz	4	7.1
El Salvador	5	8.9
Otros	20	35.7
<b>Privado de Libertad</b>		
Si	13	23.2
No	16	28.6
Desconocido	27	48.2
<b>Hospitalizado anteriormente</b>		
Si	23	41.1
No	12	21.4
Desconocido	21	37.5
<b>Infección VIH</b>		
Si	34	60.7
No	22	39.3
<b>Tiene hijos</b>		
Si	17	30.3
No	21	37.5
Desconocido	18	32.1
<b>Tratamiento anti-Tb<sup>1</sup></b>		
Si	27	48.2
No	26	46.4
Desconocido	3	5.4

<sup>1</sup>En los últimos 5 años.

En la *tabla 2* se observa que las 95 cepas aisladas, 52 (55%) provenían de muestras de esputo, 11 (11.6%) de sangre, 10 (10.5%) de lavado bronquial, 7 (7.4%) de biopsia y 15 (15.8%) de otro tipo de muestra. Un menor número de cepas fueron aisladas de muestras como cepillados bronquiales y broncoscopías.

*Tabla 2.* Procedencia de las cepas obtenidas según el tipo de muestra (N=95)

Tipo de Muestra	n (%)	
Esputo	52	(54.7)
Médula ósea	02	(2.1)
Líquido cefalorraquídeo	01	(1.1)
Sangre	11	(11.6)
Orina	01	(1.1)
Líquido pleural	02	(2.1)
Lavado bronquial	10	(10.5)
Aspirado orotraqueal	02	(2.1)
Secreción	02	(2.1)
Biopsia	07	(7.4)
Otros	05	(5.3)
Cepillado bronquial	03	(3.2)
Broncoscopía	02	(2.1)

Ochenta y uno (85.3%) de estas cepas fueron identificadas como *M. tuberculosis*, 10 (10.5%) como *Mycobacterium* spp. y 4 (4.2%) no fue posible identificarlas por contaminación o por la mínima cantidad de colonias obtenidas del mismo (*Tabla 3*).

*Tabla 3.* Identificación de cepas de micobacterias aisladas (N=95)

Identificación	Total	(%)
<i>M. tuberculosis</i>	81	85.3
Otras micobacterias	10	10.5
ND <sup>1</sup>	4	4.2

<sup>1</sup>ND: No determinada por contaminación o falta de crecimiento de la cepa

En estas 81 cepas se efectuó la susceptibilidad antibiótica a través del método directo de las proporciones, sin embargo en 4 de ellas no fue posible determinarla (ver *Tabla 4*). Se pudo observar que 61 (82.4%) cepas fueron susceptibles a las 4 drogas de elección para el tratamiento de la tuberculosis en Guatemala<sup>1</sup>. Se esperaba que todas las cepas fueran susceptibles, sin embargo, 4 (5.5%) cepas fueron resistentes a 1 droga, 3 (4.1%) de ellas a INH y 1 (1.4%) a SM. La resistencia a dos drogas se observó también en 4 (5.5%) cepas, 3 (4.1%) de ellas correspondían a una resistencia con INH + SM y 1 (1.4%) a SM + EMB. La resistencia a tres drogas de elección se obtuvo en 2 (2.7%) cepas en las que se observó el mismo patrón: INH + SM + RIF. Tres cepas fueron resistentes a las 4 drogas, que incluye las tres drogas anteriores más EMB.

Se considera que cepas multirresistentes de *M. tuberculosis* son las resistentes al menos a INH y RIF, con o sin resistencia a otras drogas, lo que significa que 5 (6.8%) del total de cepas presentaron multirresistencia y por lo tanto se consideraron para este estudio *M. tuberculosis* multidroga-resistente (MDR-TB).

De las 81 muestras a las que se les realizó la prueba de niacina, en 5 cepas no fue posible obtener resultados de susceptibilidad antibiótica, por lo que solamente en 76 muestras se pudo completar la información. De estas 76 muestras, dos pacientes tuvieron reinfección por lo que en total hubo 74 cepas individuales de *M. tuberculosis*.

*Tabla 4.* Tipo de Resistencia antibiótica presentada por cepas de *M. tuberculosis* por paciente (N=74)

Tipo de Resistencia antibiótica	n (%)	n (%)
Susceptible a 4 drogas INH + SM + RIF + EMB <sup>1</sup>	61 (82.4)	
Resistente a 1 droga	4 (5.5)	
INH		3 (4.1)
SM		1 (1.4)
EMB		-
RIF		-
Resistente a 2 drogas	4 (5.5)	
INH + SM		3 (4.1)
SM + EMB		1 (1.4)
Resistente a 3 drogas	2 (2.7)	
INH + SM + RIF		2 (2.7)
Resistente a 4 drogas	3 (4.1)	
INH + SM + RIF + EMB		3 (4.1)

<sup>1,2</sup> Isoniacida (INH), Etambutol (EMB). Estreptomycin (SM), Rifampicina (RIF) (ver anexo 5). El esquema de tratamiento inicial en Guatemala dura 6 meses y comprende 4 medicamentos: INH, RIF, PZA, EMB.

En la tabla 5 puede observarse que la susceptibilidad antibiótica y el estado de VIH en los pacientes fue más alarmante en las PVVS ya que se observó que de ellos, 9 (12%) habían sido infectados con cepas resistentes a una o más drogas y 35 fueron susceptibles a las 4 drogas. Se observó también que en pacientes VIH negativo, 4 (5%) fueron resistentes a una o más drogas. Solamente una persona a la que se le observó multirresistencia había tenido tratamiento previo contra la tuberculosis. En este estudio, los dos pacientes que presentaron reinfección meses después, ninguno de ellos se reinfectó con otro tipo de cepa en lo que a resultados de susceptibilidad antibiótica se refiere.

*Tabla 5.* Susceptibilidad y resistencia a drogas de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en el año 2002 y estado de VIH por paciente (N=74)

Susceptibilidad/Resistencia n (%)	VIH positivo n=44 n (%)	VIH negativo n=30 n (%)
Susceptibles a las 4 drogas 61 (82.4)	35 (47.3)	26 (35.1)
Resistentes a una o más drogas 13 (17.6)	09 (12.2)	04 (5.4)

Con respecto al análisis genético de las muestras procesadas con la técnica de dobles elementos repetidos-reacción en cadena de la polimerasa (DRE-PCR), 64 (73.3%) amplificaron y 25 (26.7%) no logró amplificarse con esta técnica (Ver *Tabla 6*).

*Tabla 6.* Muestras procesadas, amplificadas y patrones genéticos obtenidos con la técnica de Dobles elementos repetidos-reacción en cadena de la polimerasa (DRE-PCR por sus siglas en inglés), (N=89).

	n (%)
<b>Procesadas DRE-PCR</b>	89 (100)
Amplificadas	64 (73.3)
No amplificadas	25 (26.7)
<b>Patrones genéticos</b>	64 (100)
Agrupados	41 (64.1)
No agrupados	23 (35.9)

De las muestras amplificadas 41 (64.1%) presentaron patrones genéticos agrupados que están representados por aquellos patrones que se encontraron en dos o más cepas de *M. tuberculosis*. Los patrones no agrupados fueron encontrados en 23 (35.9%) pacientes.

Estos datos pueden observarse en la *Tabla 6* y en la *Figura 1*. Esta última representa un análisis por dendrograma que se obtuvo a través del programa *gene profile 4.06 scanalitic*. En ambos se observa la distribución final de los patrones genéticos agrupados y las cepas con patrones únicos. Los patrones genéticos agrupados, se distribuyeron en 14 grupos y se observó mayor número de cepas en los grupos 3 (17.1%) y grupo 8 (12.2%) En el grupo 1, 7, 9 10, 11, 13 y 14 se observó que presentaban 2 cepas cada uno, lo cual corresponde a un total de 34.3%. Las cepas que no amplificaron 25 (26.7%) probablemente correspondían a otras especies del género ya que la técnica de DRE-PCR se considera específica para el estudio molecular de *M. tuberculosis* (ver *Tabla 7*)

*Tabla 7.* Distribución de las cepas de *M. tuberculosis* amplificadas por patrones genéticos agrupados (N=41).

Grupos	No. Cepas	(%)
1	2	4.9
2	3	7.3
3	7	17.1
4	3	7.3
5	3	7.3
6	3	7.3
7	2	4.9
8	5	12.2
9	2	4.9
10	2	4.9
11	2	4.9
12	3	7.3
13	2	4.9
14	2	4.9
TOTAL	41	100

En la *Tabla 8* se observa el análisis de las 56 muestras que formaron patrones genéticos agrupados (clusters) o no, contra la información epidemiológica de los pacientes que se detalló anteriormente. Sin embargo, se puede observar, que ninguna característica epidemiológica fue significativa con respecto a la formación de cluster, es decir, que estadísticamente ninguna de estas características pudo asociarse a ello ( $p < 0.05$ ).

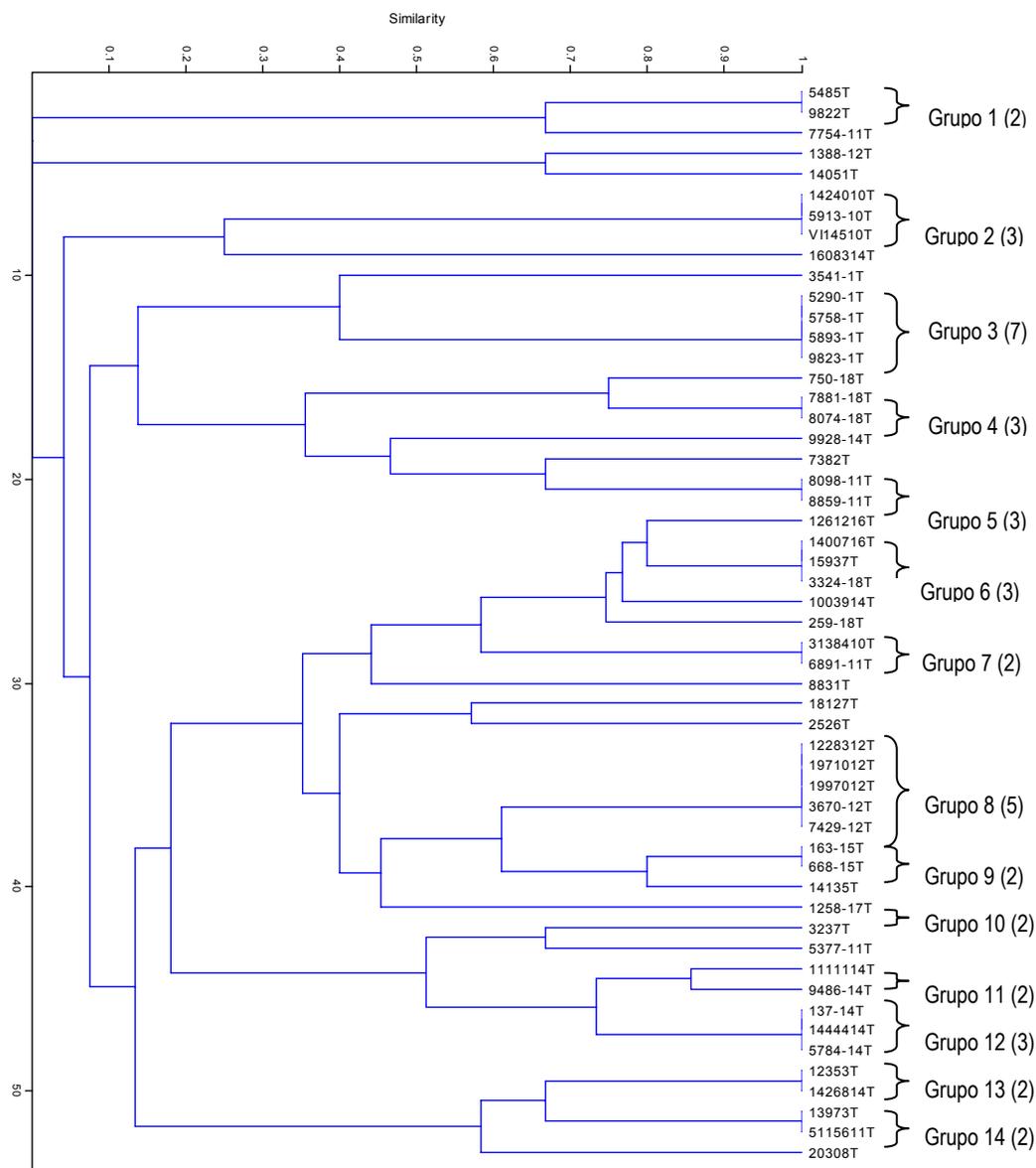
Tabla 8. Información epidemiológica de las cepas analizadas (N=56)

Característica	Total n (%)	Formación de cluster <sup>1</sup>		OR <sup>2</sup>	Valor de la probabilidad <sup>3</sup>	IC <sup>4</sup>
		Si n (%)	No n (%)			
<b>Tipo de usuario</b>						
Ambulatorio	26 (46.4)	18 (69.2)	8 (30.8)	1.72	0.34	0.50-6.01
Hospitalizado	30 (53.6)	17 (56.7)	13 (43.3)			
<b>Unidad</b>						
Medicina de hombres	16 (53.3)	10 (62.5)	6 (37.5)	1.04	0.96	0.18-6.09
Medicina mujeres/otros	14 (26.4)	7 (50.0)	7 (50.0)			
<b>Género</b>						
Masculino	39 (69.6)	23 (59.0)	16 (61.0)	0.60	0.41	0.15-2.35
Femenino	17 (30.6)	12 (70.6)	5 (29.4)			
<b>Edad</b>						
15-33	29 (51.8)	16 (55.2)	13 (44.8)	0.52	0.24	0.15-1.78
34-72	27 (48.2)	19 (70.4)	8 (29.6)			
<b>Lugar de Nacimiento</b>						
Depto. Guatemala	23 (41.8)	15 (65.2)	8 (34.8)	1.28	0.66	0.37-4.52
Otros Departamentos	32 (58.2)	19 (59.4)	13 (40.6)			
<b>Personas que viven en</b>						
Una habitación	18 (52.9)	14 (77.8)	4 (22.2)	2.10	0.34	0.37-12.31
Más de una	16 (47.1)	10 (62.5)	6 (37.5)			
<b>Detenidos</b>						
Si	13 (44.9)	9 (69.2)	4 (30.8)	0.75	0.73	0.11-5.5
No	16 (55.1)	12 (75.0)	4 (25.0)			
<b>Clínica Neumología</b>						
Si	17 (50.0)	13 (76.5)	4 (23.5)	2.28	0.28	0.42-13.0
No	17 (50.0)	10 (58.8)	7 (41.2)			
<b>Estado VIH</b>						
VIH positivo	34 (60.7)	24 (70.6)	10 (29.4)	2.40	0.12	0.69-8.55
VIH negativo	22 (39.3)	11 (50.0)	11 (50.0)			
<b>Multidroga-resistente</b>						
Si	11 (19.6)	6 (54.4)	5 (45.6)	0.66	0.55	0.15-3.03
No	45 (80.4)	29 (64.4)	16 (35.6)			

<sup>1</sup>Cluster = Dos o más patrones genéticos idénticos. <sup>2</sup>OR= Razón de Momios (Odd Ratio); <sup>3</sup> $\alpha=0.05$ , chi-cuadrado; <sup>4</sup>IC<sub>95</sub>= Intervalo de confianza al 95%.

Figura 1. Análisis de Dendrograma por Índice de DICE<sup>1</sup> de las cepas caracterizadas genéticamente de *M. tuberculosis*.

Las fotografías correspondientes a los geles obtenidos para cada grupo pueden observarse en el **anexo 10**.



<sup>1</sup>El dendrograma es el resultado final de un proceso de agrupamiento en el que puede verse, primero, cómo las diversas cepas se agrupan: las que están a una menor distancia (las más parecidas), y cómo después se unen entre sí. Este dendrograma se ha construido en base a los resultados obtenidos con el programa *gene profile 4.06 scanalitic* y a la similitud y/o diferencia en los patrones genéticos obtenidos de las cepas de *M. tuberculosis* con la técnica de DRE-PCR.

Las muestras que formaron patrones genéticos, con resistencia a una o más drogas antituberculosas fueron 4 (30.8% del total de las muestras) distribuidas en los patrones genéticos 3 y 8. Nueve (69.2%) muestras más presentaron resistencia, pero no formaron ningún patrón genético, lo que hace un total de 13 muestras con resistencia a una o más drogas.

En la *Tabla 9*, se pueden observar estos datos y la información epidemiológica de 8 de estos pacientes, los cuales 3 (62.5%) provenían de pacientes hospitalizados y 5 (37.5%) de pacientes ambulatorios. Cinco (62.5%) de los pacientes indicaron que vive más de una persona por habitación en su casa, 4 (50.0%) estuvieron detenidos y 6 (75.0%) de los pacientes habían estado hospitalizados. En cuanto al estado de VIH de los pacientes, 6 (75.0%) fueron positivos y 2 (25.0%) negativos. El paciente con tratamiento antituberculoso tenía el esquema de tratamiento utilizado en la atención primaria de la tuberculosis.

*Tabla 9.* Características demográficas de los pacientes con cepas resistentes a una o más drogas con información epidemiológica (N=08)

Característica	Total n (%)	Característica	Total n (%)
<b>Tipo de usuario</b>		<b>Detenidos</b>	
Ambulatorio	5 (62.5)	Si	4 (50.0)
Hospitalizado	3 (37.5)	No	3 (37.5)
		Desconocido	1 (12.5)
<b>Unidad</b>		<b>Ha estado hospitalizado</b>	
Medicina de hombres	3 (37.5)	Si	6 (75.0)
Medicina mujeres/otros	5 (62.5)	No	1 (12.5)
		Desconocido	1 (12.5)
<b>Género</b>		<b>Estado VIH</b>	
Masculino	3 (37.5)	VIH positivo	6 (75.0)
Femenino	5 (62.5)	VIH negativo	2 (25.0)
<b>Edad</b>		<b>Tratamiento previo anti -TB</b>	
15-33	4 (54.5)	Si	1 (12.5)
34-72	4 (45.5)	No	6 (75.0)
		Desconocido	1 (12.5)
<b>Lugar de Nacimiento</b>		<b>Patrón genético</b>	
Depto. Guatemala	4 (50.0)	Grupo 3	3 (37.5)
Otros Departamentos	4 (50.0)	Grupo 8	1 (12.5)
		Ninguno	4 (50.0)
<b>No. de personas/habitación</b>			
Una persona	3 (37.5)		
Más de una	5 (62.5)		

En la *Tabla 10* se resalta que de las 13 muestras que presentaron resistencia a una o más drogas, 4 (30.8%) de ellas son mono-droga resistente, 3 cepas fueron resistentes a INH, una situada en el patrón 3 y las otras dos, al igual que la cepa que fue resistente a SM, no formaron ningún patrón genético. En su totalidad, 4 (30.8%) muestras fueron resistentes a dos drogas. Tres fueron resistentes a INH + SM, de éstas una se encontró en el patrón 8 y dos cepas no se ubicaron en algún patrón genético. Una cepa fue resistente a RIF + EMB y perteneció al patrón 3.

De las 5 (38.5%) cepas que fueron resistentes a 3 o más drogas de elección en el tratamiento de la tuberculosis (INH, SM, EMB, RIF) y que por lo tanto se consideran como cepas tuberculosis multidroga-resistente (MDRTB) se encontraron 3 cepas resistentes a 3 drogas (INH + SM + RIF), una en el patrón 3 y las otras dos no formaron patrón genético alguno. Dos cepas fueron resistentes a las 4 drogas y ninguna de éstas formó patrón genético. En total fueron 4 (30.8%) de estas cepas, las que no se integraron en algún patrón genético. Por último en esta tabla puede observarse que 9 (70%) de estas cepas que presentaron resistencia a alguna droga pertenecían a personas viviendo con VIH/SIDA.

*Tabla 10.* Cepas resistentes a una o más drogas, frecuencia en el patrón genético y número de PVVS co-infectados con estas cepas resistentes (N=13).

MDR <sup>1</sup>	Patrón			Total	PVVS
	Único	3	8		
<b>DR 1</b>				4	3
INH	2	1			
SM	1				
<b>DR 2</b>				4	3
INH + SM	2		1		
RIF + EMB		1			
<b>MDR ≥3</b>				5	3
INH + SM + RIF	2	1			
INH + SM + RIF + EMB <sup>2</sup>	2				

-----  
<sup>1</sup>Multidroga-resistente (MDR)

<sup>2</sup>Isoniacida (INH), Estreptomycin (SM), Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB).

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

La población de muestras estudiadas provinieron de personas que acudieron al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002, en su mayoría (53.6%) de pacientes que en ese año estuvieron hospitalizados, quienes presentaron una TB activa y de curso avanzado. Con esta característica se aumentaba el riesgo de contraer TB como ha sido reportado en otro estudio en el que se demostró que contactos cercanos con pacientes con TB, los procedimientos y atención médica en un hospital, o ir a la misma clínica el mismo día aumenta el riesgo de contraer la infección (72).

En este estudio el 41% de los pacientes había estado hospitalizado anteriormente. Esta situación puso en riesgo la transmisión de la tuberculosis entre estos pacientes, ya que la transmisión depende de la capacidad infectiva del paciente y el tiempo que dura la exposición a los bacilos en el ambiente que los contiene. Ha sido reportado que el 15-30% de las personas que ha sido expuesta adquirirá la infección de la tuberculosis (2).

La mayoría de pacientes fueron hombres y estaban comprendidos entre la edad de 26-45 años, quienes pertenecían a la población reproductiva y económicamente activa para el desarrollo del país. De Guatemala, Suchitepequez y Escuintla, se reportó el mayor número de casos de tuberculosis en este estudio, lo que correlaciona con la alta incidencia reportada en estos Departamentos por el Ministerio de Salud a través del Programa Nacional de la Tuberculosis<sup>1</sup> (3).

Trece pacientes estuvieron alguna vez detenidos en la cárcel y presentaron tuberculosis; esto solamente confirma lo que diversas investigaciones han reportado: el hacinamiento es un factor que incrementa el riesgo de contraer no solamente tuberculosis sino una tuberculosis multidroga-resistente. Además de aumentar la probabilidad de infectarse con el VIH (73). En un estudio realizado por Ferreira MMC, *et al* en el año de 1996, reportó que el encarcelamiento y la infección con VIH estaban asociadas con contraer tuberculosis y que la transmisión de esta enfermedad era más común adquirirla en los primeros 12 meses de estar dentro de la cárcel. Este estudio fue realizado con 350 mujeres, de las cuales 87 (25%) eran VIH positivo. El estar en prisión puede ser una nueva fuente de transmisión de la tuberculosis (73). En este estudio, 11 de 13 pacientes que estuvieron encarcelados eran PVVS.

<sup>1</sup>Programa Nacional de la tuberculosis-tasas de incidencia en la República de Guatemala.

La mayoría de pacientes con tuberculosis dejan de propagar las bacterias después de tomar el tratamiento por dos a tres semanas, así que un tratamiento inmediato reduciría en gran medida la transmisión activa de las micobacterias (2).

El tipo de muestra del que más se aislaron las cepas de micobacterias fue de esputo (55%) y lavado bronquial (11%) reflejando que la forma en que más se presenta la infección es principalmente a nivel pulmonar e indica el peligro potencial en la transmisión de la tuberculosis. Seguidamente se observó en 12% de las muestras de sangre lo que evidencia una infección extrapulmonar que se presenta con mayor frecuencia en PVVS (2,5,8,22).

Las 95 cepas obtenidas se tipificaron a través de la prueba de niacina, la cual, en un resultado positivo, especifica la presencia de *M. tuberculosis* y en un resultado negativo, la presencia de micobacterias atípicas o saprófitas que son, generalmente, resistentes a las drogas para el tratamiento de la tuberculosis. De las 10 cepas que fueron niacina negativo, 8 pertenecían a PVVS, por lo tanto se hace evidente que en estos pacientes siempre deben cultivarse las muestras de tuberculosis y por lo tanto hacerles la prueba de niacina. Esto favorecerá al paciente adecuándole el tratamiento de primera o segunda línea según sea el caso de ser una tuberculosis por *M. tuberculosis* u otra micobacteria.

La susceptibilidad antibiótica se llevó a cabo por el método directo de las proporciones de Canetti y colaboradores, el cual ha sido utilizado en diversos estudios para validar la prueba de susceptibilidad (18,41,50,74). Sesenta y uno (82.4%) cepas fueron susceptibles a las 4 drogas antituberculosas y 13 (17.6%) resistentes a una o más drogas, lo cual puede indicar que estos pacientes con cepas resistentes tendrían una terapia más larga, más tóxica y más cara que una terapia para cepas susceptibles. Este factor influye e incrementa económicamente los protocolos de salud del país y afecta la salud del paciente, ya que la terapia para una tuberculosis multidroga-resistente (MDR-TB) varía en un rango de 6 a 12 meses y para las PVVS y otros pacientes con inmunosupresión se recomienda una terapia de al menos 12 meses (2).

En general la droga en la que se observó mayor resistencia fue la INH (once de trece cepas) y en seis casos resistencia a RIF, lo cual es preocupante porque la INH y la RIF conforman la parte medular del esquema de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, no solamente en Guatemala sino en otros países en vías de desarrollo (35).

En un estudio realizado en Guatemala por Harrow EM et al, en 1998 se encontró 30% de resistencia a alguna droga antituberculosa y así como en este estudio, la resistencia a INH fue la más común (21%) (18).

Entre las principales razones por las que una persona puede adquirir una cepa multirresistente, se consideran: el incumplimiento del tratamiento, monoterapia y esquemas de tratamiento incorrectos, lo que permite la acumulación de mutaciones genéticas que afectan los sitios de acción de las drogas (9,23,44).

En este estudio el 48% de pacientes había tenido previamente tratamiento antituberculoso y todos ellos recibieron el esquema de tratamiento de primera línea en Guatemala, es decir, que se proporcionó este tratamiento inclusive a pacientes con micobacterias no tuberculosas, lo cual es inadecuado y favorece el inicio de una resistencia antibiótica. También se observó que el incumplimiento del tratamiento fue una de las razones por las que podrían haber adquirido resistencia, ya que de los 13 pacientes que presentaron resistencia a alguna droga solamente 2 tenían anteriormente tratamiento para la tuberculosis.

El estado de VIH positivo ( $P>0.05$ ) incrementó los casos de cepas MDR-TB<sup>1</sup>, ya que 9 (70%) de los 13 pacientes eran personas viviendo con VIH/SIDA y presentaron resistencia a una o más drogas y 3 de ellos a cepas MDR-TB. En estas personas la tuberculosis presentó características clínicas atípicas, favoreciendo la aparición de la forma extrapulmonar y la aparición de resistencia adquirida a las drogas antituberculosas (2).

En diversos estudios se ha demostrado que los casos en que se presenta tuberculosis resistente se incrementan significativamente la morbilidad, la mortalidad y fallos en el tratamiento para esta enfermedad (18), además se cifra en 5-10 veces mayor el riesgo de contraer tuberculosis, que en la población en general. En una exposición de pacientes sin VIH, solo un 3-5% adquirirá una tuberculosis activa; en pacientes VIH positivo del 17-37% la desarrollan entre uno y cuatro meses tras la exposición (2).

-----  
<sup>1</sup>Resistencia a dos o más drogas, incluyendo al menos la rifampicina (RIF) e isoniacida (INH)= MDR-TB.

Para disminuir la transmisión de cepas multirresistentes se debe mejorar la vigilancia de la tuberculosis principalmente en hospitales y cárceles, dar terapia preventiva a quienes presentan un examen de PPD positivo así como para quienes trabajan en instituciones de salud. El riesgo de desarrollar una enfermedad activa en los trabajadores de salud ha sido estimado en 5% en el primer año y 5-10% en los años siguientes (74).

En Guatemala se ha tratado de implementar la terapia acortada estrictamente supervisada –TAES- (DOT, por sus siglas en inglés), pero debido a la situación social y económica que vive el país, esta medida no ha sido posible llevarla a cabo y por ende se incrementa la probabilidad tanto de un tratamiento no continuo, como de la aparición de cepas multirresistentes (12,23,52).

Con respecto a la epidemiología observada en el análisis genético de este estudio, se pudo analizar que de las 64 cepas que amplificaron por la técnica de DRE-PCR, 41 (64%) formaron patrones genéticos agrupados (clusters) y 23 (36%) formaron patrones genéticos únicos.

Como ha sido reportado en otros estudios, las cepas que formaron patrones genéticos agrupados indican una infección reciente (tuberculosis primaria), mientras que aquellos con patrones genéticos únicos provienen de personas con una tuberculosis reactivada (72,75). Las causas por las que 25 (26.7%) cepas no amplificaron puede explicarse por varios factores entre los que se puede mencionar: concentraciones extremas de ADN (efecto de zona), en el cual las concentraciones bajas pueden presentarse al utilizar poco material genético proveniente de los cultivos, o las concentraciones altas que inhiben la actividad de la enzima *Taq* polimerasa, que se encarga de la amplificación del material genético (59).

El grupo 3 fue el patrón en el que se agrupó un mayor número de cepas (7) mostrando huellas genéticas idénticas, por lo que conformó uno de los patrones genéticos (cluster) encontrados en este estudio.

Se comparó a las cepas que presentaron resistencia y que formaron patrones genéticos agrupados o no, con las características epidemiológicas de los pacientes y ninguna de las variables incluidas presentó una diferencia estadísticamente significativa a la formación de patrones agrupados o únicos ( $P > 0.05$ ). Cabe mencionar que en otros estudios estas variables se han encontrado relacionadas a la formación de patrones

agrupados (72,74) (*Tabla 8*). Es probable que en este estudio no se haya observado esta diferencia a causa de ser una muestra muy pequeña para hacer análisis estadístico, lo cual representa una limitante en este estudio.

En general, se encontró que la mayoría de las cepas formaron patrones agrupados que indican, como se expuso anteriormente, no solamente una infección reciente sino además, una enfermedad transmisible. Por otro lado cabe mencionar que en nuestro país la transmisión de la tuberculosis se mantiene activa y poco controlada por los sistemas de salud, lo que conlleva a una baja detección de casos activos y por ende la administración de tratamiento tardío. Esta situación se refleja principalmente en lugares que favorecen condiciones de hacinamiento como cárceles, hospitales y Centros de Salud en los que no existe algún tipo de aislamiento en salas de visita o consulta y el bacilo permanece en el ambiente.

Se analizaron las características demográficas de los 8 pacientes que presentaron algún tipo de resistencia. Las características importantes de resaltar fueron que la mayoría de pacientes respondió que vivía más de una persona por habitación, 4 estuvieron detenidos y 6 hospitalizados. Todas estas condiciones reflejan hacinamiento y predispone la facilidad de infectarse con tuberculosis. Una persona con tuberculosis activa puede infectar a las personas que están a su alrededor (2).

Se pudo observar que la mayoría de cepas que fueron resistentes a una o más drogas (9 de 13 cepas (70%)) no formaron patrones genéticos agrupados, sino patrones genéticos únicos, que indican reactivación de la enfermedad, principalmente en pacientes con inmunocompromiso, como las PVVS u otro tipo de pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos (74). En la *Tabla 10* se observa que 9 de los pacientes con resistencia a una o más drogas eran VIH positivo, de ellas, 4 formaron patrones genéticos agrupados y el resto (9) pertenecían a patrones genéticos únicos.

Dentro de las cepas que formaron el patrón 3 se encontraron a tres de ellas que fueron resistentes a una, dos y tres drogas, incluyendo en todos los casos resistencia a INH.

El VIH deprime progresivamente el sistema inmune y a la vez favorece la reactivación de una tuberculosis primaria, promoviendo que ésta se convierta en una enfermedad activa (76). Esta co-infección tiende a aumentar la circulación de cepas de *M.*

*tuberculosis* resistente a drogas y producir manifestaciones específicas que complican tanto el diagnóstico, como el tratamiento y el control de la tuberculosis asociada a PVVS (76).

La cantidad de pacientes infectados con VIH refleja que la tuberculosis (TB) se considera como una de las principales enfermedades que afecta a las personas viviendo con VIH/SIDA (PVVS) (2). En este estudio el 61% de los pacientes presentaron esta co-infección.

Para finalizar, la técnica de DRE-PCR puede ser una herramienta útil para detectar cambios en la transmisión de patrones genéticos y monitorear la proporción de los casos nuevos y reactivación de la tuberculosis en una población determinada (72).

El alto grado de diversidad en los patrones genéticos obtenidos en este estudio (agrupados y únicos), sus características demográficas y clínicas sugieren que una gran proporción de nuevos casos de tuberculosis son atribuidos a una reactivación de una infección adquirida muchos años atrás, mientras que para las PVVS se atribuye a una infección reciente (72). Esto demuestra que sí existen patrones genéticos y de susceptibilidad antibiótica similares entre las cepas que circulan en la población estudiada en el año 2002 del Hospital General San Juan de Dios.

Los resultados de este estudio demuestran la necesidad urgente de implementar medidas de control para prevenir casos subsecuentes de MDR-TB. La resistencia a drogas tiene una importante implicación no solo en los programas de salud pública sino a nivel mundial para la erradicación de la enfermedad (61).

En la actualidad es necesario un programa de control mundial para disminuir los casos de tuberculosis y éste debe centrarse en *i)* detectar tempranamente los casos de TB y dar un tratamiento inmediato, *ii)* prevenir la TB por medio de la vacuna de la BCG y el tratamiento profiláctico *iii)* y dar un tratamiento adecuado concluyéndolo adecuadamente (77).

## X. CONCLUSIONES

1. Sí existen patrones genéticos y de susceptibilidad antibiótica similares entre las cepas que circulan en la población guatemalteca que asistió al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002.
2. Sesenta y uno (82.4%) cepas de *M. tuberculosis* fueron susceptibles a las 4 drogas de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis y 13 (17.6%) fueron resistentes a una o más drogas.
3. Se observó multirresistencia en el 64% de las micobacterias que se están transmitiendo recientemente en los grupos de población.
4. En esta muestra de población las micobacterias se observaron en la mayor parte de las infecciones recientemente adquiridas demostradas a través de la formación de patrones genéticos agrupados.
5. Cinco cepas (38.7%) de las que presentaron resistencia se consideran como multidroga-resistente, tres resistentes a 3 drogas y dos resistentes a las 4 drogas utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis.
6. Treinta y cuatro (61%) de los pacientes integrados en este estudio fueron personas viviendo con VIH/SIDA, de los cuales 9 (26%) presentaron resistencia a una o más drogas antituberculosas.
7. Ninguna característica epidemiológica fue estadísticamente significativa con respecto a la formación de grupos genéticos.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar programas de control adecuados y funcionales para disminuir los casos de tuberculosis en Guatemala y evitar así la transmisión continua no solamente de una tuberculosis susceptible a drogas sino de una tuberculosis multidroga-resistente.
2. Mejorar la vigilancia de la tuberculosis para disminuir la transmisión principalmente en hospitales y cárceles que favorecen condiciones de hacinamiento y dar terapia preventiva a quienes presentan un examen de PPD positivo así como para quienes trabajan en instituciones de salud.
3. Implementar tratamientos inmediatos, continuos y adecuados a los pacientes con tuberculosis para evitar en ellos la adquisición de una tuberculosis multidroga-resistente.
4. Hacer cultivo de las muestras de tuberculosis e implementar rutinariamente la prueba de niacina para identificar las micobacterias, en especial en las PVVS en quienes se considera existe una gran proporción de infección por micobacterias no tuberculosas.
5. Utilizar análisis genéticos para detectar la transmisión de los patrones genéticos formados y para monitorear tanto la proporción de casos nuevos como los de reactivación de la tuberculosis.

## XII. REFERENCIAS

1. Division of tuberculosis elimination (DTBE). Frequently asked questions. Disponible en [http: www.cdc.gov/nchstp/TB/faqs/qa.html](http://www.cdc.gov/nchstp/TB/faqs/qa.html) 2001; 13 p.
2. Acceso computarizado a la salud de New York (NOAH). Qué es la tuberculosis? Disponible en [http: www.noah-health.org/spanish/illness/TB/spTB.html](http://www.noah-health.org/spanish/illness/TB/spTB.html). 2001; 20p.
3. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). Situación actual del estado de salud de la población. La semana epidemiológica en Guatemala. 2002; 5(214): 18.
4. Adler, J, GF. Tuberculosis transmission among health care workers. J Med. 1991; 91: 89-90.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual Clínico TB/VIH. 1998; 164p.
6. Tuberculosis infection review. Disponible en [http: www.science-education.nih.gov/nih.html](http://www.science-education.nih.gov/nih.html) 2000. 3p.
7. Ashok R, Awdhesh K, Nishta A. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. Emer Infect Dis. 1998; 4(2): 1-19.
8. Telzak EE. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. Medical clinics of North America. 1997; 81(2): 345-360.
9. World Health Organization (WHO). Brinding the gaps: the world health report. Geneva: The Organization; 1995.
10. World Health Organization (WHO). Report on tuberculosis epidemic. Global tuberculosis programme. Geneva: The Organization; 1997.
11. Environ health perspect. TB: New research and old disease. Disponible en [http: www.nature.com/nm/special-focus/TB/html](http://www.nature.com/nm/special-focus/TB/html). 1998; 106-111p.
12. CDC. Acquired multidrug-resistant tuberculosis-Colombia. MMWR. 1998; 47(36): 759-761.
13. World Health Organization (WHO). Global profile: case notification and detection rates, 1999-2000. Disponible en [http: www.who.int/gTB/publications/globrep02/download.html](http://www.who.int/gTB/publications/globrep02/download.html) 2002; 12p.
14. Rodríguez JM, Young CM, Díaz SA. Resistencia primaria a fármacos en la tuberculosis y comparación de pacientes con un tratamiento previo en dos centros mayores de referencia y una clínica privada en la ciudad de Guatemala, 1998. Revista de RECCAVIR. 2002; 1(2): 14-21.

15. Lari N, et al. Typing of human *Mycobacterium avium* isolates in Italy by IS1245-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(12): 3694-3697.
16. Barnes P, et al. Tuberculosis in patients with immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1644-1650.
17. Genewein A, et al. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet.* 1993; 342: 841-844.
18. Harrow EM, et al. Epidemiology and clinical consequences of drug-resistant tuberculosis in a Guatemalan hospital. *CHEST.* 1998; 113: 1452-1458.
19. Murray PR, et al. *Microbiología Médica.* Trad. por Diorki. Servicios integrales de edición Mosby-Doyma libros, S.A. 1995. X+725p. (p. 218-230).
20. Rippon JW. *Tratado de micología médica.* Trad. por Laura Castañeda. 3ª. ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, 1990; VIII+855p. (p. 17-32).
21. Ramírez García, MJ. Identificación de especies de micobacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios de 1988-1989. *USAC* 1992; 85 P. 23-28.
22. Sepkowitz KA, et al. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8(2): 180-199.
23. Riley LW. Drug-resistant tuberculosis. *CID.* 1993; 17(2): 442-446.
24. Villarino ME, et al. Management of persons exposed to multidrug-resistant tuberculosis. *MMWR.* 1992; 41(RR-11): 59-71.
25. García ML, et al. A tuberculosis micro-epidemic in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 66:195-208.
26. Bai GH. Bacteriology and Laboratory services in tuberculosis control. The 7<sup>TH</sup> international course for tuberculosis control. Republic of Korea. 2002; 1-51.
27. Vestal, AL. Procedures for isolation and identification of mycobacteria. Centers for Disease Control. HHS Publication No. (CDC)81-8230. 1975; VII+136p. (14-16, 20-32p.)
28. Koneman EW. *Diagnóstico microbiológico* 5ed. Editorial medica panamericana 1999 Buenos aires argentina. XV+1432 (p. 868-926).
29. CDC. Performance evaluation program for *Mycobacterium tuberculosis* drug-susceptibility testing process. *MMWR.* 1994; 43(1): 17-18.

30. Friedman CR, et al. Widespread dissemination of a drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. JID. 1997; 176: 478-484.
31. Tornieporth, NG, et al. Tuberculosis among foreign-born persons in New York City, 1992-1994: Implications for tuberculosis control. Int J Tuberc Lung Dis. 1997; 1(6):528-535.
32. American Society Microbiology (ASM). Clinical microbiology procedures handbook. 1996; 42p.
33. CDC. Recall of isoniazid used for antimicrobial susceptibility testing for tuberculosis. MMWR. 2000; 49(34): 780-782.
34. Grange JM. Resistencia a drogas y eliminación de la tuberculosis. Boletín de la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratoria –UICTER-. 1990; 65(2-3): 63-66.
35. Sistema integral de atención en salud (SIAS). Manual de referencia para la aplicación de las normas de atención. Tuberculosis. 1997; 72p. (20-35p.).
36. Johns Hopkins. Center for tuberculosis research. Características de las drogas principales contra la tuberculosis. Disponible en [http: www.hopkins-TB.org/drug/drug\\_1.shtml](http://www.hopkins-TB.org/drug/drug_1.shtml) 1997; 2p.
37. CDC. Severe and fatal liver injury connected to latent TB treatment. MMWR. 2000; 40 (5): 501-506.
38. CDC. Severe isoniazid-associated hepatitis-New York, 1991-1993. MMWR. 1993; 42(28): 545-547.
39. Kopanoff, DE. et al. Isoniazid-related hepatitis: a U.S. Public health service cooperative surveillance study. Am Rev Respir Dis. 1978; 117: 991-1001.
40. Committee on Prophylaxis, International Union Against TB. Efficacy of various durations of isonizid preventive therapy for TB: five years of follow up in the IUAT trial. Bull WHO. 1982; 60: 555-564.
41. Kritski AL, et al. Retreatment tuberculosis cases. Factors associated with drug resistance and adverse outcomes. CHEST. 1997; 111: 1162-1167.
42. Cohn DL, El-Sadr WM. Treatment of latent tuberculosis infection. The 7<sup>TH</sup> international course for tuberculosis control. Republic of Korea. 2002; 471-502
43. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). Manual de técnicas y procedimientos de bacteriología de la tuberculosis. Guatemala. 1999; 57p. (5-17p.)

44. American Lung Association. Tuberculosis multidroga-resistente. Disponible en <http://www.lungusa.org/diseases/mdrTBfac.html> 2001; 5p.
45. Sola C, et al. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg Infect Dis J.* 1999; 5(3):1-16.
46. CDC. Probable transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a correctional facility-California. *MMWR.* 1993; 42(3): 48-51.
47. Barry CE. DNA microarrays: translational tools for understanding the biology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 2000; 8(20): 306-310.
48. Nature. Genome gateway. Disponible en <http://www.nature.com/genomics.html> 1998; 3p.
49. Berti PJ. Enzyme mechanisms and inhibition: vibrating our way to new drugs. 2000; 1-7p.
50. Alito A, et al. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3): 788-791.
51. CDC. Primary multidrug-resistant tuberculosis-Ivanovo, Rusia. *MMWR.* 1999; 48 (30): 661-664.
52. La tuberculosis resistente a drogas puede ser controlada. Disponible en [http://www.studenTBmj.com/back\\_issues/050html](http://www.studenTBmj.com/back_issues/050html) 2000; 2p.
53. CDC. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons-Florida and New York. *MMWR.* 1991; 40: 585-591.
54. CDC. Prevention and control of tuberculosis in correctional institutions: recommendations of the advisory committee for the elimination of tuberculosis. *MMWR.* 1989; 38: 313-320,325.
55. Grange JM. Resistencia a drogas y eliminación de la tuberculosis. *Boletín de la unión internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias.* 1990; 65 (2-3): 60-66.
56. CDC. Misdiagnosis of tuberculosis resulting from laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures-New Jersey. *MMWR.* 1998. 49(19): 413-416.
57. Instituto Oswaldo Cruz. Epidemiological studies using additional molecular markers and amplification based methods. Disponible en <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/923/3215es.html>. 1995; 11p.

58. Wilson SM, Goss E, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of Mycobacterium reference unit. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(11): 3385-3388.
59. Harris E. A low cost approach to PCR. 1998; XXI+304p. (8-29, 118-131p.)
60. Dale JW, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5): 1265-1268.
61. Hopewell PC, Small P. Applications of molecular epidemiology to the prevention, control and study of tuberculosis. In ROM, W.N. y GARAY, S.M. *Tuberculosis.* New York, Brown and Company. (New York, USA). 113-127p.
62. Montoro E, Valdivia J, Cardoso S. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Habana, Cuba, by IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and by the double-repetitive-element PCR method. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(10): 3099-3102.
63. Van Embdem JD, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 406-409.
64. Friedman CR, et al. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(5): 1383-1384.
65. Githul WA, Wilson SM, Drobniewski F. Specificity of IS6110-based DNA fingerprinting and diagnostic techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(4): 1224-1226.
66. Plikaytis BB, et al. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1542-1546.
67. Ferebee SH. Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis: a general review. *Tuberculosis medical thoracyc.* 1970; 26:28-106.
68. Ijaz K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* transmission between cluster members with similar fingerprint patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(11): 19-23.
69. Pineda-García L, et al. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and atypical micobacteria isolated from patients with suspected pulmonary tuberculosis in Honduras. *CHEST.* 1997; 111: 148-153.
70. Pineda-García L, Ferrera A, Hoffner SE. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 (9): 2393-2397.

71. Tuyen LTK, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Vietnam using IS6110 as probe. *Tubercle and lung disease*. 2000; 80(2): 75-83.
72. Luh-Lin R, et al. Transmission patterns of tuberculosis in Taiwan: analysis by restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Infectious diseases*. 1996; 1(1): 18-21.
73. Ferreira MMC, et al. Tuberculosis and HIV infecting among female inmates in Sao Paulo, Brazil: A prospective cohort study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1996; 13(2): 177-183.
74. Kritski AL, et al. Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; (153): 331-334.
75. Friedman CR, et al. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a large urban setting. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; (152):335-359.
76. Zacarías F, et al. HIV/AIDS and its interaction with tuberculosis in Latin America and the Caribbean. *Bull Pan Am Health Organ*. 1994; 28(4): 312-323.
77. Castelo A, et al. Cost effectiveness of antituberculosis interventions. *Pharmacoeconomics*. 1995; 8(5): 385-399.

## ANEXO 1

*Tabla 1.* Resultado de la prueba de PPD en PVVS y sus características más importantes<sup>1</sup>.

Pacientes VIH positivo y	Características
PPD positivo	En este hecho se fundamenta la recomendación de quimioprofilaxis con INH a todos los pacientes VIH+ con PPD mayor o igual a 5 mm y que no sufran TB activa. 10-35% de pacientes infectados por VIH son PPD positivo.
PPD negativo	Puede significar dos cosas: 1. Que no tiene una infección tuberculosa 2. Que tiene anergia cutánea por su inmunodepresión.
PPD negativo anérgicos	También presentan una elevada incidencia de TB que se supone que, en su mayoría, se debe a la reactivación de una infección latente y, en menor medida, a nuevas infecciones.
PPD negativo no anérgicos	En este grupo se piensa que la mayoría de las TB se deben a nuevas infecciones.

<sup>1</sup>Cohn DL, El-Sadr WM. Treatment of latent tuberculosis infection. The 7<sup>TH</sup> international course for tuberculosis control. Republic of Korea. 2002; 471-502

## ANEXO 2

*Tabla 2.* Factores de riesgo asociados a desarrollar una tuberculosis activa en personas infectadas con *M. tuberculosis*<sup>1</sup>.

Factor de riesgo	Incremento de riesgo comparado con personas del que se desconoce su factor de riesgo
SIDA	170
VIH Positivo	113
Otras condiciones de inmunocompromiso <sup>2</sup>	4-16
Infecciones recientes (<2 años)	15
Edad de contacto (<5 y > 60 años)	2-5

<sup>2</sup> Incluye diabetes mellitus, daño renal, algunos carcinomas e inmunosupresión iatrogénica.

<sup>1</sup>Cohn DL, El-Sadr WM. Treatment of latent tuberculosis infection. The 7<sup>TH</sup> international course for tuberculosis control. Republic of Korea. 2002; 471-502

### **ANEXO 3**

*Tabla 3.* Indicaciones de la prueba de la tuberculina<sup>1</sup>.

- 
- Personas cuyas radiografías de tórax presentan imágenes compatibles con tuberculosis no evolutiva.
  - Personas con sospecha clínica y/o radiológica de padecer enfermedad tuberculosa.
  - Personas que están infectadas, tienen un especial riesgo para el desarrollo de la enfermedad: VIH, Silicosis, diabetes mellitus, situaciones de inmunodepresión, desnutrición, alcoholismo, drogadicción, hemodiálisis, entre otros.
  - Personas que, si están infectadas, son de riesgo social y epidemiológico si desarrollan una TB activa: cuidadores de guarderías infantiles, profesores, personal sanitario, prisiones, marginados sociales, entre otras.
  - Estudios epidemiológicos y control de programas antituberculosos.
- 

<sup>1</sup>Ferebee SH. Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis: a general review. *Tuberculosis medical thoracyc.* 1970; 26:28-106.

## ANEXO 4

*Tabla 4.* Criterio para la prueba de tuberculina positiva según grupo de riesgo<sup>1</sup>.

$\geq 5$ mm de induración	$\geq 10$ mm de induración	$\geq 15$ mm induración
<ul style="list-style-type: none"> <li>• VIH positivo</li> <li>• Contacto reciente con un caso de TB</li> <li>• Cambios fibróticos en rayos X compatibles con una infección previa de TB</li> <li>• Pacientes trasplantados</li> <li>• Pacientes inmunocomprometidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmigrantes</li> <li>• Usador de drogas</li> <li>• Residentes y empleados de prisiones, hospitales, asilos, etc.</li> <li>• Personal del laboratorio de TB</li> <li>• Personas con condiciones médicas de alto riesgo que no son VIH positivo</li> <li>• Niños y adolescentes expuestos a adultos con alto riesgo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Personas que no tienen factores de riesgo para TB</li> </ul>

<sup>1</sup>Cohn DL, El-Sadr WM. Treatment of latent tuberculosis infection. The 7<sup>TH</sup> international course for tuberculosis control. Republic of Korea. 2002; 471-502

## ANEXO 5

*Tabla 5. Regímenes de tratamiento recomendados por la World Health Organization (WHO), 1997<sup>1</sup>.*

---

### **CATEGORÍA I**

Paciente con frote positivo nuevo

Paciente con frote negativo nuevo con extensión al parénquima

Nuevos casos de formas severas extrapulmonares de TB

2 E<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, Z<sup>d</sup> (S<sup>e</sup>, H, R, Z)/6 H, E

2 E, H, R, Z (S, H, R, Z)/4 H, R

2 E, H, R, Z (S, H, R, Z)/4 H<sub>3</sub>, R<sub>3</sub><sup>f</sup>

### **CATEGORIA II**

Frote de esputo positivo:

Recaída

Tratamiento fracasado;

Tratamiento después de una interrupción

2 S, H, R, Z, E (1 H, R, Z, E)/5 H<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>, E<sub>3</sub>

2 S, H, R, Z, E (1 H, R, Z, E)/5 H, R, E

### **CATEGORIA III**

Paciente con frote negativo Nuevo (diferentes a los de la categoría 1);

Nuevas formas de TB extrapulmonar menos severas

2 R, H, Z/6 H, E

2 H, R, Z/4 H, R

2 H, R, Z/4 H<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>

### **CATEGORIA IV**

Casos crónicos (permanecen esputos positivos después de re-tratamiento supervisado

NO ES APLICABLE

(Referirse a la guía que WHO propone para el uso de drogas de segunda línea)

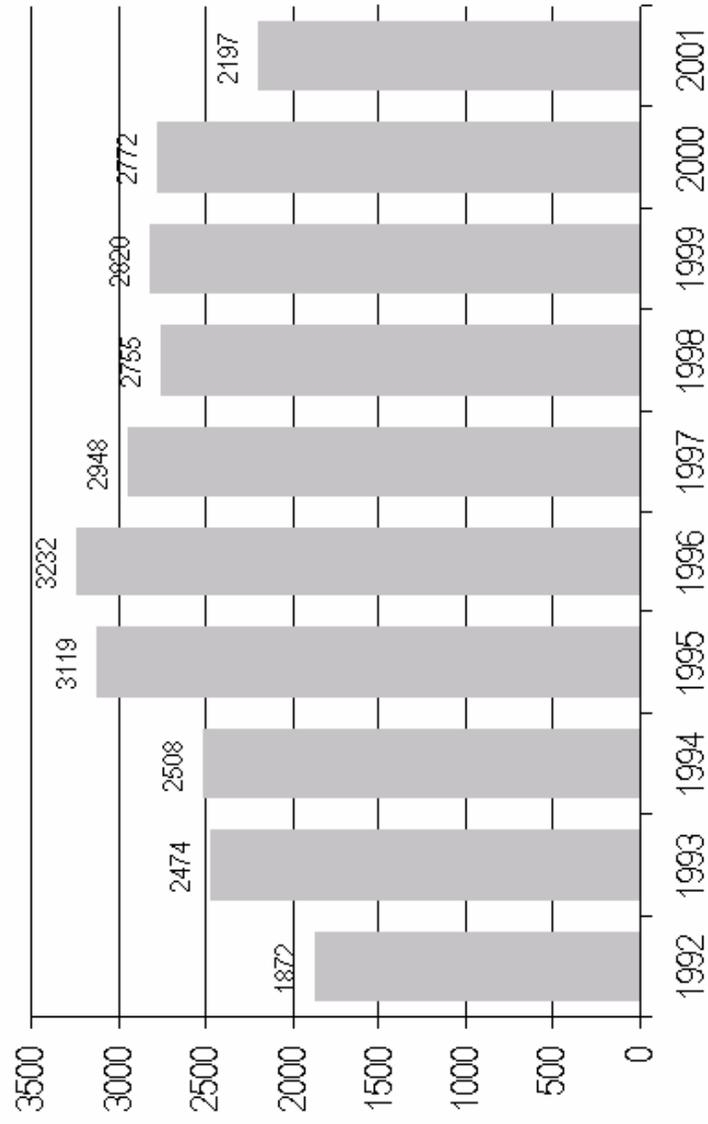
---

<sup>a</sup>E= Etambutol; <sup>b</sup>H: Isoniacida; <sup>c</sup>R: Rifampicina; <sup>d</sup>Z: Pirazinamida; <sup>e</sup>S: streptomina

<sup>f</sup>subíndice: indica cuantas veces a la semana debe administrarse el medicamento.

<sup>1</sup>Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual Clínico TB/VIH. 1998; 164p.

## ANEXO 6



Gráfica 1. Nuevos casos de tuberculosis por año (1992-2001).

Fuente: Sistema de Información, Programa Nacional de Tuberculosis

## ANEXO 7

### *Susceptibilidad antibiótica. Método directo de las proporciones (29).*

#### **Preparación de cajas**

1. Permitir que los antimicrobianos se descongelen a temperatura ambiente, y usarlos lo más rápido posible. *Nunca recongelarlos.*
2. Retirar un frasco de 200 ml de OADC del refrigerador, y atemperar.
3. Retirar un frasco de tapón de rosca de 500 ml conteniendo 180 ml de agar Middlebrook 7H10 y agitar en un plato de agitación para homogenizar el medio (sin calor).
4. Agregarle 20 ml de enriquecedor ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC) cuando el agar tenga una temperatura de 56°C y homogenizar (no aplicar calor).
5. Agregar la cantidad apropiada de antimicrobiano para obtener una concentración final de 0.2 µg de INH y continuar la agitación por 1 a 2 min. (*ver tabla 1*).
6. Utilizando una pipeta estéril o un dispensador Cornwall, dispensar 5ml de agar con INH en el cuadrante II de las 35 cajas etiquetadas con 1 (*ver tabla 1*).
7. Repetir los pasos del 1 al 6 para los otros antimicrobianos y dispensarlas dentro de los cuadrantes de las cajas 1 y 2 (*ver tabla 1*).

*Tabla 1.* Preparación de cajas con antimicrobianos (agentes primarios) y concentración recomendada de agentes secundarios<sup>a</sup>

Caja y No. de cuadrante	Antimicrobiano	Agar (µg/ml)	Solución Stock (µg/ml) <sup>b</sup>
1			
I	Ninguno (Control)		Ninguno
II	INH	0.2	0.4 <sup>c</sup>
III	Estreptomina	2.0	0.4
IV	Rifampicina	1.0	2.0 <sup>c</sup>
2			
I	Ninguno (Control)		Ninguno
II	INH	1.0	2.0 <sup>c</sup>
III	Estreptomina	10.0	2.0
IV	Etambutol	5.0	1.0

<sup>a</sup>Agentes secundarios y concentraciones recomendadas (en microgramos por mililitro): capreomicina, 10.0; cicloserina, 30.0; etionamida, 5.0; kanamicina, 5.0; pirazinamida (a pH 5.5), 25.0.

<sup>b</sup>La solución stock de antimicrobianos (1,000 µg/ml excepto que se especifique otro) se agrega a 180 ml de agar.

<sup>c</sup>Usar 100-µg/ml en lugar de 1,000-µg/ml de solución stock. Diluir la solución stock 1:10 con agua destilada estéril para obtener 100 µg/ml.

8. Retirar un frasco de tapón de rosca conteniendo 360 ml de agar a 56°C .
9. Agregar 40 ml de OADC al frasco y agitar lentamente (no aplicar calor). Continuar la agitación por 1 a 2 min.
10. Utilizando una pipeta estéril o un dispensador Cornwall, dispensar 5 ml del agar libre de droga dentro del cuadrante I de las 70 cajas.
11. Permitir que el agar se solidifique a temperatura ambiente. Cuando el agar esté solidificado colocarlo en bolsas plásticas y guardar a 2-8°C en la oscuridad.
12. Etiquetar con una fecha de expiración de 1 mes.

### **Preparación del inóculo**

#### **A. Método indirecto (de crecimiento en medio sólido)**

##### **Suspensión directa del inóculo**

1. Escoger de tres a cinco colonias (representando todos los tipos de colonias si se encuentran múltiples tipos) y emulsificarlas en 4 ml de caldo Dubos-Tween-albúmina contenido en un tubo de vidrio (13 x 100 mm) al cual se le han agregado seis a ocho perlas de vidrio.
2. Agitar en Vórtex por 1 a 2 min.
3. Dejar reposar el tubo por 30 min., de modo que las partículas grandes sedimenten.
4. Decantar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo de vidrio estéril (13 x 100).
5. Ajustar la turbidez de la suspensión del sobrenadante con caldo Dubos-Tween-albúmina hasta alcanzar el estándar No. 1.0 de McFarland (Conteniendo aproximadamente  $10^7$  UFC/ml).
6. Diluir la suspensión a  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  con agua destilada estéril.

#### **B. Método alternativo: crecimiento a turbidez:**

1. Escoger de tres a cinco colonias (representando todos los tipos de colonias si se encuentran múltiples tipos), y emulsificarlas en 4 ml de caldo Dubos-Tween-albúmina contenido en un tubo de vidrio (13 x 100 mm).
2. Agitar en vórtex por 1 a 2 min.
3. Incubar la suspensión a 36°C hasta alcanzar la turbidez del estándar No. 1 de McFarland (aproximadamente de 3 a 5 días).

4. Diluir la suspensión a diluciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  con agua destilada estéril.

### **Inoculación e incubación**

1. Para cada organismo a ser evaluado, llevar a temperatura ambiente 2 grupos de cajas cuadriplate con el medio para susceptibilidad (un grupo de cajas incluye: una caja etiquetada como 1 y otra como 2). Asegurar que la superficie del agar esté seca (secar cualquier gota con un hisopo de algodón estéril).
2. Etiquetar estas dos cajas para la evaluación de susceptibilidad con el número de cultivo del paciente y la dilución, por ejemplo  $10^{-2}$ .
3. Inocular este primer grupo de cajas para evaluar susceptibilidad de dilución  $10^{-2}$  con la suspensión de la dilución  $10^{-2}$  de la siguiente manera.
4. Usando una Pipeta estéril con algodón en el extremo posterior, inocular una gota de la suspensión a evaluar, sin que la pipeta toque la superficie del medio, en cada esquina de cada cuadrante (3 gotas por cuadrante).
5. Mantener la pipeta perpendicular al agar para asegurar la uniformidad de las gotas, tener cuidado de no tocar la superficie del agar con la punta de la pipeta.
6. Tener cuidado de colocar las gotas de modo que no se corran al borde de la caja de Petri (es difícil contar colonias en el borde de la caja).
7. Repetir para todos los cuadrantes de la caja.
8. Etiquetar e inocular el segundo grupo de cajas cuadriplate para evaluación de susceptibilidad con la dilución  $10^{-4}$  de la misma manera.
9. Evaluar una cepa de control de calidad a diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$ .
10. Inocular una caja de agar sangre y una caja de agar Middlebrook 7H11 con 1 ó 2 gotas de la suspensión anterior. Estriar estas cajas con asa en argolla para aislar.
11. Permitir que las cajas inoculadas permanezcan con el agar hacia arriba a temperatura ambiente (en la campana) hasta que el inóculo sea absorbido dentro del medio (aproximadamente 1 hora).
12. Envolver cada caja en una bolsa de polietileno permeable a  $\text{CO}_2$  y colocar las cajas con el agar hacia abajo.
13. Incubar las cajas a  $36^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5 a 10%  $\text{CO}_2$ .

## Lectura de cajas

1. Después de 1 a 2 días de incubación, examinar el agar sangre y Middlebrook 7H11 para evidenciar bacterias contaminantes. Si se detecta contaminación, descartar todas las cajas y repetir la evaluación con un nuevo inóculo. (Algunas veces es necesario preparar varios subcultivos para obtener un inóculo puro.). Incubar y continuar examinando la pureza del agar sangre diariamente por 7 días y la pureza del agar 7H11 semanalmente mientras dure la evaluación.
2. Examinar el cuadrante control (sin antimicrobianos) semanalmente. Una vez que se observe crecimiento de 1+ o más (*ver tabla 2*), leer todas las cajas. Si el crecimiento no es suficiente después de 3 semanas de incubación, repita el test. *No dar un reporte final de resultados de susceptibilidad hasta que las cajas hallan sido incubadas por 3 semanas.* Los resultados de resistencia pueden ser interpretados cuando se nota resistencia obvia.
3. Examinar todos los cuadrantes, y estimar el número de colonias creciendo en cada cuadrante (contar el número total de colonias creciendo en los tres círculos de crecimiento).
4. Cuantificar el crecimiento como se especifica en tabla 2.

**Tabla 2.** Cuantificación del crecimiento de colonias de micobacterias en cajas de agar

No. de colonias	Reporte como:
0-50	Colonias contadas <sup>1</sup>
50-100	1+
100-200	2+
200-500	3+
Crecimiento confluyente	4+

<sup>1</sup>Cantidad exacta de colonias contadas

5. Notar la presencia de cualquier microcolonia (colonias en el medio conteniendo antibiótico que son más pequeña que aquellas en el medio control).
6. Registrar el número de colonias y cuantificar el crecimiento.

7. Calcular el porcentaje de resistencia dividiendo el número de colonias creciendo en el medio con antibiótico dentro del número de colonias creciendo en el medio control y multiplicando por 100%.

## Resultados

### a) Interpretación

Si el control de calidad es aceptable, interpretar como sigue.

1. Interpretar los resultados de la dilución de organismos que presente un número contable de colonias (idealmente de 50 a 100) en el crecimiento del cuadrante control.
2. Nunca utilizar la dilución con recuento de colonias  $\leq 50$ .
3. Utilizar la dilución con recuento de colonias de 4+ con precaución (*ver los siguientes ejemplos*).

#### Recuento de colonias

##### Ejemplo 1

Dilución	Recuento de colonias en cuadrante I (crecimiento control)
$10^{-2}$	>500, crecimiento confluyente (4+)
$10^{-4}$	82 (2+)

Reportar los resultados de la dilución  $10^{-4}$ ; los recuentos coloniales de la dilución  $10^{-2}$  >500 (4+) pueden mostrar falsa resistencia.

##### Ejemplo 2

Dilución	Recuento de colonias en cuadrante I (crecimiento control)
$10^{-2}$	220 (3+)
$10^{-4}$	30

Reportar los resultados de la dilución  $10^{-2}$ ; el recuento de colonias de la dilución  $10^{-4}$   $\leq 50$  puede dar falsa susceptibilidad.

4. Si ambas diluciones muestran crecimiento 4+ y el organismo es susceptible a todos los antibióticos, interpretar los resultados. Si el organismo muestra resistencia a cualquier antibiótico, la resistencia puede deberse a un inóculo muy cargado. Repetir completamente la prueba.
5. La presencia de microcolonias sugiere que el aislamiento puede ser resistente al antibiótico pero que tiene algún efecto en el organismo y puede ser efectivo en combinación con otras drogas.

6. Interpretar un resultado como resistente cuando la proporción del crecimiento en el medio conteniendo antibiótico es  $\geq 1\%$  del crecimiento en el medio libre de antibiótico (*ver el siguiente ejemplo*).

#### Interpretación de resistencia

##### Ejemplo

Crecimiento control (cuadrante I)	200 colonias (3+)
INH, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (cuadrante II)	7 colonias

$$\frac{7 \text{ colonias}}{200 \text{ colonias}} \times 100\% = 3.5\%, \text{ i.e., resistente}$$

200 colonias

No es necesario realizar un recuento real de las colonias para aquellas concentraciones cuando el crecimiento es obviamente  $< 1\%$  o  $\geq 1\%$ .

Reporte: Con un control de calidad aceptable, reportar como el siguiente ejemplo.

#### *Mycobacterium tuberculosis*

Antibiótico	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interpretación
INH	0.2	R
INH	1	R, microcolonias presentes
Estreptomicina	2	S
Estreptomicina	10	S
Rifampicina	1	S
Rifampicina	5	S
Etambutol	5	S
Etambutol	10	S

Médicos experimentados algunas veces usan el porcentaje de organismos resistentes al agente antimicrobiano como una guía para la eficacia de la terapia. Calcular y registrar el porcentaje de resistencia en una hoja de trabajo, y mantener esta información disponible para los médicos que la requieran.

## ANEXO 8

### *Técnica de DRE-PCR (55).*

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (CUARTO BLANCO)

Lisis de micobacterias:

1. Usando un marcador permanente, rotular tubos de 1.5 ml con tapón de rosca estériles con el número correspondiente de las muestras, tanto en el tubo como en la tapa.
2. Poner 1 ml de agua estéril en cada tubo.
3. En una cámara de flujo laminar con adecuada protección de bioseguridad, transferir una colonia de *M. tuberculosis* con un asa del medio de cultivo Lowenstein-Jensen a cada tubo de microcentrífuga con agua destilada. Agitar el asa para liberar a las bacterias con el agua. No olvidar el control negativo de la extracción.
4. Cerrar muy bien las tapaderas.
5. Colocar cada microtubo por 15 minutos en el bloque caliente a 100°C.
6. Congelar las muestras en un congelador de ~70°C (o ~20°C si no hay un congelador de ~70°C disponible) durante la noche o por lo menos 45 minutos.
7. Descongelar y hervir las muestras por 15 minutos a 100°C en el bloque caliente.
8. Centrifugar los tubos por 5 minutos en una microcentrífuga a temperatura ambiente.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga estéril. Proceder directamente al paso de la amplificación o almacenar los tubos a ~20°C hasta antes de su uso. Si el sobrenadante no es transferido rápido a un nuevo tubo, asegurarse de repetir la centrifugación (paso 8) después de descongelar las muestras y antes de realizar la amplificación.
10. Usar 5 µl del sobrenadante para cada reacción de PCR.

Preparación de la mezcla para PCR y los tubos de reacción:

NOTA: antes de preparar la mezcla, ir al CUARTO NEGRO para poner el programa apropiado en el termociclador. Si el programa ya ha sido metido en el mismo, revisarlo para asegurarse de que no se han hecho cambios inadvertidamente; si el programa está correcto, guardarlo para su uso posterior.

1. Calcular la cantidad de mezcla para PCR que será necesaria para el número de reacciones deseadas, cada una contendrá 45  $\mu$ l de la mezcla. Para cada 20 reacciones, agregar 1 volumen extra de mezcla para PCR para compensar el volumen perdido durante el pipeteo.
2. Llenar la hoja de PCR (*ver anexo 10*) de acuerdo con la tabla siguiente:
- 3.

Ingrediente	Descripción	[Stock]	Vol/50ul	[Final]
Buffer 10x	Buffer B	10X	5.0 $\mu$ l	1X
DNTPs	20 mM total dNTPs	5mM A,C,G,T	2.0 $\mu$ l	0.2 mM A,C,G,T
Primer 1	Ris 1	10 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Primer 2	Ris 2	10 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Primer 3	PnTB 1	10 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Primer 4	PnTB 2	10 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>		50 mM	5.0 $\mu$ l	2.5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O		22.5 $\mu$ l	
Taq	Taq	5U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.05 U/ $\mu$ l
Volumen de la mezcla			45 $\mu$ l	
Volumen de la muestra (que se añade en el paso 13)			<u>05 <math>\mu</math>l</u>	
VOLUMEN TOTAL DE REACCION			50 $\mu$ l	

4. Marcar tubos apropiados para el termociclador que se utilice (tubos de 0.5 ml).
5. Descongelar las alícuotas de cada reactivo. mezclarlas en vórtex y bajar el líquido con un golpe de centrifuga.

## “SIEMPRE MANTENER LOS INGREDIENTES Y LOS TUBOS SOBRE HIELO”

6. En el área blanca, usando pipetas BLANCAS, preparar la mezcla de PCR con todos los ingredientes excepto la *Taq* polimerasa. Tachar cada ingrediente sobre la hoja de trabajo después de agregarlo a la mezcla.
7. Mezclar bien usando un agitador vórtex o una pipeta.
8. Agregar la *Taq* polimerasa y mezclar bien por inversión y pipeteando hasta la mitad del volumen total de mezcla. Tenga cuidado de no producir burbujas.
9. Distribuir 45 µl de la mezcla de PCR en cada tubo rotulado.
10. Agregar 2 gotas de aceite mineral a cada tubo usando una pipeta de 1000 µl.
11. Agregar 5 µl de ddH<sub>2</sub>O a través de la capa de aceite mineral para preparar el control negativo del “cuarto blanco”
12. Transferir los tubos de la hielera blanca a una hielera gris.

### ADICIÓN DE LA MUESTRA (CUARTO GRIS)

13. En el cuarto gris, usando pipetas GRISES, agregar 5 µl de la muestra o controles apropiados, a través de la capa de aceite mineral. Los controles deben agregarse en el orden del más negativo al más positivo. Usar punta nueva para cada muestra. Recuerde incluir un control negativo consistente en agua gris.

### AMPLIFICACIÓN DE LA MUESTRA (CUARTO NEGRO)

14. Programa de amplificación (Termociclador para tubos de 0.5 ml)

94°C	7 min.	1 ciclo	Desnaturalización inicial
95°C	1 min.	30 ciclos	Amplificación
56°C	2 min.		
72°C	2 min.		
72°C	7 min.	1 ciclo	Extensión final

## ANALISIS DEL PRODUCTO (CUARTO NEGRO)

1. Para cada gel, preparar una solución de 1.5% agarosa en 1X TBE y caliéntela hasta disolver la agarosa.
2. Dejar enfriar la solución hasta  $\sim 55^{\circ}\text{C}$ . Agregar bromuro de etidio (10 mg/ml) a una dilución de 1/20,000 (concentración final 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Preparar el gel vertiendo la solución en el molde, moviendo las burbujas a las orillas del gel.
3. Preparar el buffer de 1X TBE para el gel
4. Preparar un esquema mostrando el orden de las muestras en el gel.
5. Preparar las muestras para el gel en el orden predeterminado sobre un pedazo de parafilm puesto sobre una gradilla para tubos de microcentrífuga.
6. Preparar el marcador de ADN: 5  $\mu\text{l}$  del marcador (escalera de 100 pb), más 15  $\mu\text{l}$  de buffer de cargar (colorante), agregar 55  $\mu\text{l}$  de agua destilada y mezcle bien. Usar 5  $\mu\text{l}$  del marcador preparado anteriormente.
7. Poner el gel en la cámara de electroforesis y cubrirlo con 1 X TBE.
8. Agregar el volumen total de cada muestra al gel según el orden predeterminado.
9. Correr el gel a 50 voltios (v) por 5-10 minutos y el resto de la corrida a  $\sim 100\text{V}$  hasta que el colorante haya corrido  $\frac{3}{4}$  partes del gel.
10. Tomar una fotografía usando el “Sistema de documentación de geles FOTODYNE con papel térmico.
11. Anotar resultados en hoja control con su respectiva fotografía. (*ver anexo 9*).

### Tamaño del producto:

El tamaño de los productos variará de acuerdo con la cepa amplificada. El rango de productos amplificados está entre 100 y 1000 pb. Para facilitar el análisis, los patrones deberán dibujarse sobre un papel y agruparse según el número de fragmentos obtenidos. Cuando 2 cepas parecen tener un patrón similar, los productos de PCR deberán ser comparados lado a lado por medio de electroforesis en agarosa para confirmar la identidad.

**ANEXO 9**

Título: DRE - PCR

Fecha: \_\_\_\_\_ Número: \_\_\_\_\_

Templado			Orden del Gel	Foto
Tubo#	Descripción	Result		
1				[Empty Box for Photo]
2			1-	
3			2-	
4			3-	
5			4-	
6			5-	
7			6-	
8			7-	
9			8-	
10			9-	
11			10-	
12			11-	
13			12-	
14			13-	
15			14-	
16			15-	
17			16-	
18			17-	
19			18-	
20			19-	
			20-	

Agarosa % Producto: ul Marcador: ul Voltaje: Tiempo:

**Master Mix del DRE- PCR**

Ingrediente	Descripción	Conc.	ul/tubo	X
ddH2O	Sigma water	-	24,5	
10X Buffer		10X	5,0	
MgCl2		50 mM	3,0	
Primer 1	Ris 1	10 uM	2,5	
Primer 2	Ris 2	10 uM	2,5	
Primer 3	Pntb 1	10 uM	2,5	
Primer 4	Pntb 2	10 uM	2,5	
dNTPs	Promega	20 mM	2,0	
Taq	Amplitaq	50 U/ul	0,5	
Muestra			5,0	

Mix: 45 ul + muestra: 5 ul = 50 ul

Obj:

Muestras:

Conclusiones:

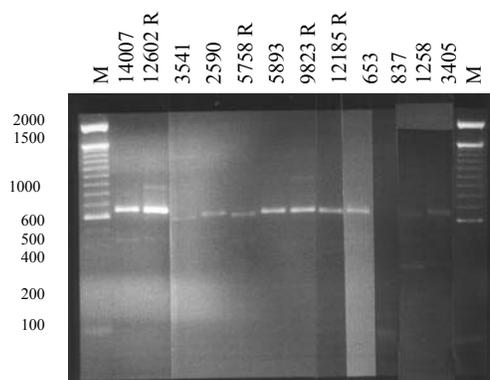
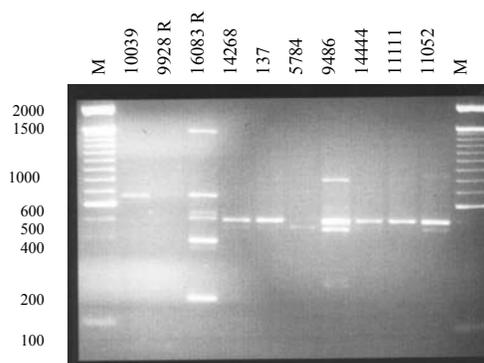
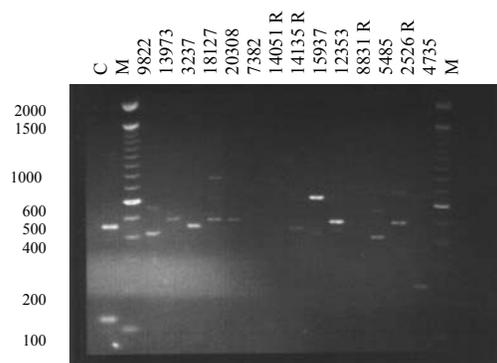
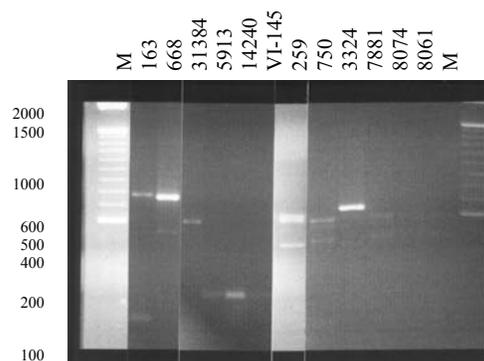
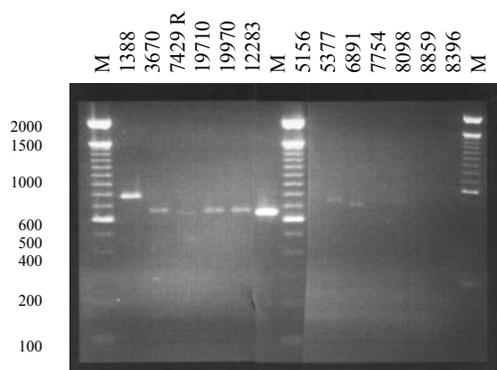
**Parámetros Térmicos**

Termociclador \_\_\_\_\_

Desnaturalización inicial	94°C	7 min	1 ciclo
Desnaturalización inicial	95°C	1 min	30 ciclos Amplificación
Hibridación	56°C	2 min	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	7 min	1 ciclo
Temperatura final	4°C	Por siempre	-

## ANEXO 10

Fotografías de las huellas genéticas finales obtenidas de las cepas que formaron patrones agrupados y patrones únicos o no agrupados con la técnica de DRE-PCR.



M: Marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

C: Control positivo (*M. tuberculosis* H37-Ra)

R: Cepa resistente a una, dos o más drogas para el tratamiento primario de la tuberculosis.

Aída Teresita Jiménez Rodríguez de Reyes  
Autora

MSc. Blanca Samayoa Herrera  
Asesora

MSc. Ana Maria Xet Mull  
Asesora

Licda. Dalia Mei Ling Lau Bonilla  
Asesora

Licda. María Luisa García de López  
Revisora

Lic. Martín Néstor Gil Cabrera  
Revisor

Licda. Alba Marina Valdés de García  
Directora

MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Decano

