

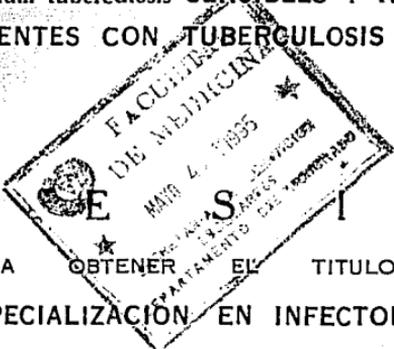
11219
2E



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social

DETECCION DE COEXISTENCIA DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis SENSIBLES Y RESISTENTES
EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR



T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALIZACION EN INFECTOLOGIA
Y ECOLOGIA MEDICA
P R E S E N T A:

DR. DAVID ARMANDO LANGULO GONZALEZ



TUTOR: DR. FORTINO SOLORIZANO SANTOS

México, D.F.

HOSPITAL DE PEDIATRIA
ABR. 24 1995
DEPTO. DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACION

Signature
1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**DETECCION DE COEXISTENCIA DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis
SENSIBLES Y RESISTENTES EN PACIENTES CON
TUBERCULOSIS PULMONAR**

TESIS
PARA OBTENER TITULO DE
ESPECIALIZACION EN INFECTOLOGIA
Y ECOLOGIA MEDICA

PRESENTA:

DR DAVID ARMANDO ANGULO GONZALEZ

TUTOR:

DR FORTINO SOLORZANO SANTOS

COLABORADORES :

DR ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ
DR HUMBERTO DÍAZ PONCE
DR ANTONIO ENCISO MORENO

DR ROBERTO CEDILLO RIVERA
QFB. RICARDO MENDEZ MEZA.

México, D.F.

1995

INDICE

DEDICATORIA.....	1
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
ANTECEDENTES.....	6
OBJETIVO.....	10
MATERIAL Y METODOS.....	11
RESULTADOS.....	16
DISCUSION.....	19
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFIA.....	23
AGRADECIMIENTOS.....	25

DEDICATORIAS

A mis padres

quienes siempre me brindaron
su apoyo incondicional y sobre todo
su amor.

A mis maestros

Dr Fortino Solórzano
Dr Humberto Díaz
en quienes siempre ví una entrega
desinteresada, genuino interés en mi
superación y amistad.

**A la Dra Teresa Gutiérrez
quien a través de dos años
compartidos me demostró ser
una verdadera amiga.**

**A mi pareja
Motor y dirección de todos mis esfuerzos
cuyo amor y comprensión, aún a través de
la distancia, nunca me dejaron solo.**

A Dios:

Por todo lo que soy y tengo.

RESUMEN

OBJETIVO: Identificar la coexistencia de cepas de *M.tuberculosis* sensibles y resistentes a antituberculosos en pacientes con tuberculosis pulmonar. **MATERIAL Y METODOS :** Se realizó cultivo de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar, en medio de agar Middlebrook 7H10; del cultivo primario se subcultivaron 4 colonias escogidas al azar. La identificación de la especie *M.tuberculosis* y la sensibilidad a estreptomycin, rifampicina, Isoniacida y etambutol se realizó con el sistema BACTEC. **RESULTADOS:** Se estudiaron 13 pacientes de los que se obtuvieron un total de 52 subcultivos. En doce pacientes los 4 subcultivos de cada uno tuvieron un patrón homogéneo de sensibilidad a cada antituberculoso. En un caso el patrón de sensibilidad fue heterogeneo, tres subcultivos sensibles y uno resistente a Isoniacida . Se encontró resistencia a Isoniacida en 21/52 subcultivos (40%) y resistencia a rifampicina en 12/52 subcultivos (23%), los cuales eran resistentes a Isoniacida también. No se encontró resistencia a estreptomycin ni a etambutol. **CONCLUSIONES:**En un individuo con tuberculosis pulmonar sin tratamiento previo se encontró coexistencia de micobacterias con distinto perfil de sensibilidad a Isoniacida. El hallazgo de una elevada proporción de cepas resistentes a Isoniacida y rifampicina obliga a considerar la posibilidad de empleo de cuatro drogas en el esquema inicial de tratamiento.

ABSTRACT

DETECTION OF COEXISTENCE OF SUSCEPTIBLE AND RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS.

OBJECTIVE: To identify coexistence of susceptible and resistant *M. tuberculosis* strains in patients with pulmonary tuberculosis. **MATERIAL AND METHODS:** Sputum samples from patients with tuberculosis were cultured in Middlebrook 7H10 agar; four colonies from each patient were randomly chosen from the primary isolates, and subcultured. *M. tuberculosis* species identification and drug susceptibility to streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol were done by BACTEC system. **RESULTS:** Samples from thirteen patients were studied; then 52 subcultures were obtained to test for susceptibility differences. In 12 patients the pattern of susceptibility of the subcultures made from the four initial colonies was homogeneous to each drug. In one patient three subcultures were susceptible and one was resistant to isoniazid. Resistance to isoniazid in 21/52 (40%) subcultures was detected. Resistance to rifampin in 12/52 (23%) subcultures was found; these strains were also resistant to isoniazid; none of the strains was resistant to rifampin alone, streptomycin nor ethambutol. **CONCLUSIONS:** In one patient with pulmonary tuberculosis without previous treatment coexistence of susceptible and resistant strains of *M. tuberculosis* was found. According to our results, because the high proportion of resistance to first line antituberculous drugs, the treatment should include at least four drugs.

ANTECEDENTES

La tuberculosis continúa siendo un problema de salud pública mundial, con una prevalencia estimada de 30 millones de casos, y una incidencia de 10 millones de casos por año que en su mayoría corresponden a tuberculosis pulmonar⁽¹⁾.

Se había reportado una tendencia decreciente en el número de casos anuales de tuberculosis pulmonar, sin embargo, a partir de 1984 se ha registrado un incremento en varios países, sobre todo en aquellos en los que la tasa de prevalencia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es más alta (2,3,4). En México, la incidencia de tuberculosis pulmonar mostró un descenso desde una tasa de 70 por 100 000 en 1940 a una tasa menor de 20 por 100 000 habitantes a partir de 1976, de entonces a la fecha las tasas reportadas se encuentran entre el 10 y 20 por 100 000 habitantes. A partir de datos calculados y de acuerdo al número de individuos susceptibles tomando en cuenta subregistros se estima que para 1995 la incidencia incrementará a un número aproximado de 45 por 100 000 y se espera en el futuro un comportamiento similar al de otros países en los cuales el aumento en la incidencia de SIDA se ha acompañado de incremento en la incidencia de tuberculosis pulmonar (5).

Los agentes etiológicos de la tuberculosis son los comprendidos en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. bovis*, *M. africanum* y *M. tuberculosis*, de los cuales éste último es el más frecuente. *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio, ácido-alcohol resistente, de crecimiento lento que requiere de medios enriquecidos para su cultivo *in vitro*; los medios más comúnmente empleados para su cultivo son Lowenstein-Jensen y Middlebrook (6,7).

El bacilo tuberculoso dentro del hospedero puede encontrarse en forma extracelular en lesiones caviladas y en lesiones caseosas cerradas, e intracelular en los macrófagos. Los bacilos en cada sitio tienen diferente actividad metabólica y frecuencia de replicación, por lo que la concentración estimada de unidades formadoras de colonias varía desde 10^{-4} en lesiones cerradas hasta 10^{-9} en cavilaciones (8). Es conocido que las mutaciones de 'novo' que ocurren en las poblaciones de *Mycobacterium tuberculosis* suceden con una

frecuencia que varía entre 10^{-6} a 10^{-11} (6,8). Aunque una población de bacilos tuberculosos puede mostrarse homogéneamente sensible a antifímicos, se estima la posible coexistencia de una subpoblación de cepas mutantes resistentes, con una frecuencia media de alrededor de 10^{-6} , con variaciones esperadas para las diferentes drogas antifímicas: estreptomina, 10^{-5} ; Isoniacida, 10^{-6} ; rifampicina, 10^{-7} . Este fenómeno ocurre con mayor frecuencia en las lesiones con mayor concentración de micobacterias, así es esperado que en una caverna tuberculosa que contiene alrededor de 10^9 bacilos, pueda albergar miles de mutantes resistentes (6,9). Además del fenómeno biológico previamente descrito y fundamentado en inferencias teóricas (8) se ha documentado que la emergencia de cepas resistentes está en relación con el antecedente de tratamientos antifímicos previos, lugar de origen de los enfermos (Latinoamérica, Asia y África tienen los más altos porcentajes de resistencia) e inmunodeficiencias, en especial SIDA (10,11,12,13).

Hasta el momento se han documentado 16 brotes de tuberculosis por cepas multiresistentes en Estados Unidos de América, y algunos otros en Francia y África en los cuales han sido afectados no únicamente pacientes con SIDA sino también trabajadores de la salud y pacientes sin inmunocompromiso, con alta letalidad (2,11,14,15). Las drogas antifímicas para las cuales se ha encontrado mayor proporción de resistencia son: Isoniacida, rifampicina y estreptomina (12,13,15). En México, en el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) de 1637 cepas de *M. tuberculosis* aisladas entre 1989 y 1993 se encontró un porcentaje de resistencia primaria de 8.2% y secundaria del 63%. De éstas cepas, un 27% eran resistentes a una droga, 31.2% a 2 drogas y más del 30% fueron resistentes a 3 o más drogas antifímicas (5). En relación a la coexistencia de cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis* en un mismo individuo, estudios de seguimiento han documentado el aislamiento de cepas diferentes pre y postratamiento, lo cual se ha interpretado como posible reinfección exógena sin poder descartar la coexistencia de dichas cepas, desde el inicio de la infección y probable selección de estas con los tratamientos (16). Apoyando ésta última explicación se encuentra el reporte de un brote de tuberculosis pulmonar en pacientes con SIDA donde se identificó mediante polimorfismo de DNA la coexistencia de dos cepas distintas de *Mycobacterium tuberculosis*, en dos casos

(14). La posibilidad de que personas previamente infectadas con *M. tuberculosis* puedan ser exógenamente reinfectadas se ha debatido en el pasado, sin embargo gracias a metodologías tales como el análisis del patrón de polimorfismo de DNA restringido enzimáticamente, se ha demostrado que, la reinfección exógena juega un papel importante en la actualidad (16,17). Esta situación da el sustento teórico para la posibilidad de coexistencia de dos o más cepas distintas de *M. tuberculosis* en un mismo individuo, con diferente perfil de sensibilidad. Hasta el momento la coexistencia de cepas de *M. tuberculosis* biológicamente diferentes, en un mismo individuo ha sido solo parcialmente demostrado (14). Los métodos útiles para diferenciar 2 cepas que coexisten son: el análisis de su material genómico mediante amplificación al azar (18) ó polimorfismo de DNA (19), el análisis de los componentes de su pared mediante cromatografía, su comportamiento bioquímico y su sensibilidad a antimicrobianos. Este último tiene la ventaja de proporcionar información que se puede utilizar para guiar los esquemas de tratamiento antimicrobiano.

Los métodos más frecuentemente utilizados para determinar la sensibilidad a antimicrobianos son dos. El de dilución en placa, consiste en sembrar la bacteria en un medio con una concentración conocida de antibiótico y cuantificar al cabo de 4 a 6 semanas su crecimiento porcentual en relación a un cultivo sin antibiótico, considerándose la existencia de resistencia si el crecimiento en el medio con antibiótico es igual ó mayor al 1%. El otro método utilizado es un sistema radiométrico denominado BACTEC, el cual es automatizado y mide el crecimiento de micobacterias mediante radioisótopos permitiendo la diferenciación de especies y características de sensibilidad a antimicrobianos en 7 días, con una sensibilidad del 98% (20,21).

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el resurgimiento de la enfermedad y la emergencia de cepas resistentes involucrando factores de riesgo del hospedero y del ambiente (2,4,12,13,15). Sin embargo es necesario realizar trabajos encaminados al estudio biológico de poblaciones de *M. tuberculosis* para identificar con que frecuencia ocurre, en un mismo hospedero, la coexistencia de más de una cepa con distintos patrones de sensibilidad. Si se comprobara que éste fenómeno existe y es frecuente, podría originar la necesidad de modificar las estrategias de tratamiento y criterios para

realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos. El objetivo de nuestro trabajo fue identificar la coexistencia de dos o más cepas de *M.tuberculosis* con diferente perfil de sensibilidad a antimicrobianos, provenientes de un mismo individuo con tuberculosis pulmonar.

OBJETIVO

**IDENTIFICAR MEDIANTE SU PATRON DE SENSIBILIDAD A ANTIFIMICOS LA
COEXISTENCIA DE DOS O MAS CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* EN
PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR**

SUJETOS MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio Clínico sección de Microbiología módulo de Micobacteriología y la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del CMN XXI del IMSS y Laboratorio de Micobacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de Enero de 1994 a Marzo 1995.

TIPO DE ESTUDIO : Descriptivo, observacional y transversal.

POBLACION DE ESTUDIO: Las muestras utilizadas fueron esputo y se obtuvieron de pacientes mayores de 16 años con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar que se encontraban hospitalizados ó en manejo ambulatorio en el INER. De cada paciente se registraron los siguientes datos: edad, sexo, enfermedad clínica subyacente y antecedentes de tratamiento antituberculoso.

Para la selección de las muestras se siguieron los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSION : Muestras de pacientes con infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* con tinción positiva en esputo para BAAR por método de Ziehl Neelsen .

CRITERIOS DE EXCLUSION : Aquellas muestras en las que se obtuvo 2 o menos colonias en el cultivo.

CRITERIOS DE ELIMINACION : Muestras, que aún teniendo BAAR observados con tinción de Ziehl Neelsen, no fué posible recuperarlas en cultivo. Muestras en las que el cultivo se contaminó con otras bacterias u hongos que hicieron imposible la identificación precisa de colonias de *M. tuberculosis*.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron sometidas a decontaminación y mucocisis con hidróxido de sodio mediante el método de Petroff modificado (7). Posteriormente se realizaron frotis que fueron teñidos por el método de Ziehl Neelsen(7). La búsqueda de Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR) por microscopía se realizó siguiendo el método sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS)(22).

CULTIVO

Del sedimento de cada muestra se realizó siembra en medio de Agar Middlebrook 7H10 (DIFCO labs. Lote 39500JC, Fecha de Caduc.: Diciembre 98, Cat logo # 0627-17-4), enriquecido con Middlebrook OADC (DIFCO labs. Lote 49157 JA, Fecha de Caduc.: Mayo 96, Cat.0722-64-0). Las condiciones de cultivo incluyeron temperatura de 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 8 semanas ; para lo cual se utilizó una incubadora de CO₂ (Marca Baxter, Modelo WJ 101 T); los cultivos se revisaron semanalmente. Una vez detectado crecimiento, se realizó subcultivo de 4 colonias tomadas al azar.

IDENTIFICACION

De cada uno de los subcultivos, se realizó una suspensión en 1ml de buffer de fosfatos (1M, pH 6.8) en tubos Ependorf, se mezclaron en agitador tipo vortex durante 10 minutos, se dejaron sedimentar por 30 minutos y posteriormente a ello se ajustó la suspensión a una turbidez similar al tubo No.1 de Mac Farland; 0.1ml de la suspensión final de cada muestra se inoculó en un frasco con medio de cultivo Middlebrook 12B (M 12B) (Becton Dickinson, Lote H4J6, Fecha de caduc. Marzo 96), previamente estabilizado con 5% de CO₂. Se incubó a 37°C y se leyó diario su índice de Crecimiento (IC) por el sistema radiométrico automatizado BACTEC (TB 460 Becton Dickinson). Cuando el IC alcanzó los valores entre 50 y 100 de la escala del sistema BACTEC, se transfirió 1 ml del medio a un frasco para identificación con p-nitro-a-acetilamino-a-hidroxi-propofenona (NAP) (Becton Dickinson) (23). Se incuban ambos frascos, el del cultivo original y el NAP, a 37°C comparando el IC de ambos por un mínimo de 4 días (24).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIFIMICOS:

PREPARACION DE LOS MEDIOS CON ANTIFIMICOS:

Para las pruebas de sensibilidad se utilizaron los siguientes antibióticos:

(SIRE Becton Dickinson, Cat.44022102)

ESTREPTOMICINA: Lote No. C4W1 Fecha de Caducidad: Abril 1996

Concentración de la solución madre: 240 mcg/ml

Concentración final: 6mcg/ml de medio.

ISONIACIDA: Lote No. C4X1 Fecha de caducidad: Abril 1996

Concentración de la solución madre: 4mcg/ml

Concentración final: 0.1 mcg/ml de medio.

RIFAMPICINA: Lote No. C4Y1 Fecha de caducidad: Abril 1996

Concentración de la solución madre: 80mcg/ml

Concentración final: 2mcg/ml de medio.

ETAMBUTOL: Lote No. C4Z1 Fecha de caducidad: Abril 1996

Concentración de la solución madre: 300 mcg/ml

Concentración final: 7.5 mcg/ml.

La solución inicial de las cuatro drogas se realizó en agua bidestilada, deionizada y estéril. Frascos con medio M 12B previamente estabilizado, fueron preparados con 0,1 ml de la solución madre para cada antifímico. Una vez adicionado el antibiótico se conservaron a 4°C por un máximo de 7 días hasta su utilización.

Los frascos con medio M 12B previamente preparados con cada una de las drogas antifímicas fueron inoculadas con 0,1ml del cultivo inicial en medio M 12B cuando éste se encontraba con un IC entre 500 y 800. Para cada cepa se incluyó un frasco control que representa el 1% de crecimiento, éste se preparó realizando una dilución 1:100 del cultivo inicial en medio M 12B con buffer de fosfatos, agitando éste tubo durante 1 min y posteriormente 0,1ml de ésta dilución se inoculó en un frasco M 12B sin antifímicos (24). Todos los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C (Incubadora Marca Baxter, Modelo MJ 101T).

Para verificar la pureza del inóculo, 0.1 ml del cultivo inicial en M 12B se sembró en agar sangre y se vigiló su desarrollo por 96 hrs.

Diario se realizaron lecturas, en el sistema BACTEC, de los IC registrados para el control y cada uno de los cultivos con drogas antifímicas; al alcanzarse un IC de > 30 para el control, se calculó el valor "Delta" de IC, que es la diferencia entre los valores de IC con respecto a los registrados el día anterior para cada frasco (43). Todos los frascos con antifímicos en que se detectaron IC mayores a los controles, se cultivaron en agar sangre y agar chocolate por 96 h para descartar contaminación.

Se utilizaron como cepas control *M.tuberculosis* H37Rv (American Typing Collection Center) con perfil de sensibilidad a antifímicos conocido (sensible a las 4 drogas probadas) y 5 cepas resistentes a diferentes antifímicos probadas previamente por el método de las proporciones que fueron donadas por el INER.

DEFINICION DE LAS VARIABLES:

Mycobacterium tuberculosis: Se consideró como tal, toda cepa obtenida del crecimiento primario, que fué BAAR y que a la realización de prueba de NAP mostrara decremento ó ausencia del incremento de su IC en dos determinaciones subsecuentes (24).

Para considerar que las cepas obtenidas en los subcultivos eran cepas únicas, el requisito fué que debían tener el mismo perfil de sensibilidad. Para inferir que en los subcultivos existían cepas diferentes, fué requisito que entre ellas hubieran diferencias en sus perfiles de sensibilidad.

SENSIBILIDAD A ANTIFIMICOS (Isoniacida, estreptomina, etambutol y rifampicina): Los valores de corte fueron los siguientes:

Estreptomina 6 mcg/ml

Isoniacida 0,1 mcg/ml

Rifampicina 2 mcg/ml

Etambutol 7,5 mcg/ml

Las cepas se consideraron resistentes cuando al menos el 1% de la población crecía en presencia de antifímicos a las concentraciones previamente señaladas: "Delta" del IC del control menor al "Delta" del IC en el medio con droga antifímica.

Las cepas se consideraron sensibles cuando el "Delta" del IC del control fué mayor al "Delta" del IC en el medio con droga antifímica (24).

El criterio para considerar resistencia primaria ó secundaria fué en relación a que el paciente del cuál se aisló la cepa hubiese o nó recibido tratamiento antifímico.

ANALISIS DE RESULTADOS:

Se realizó análisis descriptivo de frecuencias simples.

RESULTADOS

Se estudiaron las muestras provenientes de 55 pacientes. Únicamente en 28/55 se obtuvieron cultivos positivos. De éstos, en 21 se identificó *M.tuberculosis*, en 6 se identificaron Micobacterias diferentes a tuberculosis (MOTT), en 1 hubo desarrollo de *M.tuberculosis* y MOTT. Seis cultivos fueron eliminados por haberse contaminado. Dos cultivos fueron excluidos porque solo hubo crecimiento de 2 colonias. Finalmente el estudio de sensibilidad se llevó a cabo con las micobacterias aisladas de 13 pacientes.

De los 13 pacientes nueve fueron de sexo masculino y cuatro femenino, la mediana para la edad fué de 36 con límites de 18 y 69 años. Como diagnósticos de enfermedades agregadas se encontró Diabetes Mellitus no Insulino dependiente en 3 pacientes, el resto no tenían otros diagnósticos agregados. Únicamente un paciente había recibido antifímicos durante 2 años, previamente.

De los 13 cultivos de aislamiento primario se realizaron subcultivos de 4 colonias escogidas al azar, de tal manera que se probó sensibilidad a un total de 52 subcultivos. Los resultados de sensibilidad se obtuvieron entre 4 y 8 días, con una mediana de 5 días.

Los perfiles de sensibilidad de las micobacterias fueron iguales para todos los subcultivos realizados por cada paciente, a excepción de un caso (paciente No. 5) del cual en uno de los cuatro subcultivos, las micobacterias resultaron con perfil de sensibilidad diferente al de los otros tres; los resultados de este caso se muestran en la tabla 1. Las pruebas de sensibilidad para éste paciente se realizaron por duplicado.

SENSIBILIDAD DE LOS SUBCULTIVOS DEL PACIENTE No. 5

SUBCULTIVO No.	ANTIFÍMICOS			
	estreptomicina	isoniacida	rifampicina	etambutol
1	sensible	<i>resistente</i>	sensible	sensible
2	sensible	sensible	sensible	sensible
3	sensible	sensible	sensible	sensible
4	sensible	sensible	sensible	sensible

Tabla No. 1

Las micobacterias de 21 subcultivos, aisladas de 6 pacientes, fueron resistentes a Isoniacida. En 12 subcultivos, provenientes de 3 pacientes, se detectó resistencia a rifampicina; en todos ellos, las micobacterias eran resistentes simultáneamente a Isoniacida; no se detectaron micobacterias con resistencia única para rifampicina. Las proporciones de resistencia para Isoniacida y rifampicina se muestran en la tabla 2.

PROPORCION DE SUBCULTIVOS Y PACIENTES CON RESISTENCIA A ANTIFIMICOS

RESISTENCIA A	SUBCULTIVOS n=52		PACIENTES n=13	
	n	%	n	%
Isoniacida solamente	9	17	3	23
Rifampicina solamente	0	0	0	0
Isoniacida y Rifampicina	12	23	3	23
Isoniacida total	21	40	6	46

Tabla No. 2

No se detectaron micobacterias resistentes a estreptomycinina ni para etambutol.

En todos los casos a excepción de uno la resistencia encontrada se consideró primaria. En el único caso (paciente No 10) en que la resistencia se consideró secundaria, las micobacterias mostraron resistencia a Isoniacida y rifampicina, el mismo patrón se observó en dos pacientes con resistencia primaria. La sensibilidad de las micobacterias aisladas de cada paciente se muestran en la tabla 3.

**SENSIBILIDAD A ANTIFIMICOS DE CADA SUBCULTIVO POR PACIENTE
Y DATOS CLINICOS PRINCIPALES**

PACIENTE No.	EDAD EN AÑOS	ANTIFIMICOS PREVIOS	SUBCULTIVO No.	SENSIBILIDAD			
				Est	INH	Rif	Efb
1	34	NO	1,2,3,4.	S	S	S	S
2*	69	NO	1,2,3,4.	S	S	S	S
3*	42	NO	1,2,3,4.	S	S	S	S
4	47	NO	1,2,3,4.	S	S	S	S
5	21	NO	1	S	R	S	S
			2,3,4.	S	S	S	S
6	64	NO	1,2,3,4.	S	S	S	S
7	18	NO	1,2,3,4.	S	R	S	S
8	51	NO	1,2,3,4.	S	R	R	S
9	23	NO	1,2,3,4.	S	S	S	S
10	34	SI	1,2,3,4.	S	R	R	S
11	36	NO	1,2,3,4.	S	R	S	S
12*	26	NO	1,2,3,4.	S	S	S	S
13	42	NO	1,2,3,4.	S	R	R	S

Tabla No. 3

Est= estreptomina, INH= Isoniacida, Rif= rifampicina,
Efb= etambutol. Sensibilidad S= Sensible R=Resistente.
* Diabetes Mellitus no insulino dependiente.

DISCUSION

El resurgimiento de tuberculosis, ha sido registrado incluso en países desarrollados, habiéndose documentado brotes de la enfermedad por cepas multirresistentes (2,11,14,15); varios factores se han estudiado en relación al riesgo de ser infectado por éstas cepas y entre los que han destacado se encuentran ser portador de inmunodeficiencias y haber nacido en países Latinoamericanos o asiáticos (2,4,10,13,15). En México, de acuerdo a los boletines del INDRE, la enfermedad exhibe la tendencia epidemiológica ascendente; las cepas de *M.tuberculosis* estudiadas en dicha Institución, en un alto porcentaje, se han encontrado con patrones de resistencia a drogas antituberculosas de primera línea (5). Las recomendaciones terapéuticas del Control Diseases Center (CDC) han sido modificadas, recomendando que en aquellos países donde la resistencia primaria a antituberculosas de primera línea sea igual o mayor al 15%, el tratamiento deber incluir cuatro drogas, de las cuales tres deberán tener actividad bactericida (2,25,26). Los problemas de multirresistencia sugieren la necesidad de que además de un seguimiento epidemiológico de los pacientes, deber incluirse en su estudio, pruebas de sensibilidad a antituberculosas, que en nuestro medio únicamente se realizan en centros de referencia ó investigación.

Nuestro estudio además de estudiar los patrones de sensibilidad de cepas de *M.tuberculosis*, se dirigió a la búsqueda de coexistencia de cepas con diferente perfil de sensibilidad en un mismo individuo con tuberculosis pulmonar.

Aunque nuestro número de pacientes fué pequeño observamos, al igual que en otros estudios (10,11,13,16), una proporción elevada de resistencia a antituberculosas de primera línea, principalmente a Isoniacida. La resistencia a rifampicina solo se documentó en asociación a resistencia para Isoniacida, lo cual previamente ha sido reportado por Barnes (10), con lo que se puede inferir que la probabilidad de multirresistencia se incrementa al detectar cepas que sean resistentes a rifampicina. Contrariamente a lo encontrado en estudios realizados en USA, no detectamos cepas resistentes a estreptomycinina ni a etambutol, éste hallazgo probablemente se relacione a la disminución en su prescripción como antituberculosas de primera línea en nuestro medio. Por otra parte, esto correlaciona con la resistencia encontrada en nuestras cepas para las

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

drogas más utilizadas : Isoniacida y rifampicina. Si se consideran los porcentajes elevados de resistencia a rifampicina e Isoniacida observados en nuestro estudio la indicación de sólo estos dos fármacos como terapia inicial presupone un riesgo de fracaso del 23 % (resistencia a ambas drogas) y considerarse como monoterapia en el 40% que es la resistencia global a Isoniacida. Lo anterior apoya la propuesta de utilizar un esquema de cuatro drogas antituberculosas en el tratamiento inicial de pacientes con tuberculosis pulmonar en los cuales se desconozca el perfil de sensibilidad a antituberculosos lo cual disminuir desde el punto de vista teórico la aparición de cepas mutantes resistentes. Si existe el recurso de realizar sensibilidad a los aislamientos de *Mycobacterium* los esquemas podrán reducirse a dos o tres drogas dependiendo del perfil encontrado.

En un caso (No.5) logramos detectar heterogeneidad en los perfiles de sensibilidad entre las micobacterias subcultivadas a partir de diferentes colonias, lo cual es suficiente para confirmar nuestra hipótesis acerca de la coexistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y resistentes en un mismo individuo con tuberculosis pulmonar; es de llamar la atención que el individuo en el cual demostramos este hallazgo no tenía antecedente de exposición a antituberculosos, lo cual nos lleva a pensar que la fuente de infección de éste paciente pudo haber sido un caso con tuberculosis pulmonar que contaba con el antecedente de estar recibiendo antituberculosos, sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que nuestro caso haya sido infectado por dos individuos diferentes, uno de ellos con micobacterias sensibles y otro con micobacterias resistentes a Isoniacida ó que dicha cepa sea una mutación de "novo". Apoyando a lo anterior se encuentran los resultados de Small y cols (16,17) quienes encontraron que la reinfección exógena era la causante de la mayor proporción de la enfermedad pulmonar en adultos, confirmando con ello que personas previamente infectadas por *M.tuberculosis* pueden ser exógenamente reinfectadas. Para la identificación completa que nos permita conocer si son cepas genéticamente distintas serían de utilidad las técnicas de amplificación de DNA al azar (18) y las de análisis del polimorfismo de DNA restringido enzimáticamente (19). Edlin y cols (14) en un estudio de un brote reportó en 2 de 16 pacientes coexistencia de 2 cepas de *M.tuberculosis* con patrones de polimorfismo de DNA diferentes. La coexistencia de 2 ó más cepas en un

paciente desde un inicio de la enfermedad con diferentes perfiles de sensibilidad podría explicar que posterior a un tratamiento antitímico, se seleccione la cepa resistente y ésta sea la que posteriormente predomine, favoreciendo con ello la transmisión de cepas resistentes. No podemos establecer que tan frecuente ocurre el fenómeno de coexistencia de cepas sensibles y resistentes en un mismo individuo, empero el haberlo encontrado a pesar de que nuestra muestra estudiada fué pequeña sugiere que pudiera ser más frecuente de lo que teóricamente es esperado para mutaciones de 'novo', ya que se estima que éstas ocurren con una frecuencia aproximada de 10^{-5} a 10^{-11} (8). Es posible que aumentando la muestra de individuos enfermos así como el número de colonias estudiadas por cultivo positivo nos permitiría establecer la frecuencia con que ocurre éste fenómeno .

CONCLUSIONES:

- 1.- Se encontró coexistencia de Micobacterias sensibles y resistentes aisladas en esputo de un paciente con Tuberculosis pulmonar sin tratamiento previo.
- 2.- El porcentaje de cepas resistentes encontrado en nuestro estudio sugiere la necesidad de realizar sistemáticamente pruebas de sensibilidad a antifímicos a todas las cepas de *M.tuberculosis*
- 3.- Con los altos porcentajes de resistencia encontrados en éste estudio sería recomendable que el tratamiento inicial antifímico incluya cuatro drogas. Las modificaciones al tratamiento se deben realizar al conocer los patrones de sensibilidad.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Kochl A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991 ;72 :1-6.
- 2.- Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, Fischl MA, Sepkowitz KA, Goldberg MJ, Shinnick TM, Iseman MD, Jacobs WR. Tuberculosis Symposium: Emerging Problems and Promise. *J Infect Dis* 1993 ;168 : 537-51.
- 3.- Allen S, Batungwanayo J, Kerlikowske K, Ulfson AR, Wolf W, et. al. Two Year Incidence of tuberculosis In cohorts of HIV-Infected and Uninfected Urban Rwandan Women. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1439-1444.
- 4.- Brudney K, Dobkin J. Resurgent Tuberculosis in New York City. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:745-749.
- 5.- Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Tuberculosis . Boletín Informativo INDRE 1993: 115-116.
- 6.- Smith M, Starke J, Marquis JR. Tuberculosis and opportunistic mycobacterial Infections en: Felgin RD, Cherry JD. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*; 3a ed. Philadelphia. Pennsylvania.W.B. Saunders Company 1992: 1321-1362.
- 7.- Roberts GP, Koneman EW, Kim YK. *Mycobacterium*. en: Balows A. *Manual of clinical microbiology*. 5a.ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 1991:304-339.
- 8.- Dutt AK, Stead WW. Present Chemoterapy for Tuberculosis. *J Infect Dis* 1982; 146 : 698-704
- 9.- Telenit A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, et. al. Detection of rifampicin-resistence mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancel* 1993;341:647-50.
- 10.- Barnes AM. The influence of epidemiologic factors on drug resistance rates in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:325-328.
- 11.- Coronado VG, Beck-Sague CM, Hunton M, Davis BJ, Nicholas P, et al. Transmission of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with Human Immunodeficiency Virus Infection in an Urban Hospital: Epidemiologic and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1993; 168:1052-5.
- 12.- Goble M, Iseman M, Madsen LA, Waite D, Ackerson L, Horsburgh R. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med* 1993; 328:527-532.
- 13.- Riley LW, Arathoon E, Loverde V. The epidemiologic Patterns of Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections: A community-based Study. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1282-1284.
- 14.- Edlin BR, Tokars JI, Grieco M, Crawford JT,Williams J, et.al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992;326:1514-21.
- 15.- Frieden TR, Sterling T, Pablos-Múndez A, Kilburn J, Cauthen GM, Dooley SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993; 328:521-6.

- 16.- Small PM, Shafer RW, Hopewell P, Singh SP, Murphy M, et.al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993; 328:1137-44.
- 17.- Small PM y cols. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N Engl J Med* 1994;330:1703-9.
- 18.- Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, Millar MR. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2169-74.
- 19.- Mazurek G, Cave D, Eisenach K, Wallace J, Bates J, Crawford J. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2030-33.
- 20.- Snider J, Good RC, Kilburn JO, Laskowski LF, Lusk H, Marr J, Regginaldo Z, Middlebrook G. Drug-susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Resp Dis* 1983; 123: 204-6.
- 21.- Siddiqi S, Libonati J, Middlebrook G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1981;13:908-912.
- 22.- Comité de expertos en servicios de Laboratorios de Salud. Planificación y organización de servicios de Laboratorios de salud. Quinto Informe del comité. OMS. Serie de Informes técnicos 1972: No 491.
- 23.- Laszlo A, Siddiqi SH. Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with p-nitro-acetilamino-b-hidroxypropilphenone. *J Clin Microbiol* 1984;19:694-5.
- 24.- Becton Dickinson . Manual de procedimientos BACTEC TB 460.
- 25.- CDC. Management of persons exposed to Multidrug-resistant tuberculosis. *MMWR* 1992;41 (RR11):59-71.
- 26.- Barnes PF, Barrows SA. Tuberculosis in the 1990s. *Ann Intern Med* 1993; 119:400-410.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Guadalupe Miranda, al Dr. Guillermo Vázquez y al Dr. Gerardo Palacios por haber contribuido al logro de ésta meta.

Al personal de laboratorio clínico: Alejandra, Blanca, Martha, Fausta, Mary Paz, Josefina y Carlos, por su colaboración.

Norma por su invaluable ayuda.

A la Química Edith Pérez por su interés y colaboración.