

11261

100 40 1001 100  
100 100 100 100



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

10

FACULTAD DE MEDICINA  
SEDE CENTRO  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE INFECTOLOGIA "DANIEL MENDEZ"  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"  
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA  
EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

TUBERCULOSIS EN PACIENTES CON Y SIN INFECCION POR  
EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA - ANALISIS DE  
LA SENSIBILIDAD A ANTITUBERCULOSOS PRIMARIOS Y DEL  
POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCION DEL DNA  
DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

TESIS DE MAESTRIA  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA:  
DR. JOSE JUAN TERRAZAS ESTRADA

TUTOR DR. CARLOS LAVALLE MONTALVO

COTUTORES:  
DR. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO  
DR. SIGFRIDO RANGEL FRAUSTO



IMSS

MEXICO, D.F.

FEBRERO DEL 2000

275801



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

El presente trabajo fue realizado con el apoyo de

**CONACYT a través del proyecto 0796P-M9506,  
la beca número 116855 (becario 115891)**

y

**por la Coordinación de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro  
Social, FP 038/258**

**Lugares donde se realizó el trabajo**

**Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez"  
Centro Médico "La Raza", IMSS**

**y**

**Laboratorio de Biología Molecular, Unidad de Investigación Médica en  
Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría  
Centro Médico Nacional Siglo XXI - IMSS**

# **TUBERCULOSIS EN PACIENTES CON Y SIN INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

**Análisis de la sensibilidad a antituberculosos primarios y del  
polimorfismo de fragmentos de restricción del DNA de *Mycobacterium  
tuberculosis***

A Esther por su apoyo y cariño

## 1. ANTECEDENTES

### EPIDEMIOLOGIA

La tuberculosis (TB) es una infección causada en el ser humano principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*; generalmente es de evolución crónica y afecta prácticamente cualquier órgano pero con más frecuencia el pulmón. Actualmente es un problema de salud pública de tal magnitud, que en abril de 1993 la Organización Mundial de la Salud declaró que la meta de erradicarla en el año 2000 tendría que aplazarse varios años y declaró a la TB como una "urgencia mundial".<sup>1</sup>

A escala mundial, cada año se diagnostican 4 millones de casos nuevos y mueren cerca de 3 millones de individuos. En los últimos años la TB ha resurgido como consecuencia de múltiples factores, pero principalmente por la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Por otra parte, el surgimiento de bacilos tuberculosos multirresistentes ha dificultado el control de la enfermedad e incrementado la mortalidad.<sup>2,3,4,5</sup>

En nuestro país, cada año se diagnostican 17,000 casos nuevos y ocurren 4,023 defunciones por TB pulmonar, lo que equivale a 47 enfermos nuevos y 11 muertes diariamente.

Entre los principales factores que explican su incremento en nuestro país, están la asociación con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y SIDA, alcoholismo y diabetes mellitus (DM), que a su vez también se han incrementado.<sup>6</sup>

En el Instituto Mexicano del Seguro Social la TB se ha mantenido dentro de las primeras diez causas de muerte a nivel nacional<sup>7</sup> y en pacientes con SIDA es el segundo oportunista más frecuentemente reportado.<sup>8</sup>

Se estima que más del 90% de los casos de TB reportados en Estados Unidos son debidos a reactivación de infecciones antiguas<sup>9,10</sup>, sin embargo, actualmente se acepta que la infección exógena reciente influye de manera importante en la diseminación de la enfermedad, como lo reportó el Dr. Alland y cols,<sup>11</sup> quienes estimaron que cerca del 40% de un grupo de casos en la ciudad de Nueva York y 57% en el subgrupo de pacientes con infección por VIH, fueron debidos a infecciones exógenas recientes.

Se entiende por TB debida a reactivación de infección antigua, cuando las micobacterias que permanecieron latentes durante años después de la infección primaria, se reproducen y ocasionan enfermedad activa. Esto generalmente sucede cuando el individuo adquiere o desarrolla condiciones que deterioran el sistema inmunológico como el alcoholismo, DM, desnutrición, etc., pero principalmente por la coinfección con el VIH. También puede suceder, que posterior a la inhalación de bacilos tuberculosos, con o sin infección previa, el paciente se infecte y progrese rápidamente a enfermedad activa, lo cual se conoce como TB por infección exógena reciente. En este caso es común encontrar un caso índice y varios de sus contactos, generalmente con algún tipo de inmunodepresión, afectados por la misma cepa.

### RESISTENCIA AL TRATAMIENTO

Se define como resistencia a la habilidad de la micobacteria de sobrevivir a la exposición a un medicamento, y este fenómeno en TB se origina por el mecanismo de mutación - selección.

Los mutantes naturales aparecen muy infrecuentemente y esta frecuencia es diferente para cada uno de los diferentes medicamentos: rifampicina  $1/10^8$ , isoniazida y estreptomycin  $1/10^6$  y etambutol  $1/10^4$ . Asumiendo que la aparición de las mutaciones se da de forma independiente, la probabilidad de aparición espontánea de un organismo resistente a más de un medicamento es el producto de cada una de las probabilidades; por ejemplo, la probabilidad de que aparezca resistencia a isoniazida y rifampicina en una misma micobacteria es  $1/10^8 \times 1/10^6$  o  $1/10^{14}$ . Debido a que el número total de bacilos en una persona enferma, aún con enfermedad cavitada avanzada, no alcanza este número ( $1 \times 10^{14}$ ), la aparición espontánea de un bacilo multiresistente ocurre muy rara vez.<sup>12</sup> Sin embargo, esta frecuencia puede aumentar considerablemente por efecto de la presión selectiva que ejercen tratamientos inadecuados que eliminan los bacilos sensibles y permiten la multiplicación de los mutantes resistentes. Por tal motivo, el antecedente de tratamiento (principalmente el mal tratamiento, ya sea por prescripción inadecuada, falta de supervisión o abandono del mismo), constituye el principal factor que favorece la selección de *M. tuberculosis* resistente a uno o más antibióticos<sup>13,14,15,16</sup> y le da el carácter de enfermedad iatrogénica. Además, en estos pacientes el porcentaje de cepas resistentes será mayor a partir del primer mes, mientras mayor haya sido el tiempo que estuvieron expuestos al tratamiento.<sup>17</sup>

Epidemiológicamente se consideran dos tipos de resistencia: primaria y secundaria. La primaria es la que se presenta en pacientes que nunca han recibido tratamiento antituberculoso y la secundaria la que se desarrolla por efecto del mismo. La resistencia secundaria es la más importante clínicamente porque es la que provoca la acumulación de casos crónicos portadores de cepas multiresistentes y es un indicador de la efectividad del tratamiento; este tipo de resistencia refleja una variedad de errores en los tratamientos administrados y muestra el tipo de cepa que afectará próximamente a la comunidad.

Se define multiresistencia como la presencia de resistencia por lo menos a isoniazida y rifampicina.<sup>18</sup>

En nuestro país la información con respecto a la resistencia de *M. tuberculosis* es escasa. Uno de los trabajos más recientes es el del Dr. Sifuentes y cols. del INNSZ<sup>19</sup>, quienes reportaron 84 cepas con una resistencia primaria de 17%, una resistencia secundaria de 46% y multiresistencia de 19% con una fuerza de asociación entre multiresistencia y antecedente de tratamiento de 8.93 ( $IC_{95} 2.08 - 43.95$ ,  $p 0.0006$ ).

## OTROS FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE RESISTENCIA

Debido a que la susceptibilidad y prevalencia de TB son mayores en pacientes alcohólicos, con DM e infección por VIH, el Comité para la Eliminación de la Tuberculosis de E.U. los reconoce, entre otros, como grupos de alto riesgo.<sup>10</sup> Los mecanismos biológicos por los cuales los pacientes alcohólicos, con DM o infección por VIH son más susceptibles a la TB también se han descrito<sup>20,21,22,23,24,25,26</sup>, sin embargo, su asociación con el desarrollo o adquisición de cepas de *M. tuberculosis* multiresistente no se ha establecido. Existen algunos datos que hacen suponer dicha asociación, por ejemplo, se sabe que el alcoholismo se asocia significativamente con la falta de apego al tratamiento<sup>27</sup> por lo que de forma indirecta también podría asociarse al desarrollo de cepas resistentes. En pacientes con infección por VIH se han reportado un gran número de brotes epidémicos de cepas multiresistentes y es muy probable que en ellos la falta de apego al tratamiento también sea frecuente.



Por otra parte, no se ha demostrado que cepas resistentes de *M. tuberculosis* tengan mayor capacidad de infectar y causar enfermedad que las cepas sensibles,<sup>28</sup> sin embargo, aquellos pacientes expuestos a una cepa resistente tendrán mayor posibilidad de enfermarse debido a que un paciente con TB resistente permanecerá bacilífero por más tiempo, como consecuencia de la falta de respuesta al tratamiento convencional. El mayor tiempo de exposición aumenta la posibilidad de infectar y enfermar a los contactos, principalmente aquellos con mayor susceptibilidad como los diabéticos, alcohólicos y con infección por VIH.

### RESISTENCIA DE *M. tuberculosis* EN PACIENTES CON INFECCION POR VIH

A diferencia de lo que sucede en la población VIH negativa, las frecuencias de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia en pacientes con infección por VIH han sido poco estudiadas. Se ha supuesto que las frecuencias de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia en estos pacientes son mayores; sin embargo no existen trabajos de prevalencia al respecto. Esta suposición esta basada en:

- a) el gran número de brotes nosocomiales y comunitarios de cepas multiresistentes que han afectado a pacientes con VIH/SIDA<sup>29,30,31,32,33</sup> y a las frecuencias de multiresistencia reportada por el Dr. Shafer y cols.<sup>34</sup> en la Ciudad de Nueva York y la Dra. Ritacco y cols.<sup>35</sup> en Buenos Aires, Argentina, de 58% y 45.5% respectivamente; sin embargo, estos resultados se asociaron a brotes nosocomiales, lo que elevó los porcentajes y no refleja la prevalencia real del fenómeno
- b) a las características propias de pacientes con VIH/SIDA y TB (mayor posibilidad de tratamientos antituberculosos empíricos, mayor posibilidad de interrupción del mismo, uso de profilaxis con isoniacida, mayor número de internamientos y exposición a pacientes con TB, mayor porcentaje de infección exógena por cepas resistentes en brotes nosocomiales y comunitarios, etc.).

En México no hay trabajos de resistencia de *M. tuberculosis* aislados de pacientes con infección por VIH y de los 3 trabajos de resistencia de *M. tuberculosis* publicados en los últimos 7 años<sup>19,36,37</sup>, solo el del Dr. Sifuentes<sup>19</sup> menciona 7 pacientes con SIDA, de los cuales uno tenía una cepa multiresistente y otro una resistente a isoniacida.

### TRANSMISION NOSOCOMIAL DE TUBERCULOSIS

La TB ha sido reconocida desde hace mucho tiempo como un riesgo tanto para pacientes como para el personal de salud en las unidades médicas; sin embargo, esto no fue realmente evidente hasta la llegada del SIDA. Desde entonces, se han reportado un gran número de brotes nosocomiales que se han caracterizado por una elevada prevalencia de infección por VIH entre los casos (20-100%), una elevada mortalidad en pacientes con cepas multiresistentes (72-89%), un intervalo corto entre el diagnóstico y la muerte (4-6 semanas) y por la transmisión de cepas multiresistentes a pacientes con SIDA, tanto en países desarrollados<sup>29,30,31,33,38</sup> como en países en vías de desarrollo.<sup>35</sup>

Algunos de los factores contribuyentes de estos brotes son: retraso en el diagnóstico, aislamiento respiratorio inadecuado o ausente, procedimientos generadores de aerosoles como broncoscopias, expectoraciones inducidas y tratamiento con pentamidina aerolizada,

rápida progresión a enfermedad activa en pacientes con SIDA, persistencia de expectoraciones bacilíferas a pesar de tratamiento debido a cepas multiresistentes y ventilación inadecuada en cuartos aislados.<sup>39,40</sup>

Se ha descrito que los brotes nosocomiales reportados, se dan en el contexto de 3 principales factores presentes en un gran número de hospitales urbanos en los Estados Unidos: un número cada vez mayor de pacientes con infección por VIH/SIDA hospitalizados, una mayor frecuencia de TB en estos pacientes y por el incumplimiento de las guías publicadas para prevenir la transmisión de TB.<sup>41,42</sup>

Existen básicamente 3 formas de estudiar la posibilidad de transmisión nosocomial de TB:

- 1) A través de un estudio prospectivo determinar si individuos expuestos intrahospitalariamente a un caso índice enferman y verificar que las micobacterias de estos casos sean idénticas a la del caso índice.<sup>40</sup>
- 2) Identificar la presencia de un brote epidémico nosocomial de TB con los métodos epidemiológicos convencionales, analizar las cepas involucradas por medio de RFLP (ver más adelante) y si dos o más cepas son idénticas, intentar identificar retrospectivamente el caso índice y los mecanismos por los cuales se transmitió la enfermedad entre los individuos.<sup>20,31,39,41,43</sup> y
- 3) Analizar por RFLP una muestra de cepas y tratar de evidenciar posibles relaciones genéticas y epidemiológicas que de otra forma hubiesen pasado desapercibidas.<sup>11,34,35,44,45,46</sup>

La segunda estrategia es la más utilizada y la que ha puesto en evidencia el mayor número de brotes nosocomiales, sin embargo, al igual que la primera, pueden involucrar largos periodos de tiempo para que se produzca un brote epidémico que podamos detectar o para que los contactos enfermen, lo cual además puede no suceder.

### HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA, CENTRO MEDICO "LA RAZA" (HI, CMR)

El HI, CMR, es un centro de referencia infectológico con 70 camas para pacientes adultos, donde la principal causa de atención es la infección por VIH. El número actual de pacientes con VIH es de aproximadamente 800 y cada año se diagnostican por cultivo en promedio 80 casos de TB, de los cuales aproximadamente el 50% está coinfectado con VIH. En el HI, CMR, al igual que en otros hospitales del sector salud, las condiciones para el desarrollo de brotes nosocomiales de TB están dadas: prevalencia elevada de infección por VIH y TB, falta de cuartos aislados, no hay cuartos con presión negativa, los baños son comunitarios, etc. Además, las medidas recomendadas internacionalmente para prevenirlos, programas de detección de la infección y enfermedad activa, diagnóstico rápido, profilaxis y tratamientos adecuados, cuartos aislados, medidas físicas para reducir la contaminación aérea, cubrebocas de alta eficiencia, investigación pronta y control de los brotes, etc.,<sup>42</sup> se realizan inconsistentemente o no se tienen. Por tanto, la probabilidad de adquirir TB intrahospitalariamente es alta, al igual que la posibilidad de que pase desapercibida debido a la falta de una vigilancia epidemiológica estricta y a la falta de aplicación de las nuevas técnicas moleculares. Por otra parte, como el laboratorio de micobacterias del Hospital no cuenta con la infraestructura necesaria para la identificación de especies ni determinación de susceptibilidad a medicamentos, se desconocen las frecuencias de resistencia primaria,

secundaria y multirresistencia de *M. tuberculosis* en la población de pacientes con y sin VIH/SIDA.

### ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Con las técnicas de biología molecular, principalmente la determinación de la "huella digital" del DNA de *M. tuberculosis* por RFLP o análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción, se pueden identificar y diferenciar cepas de este bacilo, con lo que se ha mejorado la precisión de los estudios epidemiológicos; principalmente el análisis de los factores que facilitaron la transmisión de la enfermedad entre los pacientes, la determinación del origen de los brotes epidémicos comunitarios y nosocomiales, la diferenciación entre reactivación e infección exógena y la identificación de contaminación cruzada en el laboratorio.<sup>47,48,49</sup>

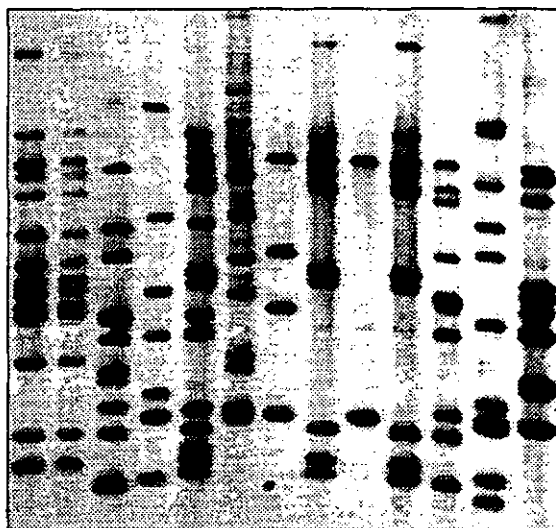
En países no desarrollados, donde la incidencia de TB es mayor, se han identificado y sugerido tres principales áreas de investigación para el uso de RFLP en estudios epidemiológicos:<sup>50</sup>

- 1) transmisión comunitaria
- 2) transmisión nosocomial y
- 3) TB relacionada a infección por VIH.

El RFLP se basa en la extracción del DNA de la micobacteria y su fragmentación con una enzima específica; posteriormente los fragmentos de DNA obtenidos son separados por electroforesis y visualizados usando una sonda que se une específicamente a los fragmentos de DNA que contienen una secuencia de bases denominado IS6110 que es característica del complejo *M. tuberculosis* (Fig. 1 y Anexo 1).

**Fig. 1. Ejemplos de patrones de RFLPs de 13 cepas de *M. tuberculosis*.**

El DNA genómico de la micobacteria se corta enzimáticamente y los fragmentos son separados por electroforesis; los fragmentos que contienen el segmento de DNA denominado IS6110 pueden ser visualizados por autorradiografía cuando se les une una sonda marcada. Cada línea vertical o carril, corresponde a una cepa de *M. tuberculosis*. Nótese que el número de bandas y su posición es variable, características muy útiles para determinar el grado de similitud entre las cepas.

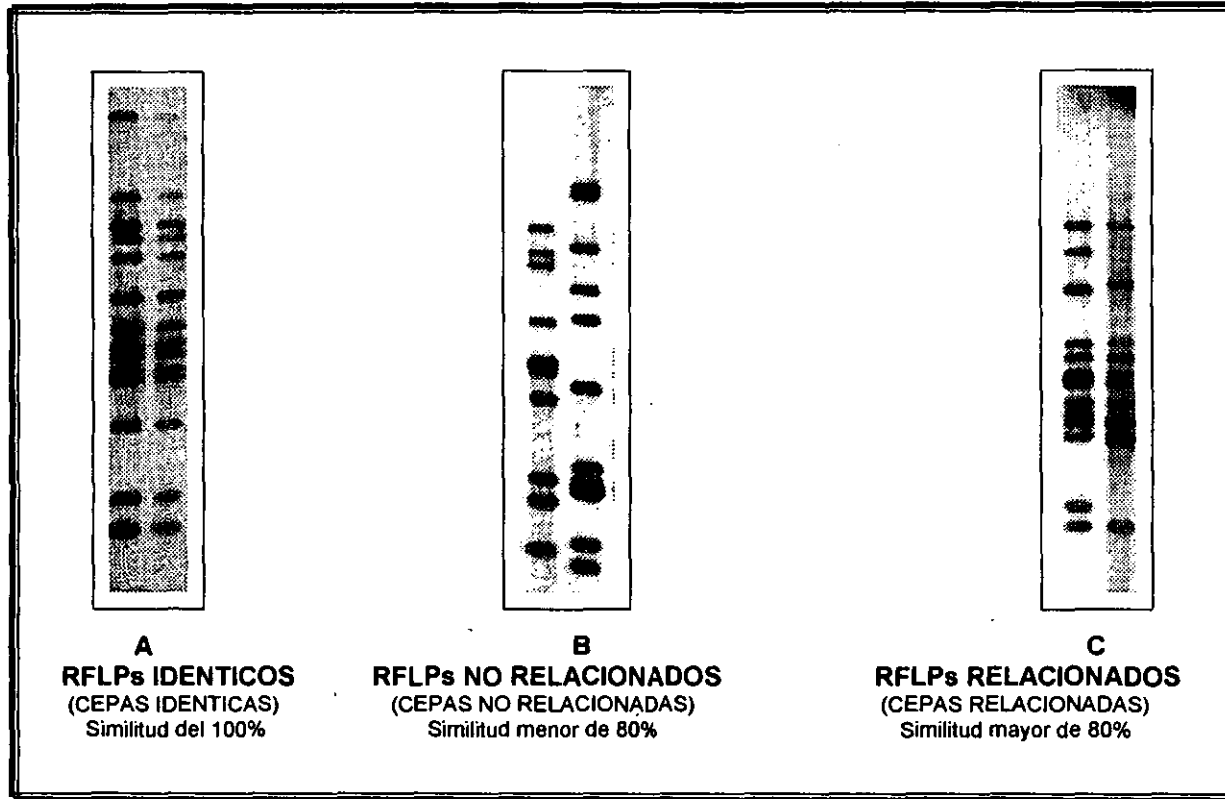


Número de cepa    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10   11   12   13

El genoma de *M. tuberculosis* contiene de 0 a 22 copias de este segmento de DNA cuya posición además es variable a lo largo del genoma. Debido a que el número de posibles combinaciones de ambas características es extremadamente grande, es prácticamente imposible que dos cepas no relacionadas genéticamente presenten el mismo patrón de bandas por RFLP.<sup>51,52,53</sup> Por lo anterior, se ha considerado que la combinación de ambas características, (número de copias y su posición en el genoma) constituye lo que se denomina "huella digital", que es característica para cada cepa de *M. tuberculosis*.

De acuerdo al índice de similitud por RFLP las cepas se pueden agrupar en tres categorías: cepas con RFLPs idénticos, con RFLPs relacionados y RFLPs no relacionados. Se definen **patrones idénticos** de RFLP cuando el índice de similitud de dos ó más cepas es de 100% o cuando solo difieren en una banda, las **cepas relacionadas** se reconocen cuando sus patrones de RFLP tienen un índice de similitud superior al 80% y **no relacionadas** cuando su similitud es inferior al 80%.<sup>34,41,44,53,54</sup> Dicho de otra forma, a mayor índice de similitud mayor la relación genética entre las cepas y viceversa.

Como el RFLP es una forma directa de medir el grado de "parentesco" o relación genética entre las cepas de *M. tuberculosis* de acuerdo a la similitud en la organización y constitución del genoma, se puede concluir que cepas con RFLP idénticos son realmente una misma cepa, que cepas con RFLPs relacionados están estrechamente "emparentadas" por tener un ancestro común y que cepas con RFLPs no relacionados son diferentes por no tener ningún tipo de relación entre ellas (Fig. 2).



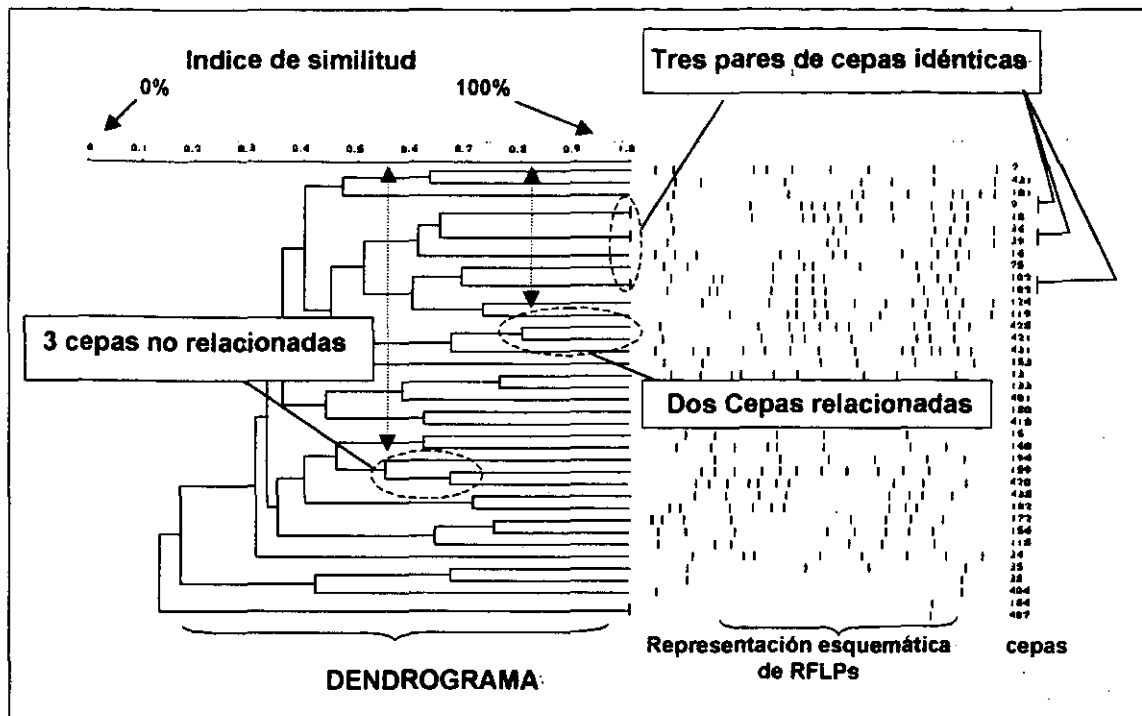
**Fig. 2. Criterios de similitud entre patrones de RFLP y ejemplo de patrones de RFLP idénticos, no relacionados y relacionados.** Los porcentajes de similitud se basan en el número de bandas y su posición que comparten los patrones de RFLP y se obtienen a través de dendrogramas (ver fig. 3). En el caso de cepas idénticas (ejemplo A) los RFLPs tienen el mismo número de bandas en la misma posición, mientras que en cepas no relacionadas (ejemplo B) tanto el número de bandas como sus posiciones son diferentes. Nótese como en el ejemplo C (cepas relacionadas) los patrones de RFLP comparten 9 bandas y difieren en 4.

Debido a la estabilidad del IS6110, la utilidad y aplicación de estos conceptos en la investigación clínico/epidemiológica en tuberculosis son inmediatas; en el caso de un brote epidémico ocasionado por diseminación de una sola cepa, los patrones de RFLPs serán idénticos, en caso de TB por infección exógena debido a diseminación reciente de una o más cepas habrá gran similitud entre ellas (cepas relacionadas) mientras que en un grupo de casos de TB por reactivación de infecciones antiguas los patrones de RFLP serán todos distintos o no relacionados debido a los diferentes tiempos y lugares en que cada paciente se infectó.<sup>45</sup> Sin embargo, algunas cepas de *M. tuberculosis* pueden tener un escaso número de copias de IS6110 (menos de 5) (ver figura 1, cepas 7 y 9) lo cual ocasiona que el poder discriminativo de la técnica disminuya y la posibilidad de que este tipo de cepas sean idénticas debidas al azar se incrementa, por lo que deben ser excluidas del análisis de similitud;<sup>11, 44,55</sup> es decir, cuando dos ó más cepas con RFLPs de menos de 5 bandas son idénticas, la posibilidad de que sean idénticas por el azar y no por proceder de un ancestro común es alta, y pondría en duda si ese grupo de cepas representan un brote epidémico o no.

Otra aplicación de la técnica es la determinación de contaminación en el laboratorio, lo cual se establece cuando dos o más cepas presentan patrones idénticos de RFLP, las muestras clínicas fueron procesadas en el laboratorio el mismo día y no hubo relación epidemiológica entre los pacientes.<sup>34,35</sup>

Debido a su gran poder discriminativo a escala molecular, el análisis por RFLP actualmente es el estándar de oro en estudios epidemiológicos de TB.<sup>11, 46,49,56</sup>

Por medio del programa computarizado Gel Manager versión 1.5 es posible obtener los porcentajes de similitud entre los patrones de RFLP. Este programa forma grupos de características similares usando un procedimiento estadístico conocido como análisis de grupos. Este procedimiento se base en los conceptos de distancia y similitud que existen entre las bandas de los patrones de RFLP. Distancia es la medida de lejanía y similitud la medida de cercanía entre las bandas. Utilizando el análisis de grupos los patrones de RFLPs son agrupados sobre la base de la "cercanía" entre las bandas. La medida del grado de cercanía o lejanía entre los patrones de bandas es el "coeficiente de similitud", el cual es el resultado de la comparación del patrón de bandas de una cepa con los patrones de bandas del resto de las cepas en estudio. Así, mientras el coeficiente de similitud es mayor, las cepas están más relacionadas y aparecen más juntas en el dendrograma, que es la forma gráfica de visualizar la relación entre un grupo de cepas (Fig. 3). Las cepas poco relacionadas estarán alejados en esta representación gráfica. Las cepas con patrones de bandas idénticos se colocarán una allado de la otra formando grupos o "clusters", mientras que cepas poco relacionadas estarán situadas separadamente.



**Fig. 3. Ejemplo de dendrograma donde se identifican cepas idénticas, cepas relacionadas y cepas no relacionadas.** En el extremo izquierdo se observa propiamente el dendrograma, que es la representación gráfica de los patrones de RFLP agrupados según su índice de similitud, el cual se determina transpolando las líneas verticales que indican cada grupo, con la escala localizada en el extremo superior izquierdo. En la parte media se localiza la representación esquemática de los RFLPs y en el extremo derecho el número que identifica cada cepa.

Obsérvese como cada par de cepas idénticas se identifica por líneas verticales localizadas a nivel del 1 o 100% de la escala de índice de similitud. En el caso del par de cepas relacionadas, la línea vertical que identifica el grupo se encuentra a nivel del 80% y para el grupo de 3 cepas no relacionadas el índice de similitud es de aproximadamente 56%.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

A pesar de que la TB es un grave problema de salud pública en México <sup>1,6</sup>, la información nacional existente es escasa. Igualmente, en el HI, CMR, donde la prevalencia de TB es elevada, se desconocen aspectos básicos como las frecuencias de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia de *M. tuberculosis*, las cuales se intuye, son elevadas considerando que una parte de los pacientes son enviados a nuestro hospital por recaída o falla al tratamiento. En este sentido, es importante estimar el efecto que tiene el antecedente de tratamiento sobre el desarrollo de resistencia para poder identificar tempranamente a pacientes con cepas resistentes. Además, debido a que el 50% de estos casos están coinfectados con el VIH, es probable que dicha asociación también favorezca la presencia de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y lo mismo puede ocurrir con otros factores como la DM II y el alcoholismo, que son altamente prevalentes en nuestros pacientes con TB, y que la SSA ha reportado como asociadas al incremento de casos de infección por VIH en nuestro país. También se ignoran los porcentajes de casos debidos a reactivación de infecciones latentes, que se estima es el principal mecanismo productor de enfermedad en pacientes con infección por VIH, o a infección exógena reciente. Por otra parte, dado que en el HI, CMR convergen los 3 factores asociados a brotes nosocomiales de TB (prevalencia elevada de casos con infección por VIH y TB e, incumplimiento de las guías recomendadas por los CDC para evitar la transmisión de TB) es posible que existan casos de TB de origen nosocomial que estén pasando desapercibidos.

Con lo anterior, se tendrá un conocimiento general de algunos de los aspectos más importantes de la TB en nuestro hospital, que serían de utilidad para la elaboración parcial de un programa de control de la TB en nuestra Unidad. Por ejemplo, en poblaciones donde la mayoría de los casos se deben a reactivación de infecciones latentes se deben implementar programas de detección con PPD y aplicación de tratamientos profilácticos o, en poblaciones donde la mayoría de los casos son debidos a infección exógena reciente, las acciones deben estar dirigidas a la identificación de grupos de alto riesgo de transmisión, detección temprana de casos, tratamiento hasta la curación y reducción de la diseminación intrahospitalaria. O, al conocer los porcentajes de resistencia y los factores de riesgo relacionados, se podría identificar tempranamente a pacientes con cepas probablemente resistentes e iniciar oportunamente tratamientos adecuados mucho antes de tener el cultivo y la sensibilidad, mejorando con esto, la posibilidad de curación y, paralelamente, evitando que otros individuos enfermen al cortar la cadena de transmisión. Por otra parte, en el caso de detectar casos de TB adquirida intrahospitalariamente, se deberán identificar los mecanismos que lo favorecieron para implementar y/o mejorar las medidas de seguridad al respecto.

Por último, se acepta que para el mejor control de la TB, independiente de la cantidad y tipo de información existente, se deben realizar periódicamente este y otro tipo de estudios en cada comunidad, para conocer con mayor precisión las características y necesidades particulares de cada una de ellas, con el objeto de implementar las medidas necesarias.

Debido a la mayor susceptibilidad de infección y rápida progresión a enfermedad activa por TB en pacientes con infección por VIH, se seleccionó a este tipo de pacientes considerando que la posibilidad de detectar casos de TB transmitida intrahospitalariamente o casos con cepas de *M. tuberculosis* relacionadas podría ser mayor.

### 3. PREGUNTAS

1. ¿Existen casos de tuberculosis nosocomial en una muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR?
2. ¿Cuál es la frecuencia de TB por reactivación de infecciones latentes e infección exógena determinados por RFLP en pacientes con infección por VIH?
3. ¿Cuál es la frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multirresistencia a 4 antituberculosos primarios de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH del HI, CMR?
4. ¿Cuales son los factores de riesgo para la adquisición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistente en una muestra de pacientes del HI, CMR?

### 4. OBJETIVOS

1. Determinar la existencia de tuberculosis nosocomial en una muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR.
2. Determinar la frecuencia de casos de TB por reactivación de infecciones latentes y de casos por infección exógena en pacientes con infección por VIH utilizando la técnica de RFLP.
3. Determinar la frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multirresistencia a 4 antituberculosos primarios en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH del HI, CMR.
4. Determinar los factores de riesgo asociados a la adquisición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes en una muestra de pacientes del HI, CMR.

### 5. HIPOTESIS

1. Existen casos de tuberculosis nosocomial en la muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR.
2. Más del 10% de los casos de TB en pacientes con infección por VIH son debidas a infección exógena reciente.
3. La frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multirresistencia es igual o superior al 17%, 46% y 19% respectivamente en pacientes con infección por VIH del HI, CMR.
4. El principal factor de riesgo para el desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes es el antecedente de tratamiento antituberculoso

### 3. PREGUNTAS

1. ¿Existen casos de tuberculosis nosocomial en una muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR?
2. ¿Cuál es la frecuencia de TB por reactivación de infecciones latentes e infección exógena determinados por RFLP en pacientes con infección por VIH?
3. ¿Cuál es la frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia a 4 antituberculosos primarios de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH del HI, CMR?
4. ¿Cuales son los factores de riesgo para la adquisición de cepas de *M. tuberculosis* multiresistente en una muestra de pacientes del HI, CMR?

### 4. OBJETIVOS

1. Determinar la existencia de tuberculosis nosocomial en una muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR.
2. Determinar la frecuencia de casos de TB por reactivación de infecciones latentes y de casos por infección exógena en pacientes con infección por VIH utilizando la técnica de RFLP.
3. Determinar la frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia a 4 antituberculosos primarios en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH del HI, CMR.
4. Determinar los factores de riesgo asociados a la adquisición de cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes en una muestra de pacientes del HI, CMR.

### 5. HIPOTESIS

1. Existen casos de tuberculosis nosocomial en la muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR.
2. Más del 10% de los casos de TB en pacientes con infección por VIH son debidas a infección exógena reciente.
3. La frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia es igual o superior al 17%, 46% y 19% respectivamente en pacientes con infección por VIH del HI, CMR.
4. El principal factor de riesgo para el desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes es el antecedente de tratamiento antituberculoso

### 3. PREGUNTAS

1. ¿Existen casos de tuberculosis nosocomial en una muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR?
2. ¿Cuál es la frecuencia de TB por reactivación de infecciones latentes e infección exógena determinados por RFLP en pacientes con infección por VIH?
3. ¿Cuál es la frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multirresistencia a 4 antituberculosos primarios de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH del HI, CMR?
4. ¿Cuales son los factores de riesgo para la adquisición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistente en una muestra de pacientes del HI, CMR?

### 4. OBJETIVOS

1. Determinar la existencia de tuberculosis nosocomial en una muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR.
2. Determinar la frecuencia de casos de TB por reactivación de infecciones latentes y de casos por infección exógena en pacientes con infección por VIH utilizando la técnica de RFLP.
3. Determinar la frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multirresistencia a 4 antituberculosos primarios en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH del HI, CMR.
4. Determinar los factores de riesgo asociados a la adquisición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes en una muestra de pacientes del HI, CMR.

### 5. HIPOTESIS

1. Existen casos de tuberculosis nosocomial en la muestra de pacientes con infección por VIH y tuberculosis del HI, CMR.
2. Más del 10% de los casos de TB en pacientes con infección por VIH son debidas a infección exógena reciente.
3. La frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multirresistencia es igual o superior al 17%, 46% y 19% respectivamente en pacientes con infección por VIH del HI, CMR.
4. El principal factor de riesgo para el desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes es el antecedente de tratamiento antituberculoso

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1. PACIENTES Y VARIABLES A ESTUDIAR

<b>Pacientes:</b>	Para los objetivos 1, 2 y 3: Pacientes con infección por VIH y tuberculosis
	Para el objetivo 4: Pacientes con y sin infección por VIH y tuberculosis
<b>Muestras :</b>	Cepas de <i>M. tuberculosis</i>
<b>Variables :</b>	Objetivos 1 y 2: Patrones de RFLP e índices de similitud
	Objetivo 3: Sensibilidad a: isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycin
	Objetivo 4: Factores de riesgo para multirresistencia: antecedente de tratamiento previo con antituberculosos, infección por VIH, diabetes mellitus II y alcoholismo.

### 6.2. DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

#### 6.2.1. PARA EL OBJETIVO 1

**Infección por VIH:** Determinación de anticuerpos séricos contra el VIH por el método de ELISA en dos ocasiones y confirmación por Western-Blot.

**Tuberculosis:** Infección de evolución subaguda o crónica, caracterizada por síndrome febril de magnitud variable, diaforesis de predominio vespertino - nocturno, ataque al estado general, signos y síntomas relacionados al órgano o sistema afectado, por ejemplo: meningoencefalitis, síntomas respiratorios como tos, expectoración mucosa, purulenta y/o hemoptoica con o sin disnea, dolor pleurítico, adenomegalias, escrófulas, etc., y cultivo de líquido cefalorraquídeo, expectoración, líquido pleural, sangre, secreción o biopsia de ganglio positivo a *M. tuberculosis*.

**Transmisión nosocomial:** Cuando las cepas de *M. tuberculosis* de dos o más pacientes presentan el mismo patrón de polimorfismo de DNA por RFLP (con más de 5 bandas), se ha descartado contaminación en el laboratorio y tienen el antecedente epidemiológico de contacto intrahospitalario definido por haber estado hospitalizados en el mismo cuarto o piso y/o haber tenido cita en consulta externa un mismo día por lo menos en una ocasión, teniendo uno de ellos enfermedad pulmonar o laríngea por *M. tuberculosis* con baciloscopía de expectoración positiva.<sup>39, 41</sup>

**Patrón de RFLP idéntico:** Cuando dos o más RFLPs presentan el mismo número de bandas en la misma posición, es decir, su índice de similitud es del 100% o sólo difieren en 1 banda. Una banda extra se considera el resultado de un evento de transposición replicativa.<sup>38,41,53,54</sup> Patrones idénticos de RFLP con más de 5 bandas significa que se trata de la misma cepa de *M. tuberculosis*.

## VARIABLES A DESCARTAR

**Contaminación en el laboratorio:** Cuando dos o más cepas de *M. tuberculosis* presentaron el mismo patrón de RFLP y sus cultivos y/o RFLPs se procesaron el mismo día en el laboratorio del HI, CMR o de la UIMEIP, CMN XXI y no existió el antecedente epidemiológico de contacto entre los pacientes.<sup>35,36</sup>

**Transmisión extrahospitalaria:** Cuando dos o más cepas de *M. tuberculosis* presentaron el mismo patrón de RFLP (con más de 5 bandas) y se descartó transmisión nosocomial y contaminación en el laboratorio.

## 6.2.2. PARA EL OBJETIVO 2

**Tuberculosis por reactivación de infección latente:** Enfermedad causada por la multiplicación de micobacterias después de haber permanecido inactivas o latentes posterior a la infección primaria.

**Tuberculosis por infección exógena:** Enfermedad causada por la inhalación de bacilos tuberculosos y rápida progresión a enfermedad activa.

**Patrón de bandas por RFLP:** Número y posición de bandas obtenido por RFLP de cada cepa de *M. tuberculosis*.

**Patrón de RFLP relacionado:** Cuando dos o más RFLPs presentan un índice de similitud de 80% o mayor. Patrones de RFLP relacionados significa que dichas cepas están conectadas genética y epidemiológicamente; es decir, se han transmitido entre los pacientes de una fuente común relativamente reciente, y lo más probable es que sean debidas a infección exógena reciente.<sup>44</sup>

**Patrón de RFLP no relacionado:** Cuando dos o más RFLPs presentan un índice de similitud menor de 80%. Patrones de RFLP no relacionados significa que dichas cepas de *M. tuberculosis* tienen orígenes distintos, es decir, que lo más probable es que se trate de casos por reactivación de una infección latente.<sup>44</sup>

Los RFLPs se realizaron por duplicado para verificar su reproducibilidad, posteriormente la imagen de mejor calidad se transfirió al programa Gel Manager 1.5 para la realización de los dendrogramas, los cuales se realizaron y analizaron por dos investigadores de forma independiente; en caso de existir alguna diferencia esta se resolvió por consenso con el apoyo del Dr. José Antonio Enciso, experto en Biología Molecular.

### 6.2.3. PARA EL OBJETIVO 3

**Fármacos antituberculosos primarios:** Isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycin.

***M. tuberculosis* resistente:** Cuando 1% o más de la población de *M. tuberculosis* crece en una ó más de las siguientes concentraciones de fármacos: estreptomycin 2 µg/ml, isoniacida 4 µg/ml, rifampicina 2 µg/ml y etambutol 7.5 µg/ml por el método radiométrico BACTEC.<sup>57</sup>

Las definiciones de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia son las recomendadas por el grupo mundial de trabajo OMS/UICter sobre vigilancia de resistencia a fármacos antituberculosos.<sup>18</sup>

**Resistencia Primaria:** Cuando una cepa de *M. tuberculosis* es resistente a uno o más medicamentos y no existe el antecedente de que el paciente haya recibido isoniacida, rifampicina, estreptomycin o etambutol en el pasado o cuando los haya recibido menos de 1 mes.

**Resistencia Secundaria:** Cuando una cepa de *M. tuberculosis* es resistente y existe el antecedente de que el paciente recibió, por lo menos durante 1 mes<sup>17</sup>, isoniacida, rifampicina, estreptomycin o etambutol.

***M. tuberculosis* multiresistente:** Cuando presenta resistencia a isoniacida y rifampicina o a 3 o más de los antituberculosos primarios en estudio.

***M. tuberculosis* sensible:** Cuando *M. tuberculosis* no presenta resistencia a estreptomycin, isoniacida, rifampicina ni etambutol.

#### 6.2.4. PARA EL OBJETIVO 4

**Casos:** Cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes

**Controles:** Cepas de *M. tuberculosis* no multirresistentes

***M. tuberculosis* multirresistente:** Igual que para el objetivo 3

**Antecedente de tratamiento:** Cuando el paciente tenga el antecedente de haber tomado por lo menos isoniacida y rifampicina, durante un mes como mínimo.<sup>17</sup>

**Diabetes Mellitus II:** Cuando así lo haya reportado el paciente y se encuentre registrado en el expediente.

**Alcoholismo:** Cuando existió el antecedente de que el paciente ingería bebidas alcohólicas diariamente, o cuando llegaba al estado de embriaguez por lo menos una vez por semana, o cuando se haya reportado "alcoholismo crónico intenso", o cuando el médico así lo haya diagnosticado y registrado en el expediente.

**Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana:** Se definió por la presencia de dos ELISAS positivas y un Western-Blot confirmatorio.

Nos interesaron estos tres factores y no otros, debido a que son los que se han asociado al incremento de la TB en México, según la Secretaría de Salud,<sup>6</sup> y de que en la práctica clínica se sabe que son altamente prevalentes en la población de pacientes con TB, que además, se sospecha que la mayoría tengan cepas resistentes. Por otra parte, independientemente de la información que pudiera existir en otros lugares, es necesario calcular el riesgo atribuible para cada uno de los probables factores asociados a multirresistencia en cada comunidad en particular para el mejor control y prevención de TB multirresistente.

### 6.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

#### 6.3.1. PARA EL OBJETIVO 1

Como ya se comentó existen 3 formas de estudiar la posibilidad de TB nosocomial: 1) vigilar prospectivamente a los contactos intrahospitalarios de un paciente con TB bacilífera para determinar si desarrollan TB con la misma cepa, 2) detectar un brote nosocomial de TB con los métodos epidemiológicos convencionales y tratar de identificar si fueron causados por la misma cepa, y 3) analizar un grupo de cepas de *M. tuberculosis* por medio de RFLP para tratar de identificar dos o más cepas idénticas y, retrospectivamente determinar si



constituyeron un brote epidémico nosocomial o comunitario no detectado por otros métodos, o si se trató de contaminación en el laboratorio.

Las dos primeras estrategias pueden tomar mucho tiempo o nunca suceder, por lo que se consideraron poco factibles considerando el tiempo limitado para desarrollar el presente trabajo, por lo que se optó por la tercera estrategia, que es la segunda más utilizada con buenos resultados.

Por lo tanto el diseño de este objetivo constó de 2 partes; la primera fue un diseño transversal descriptivo para determinar la frecuencia de cepas de *M. tuberculosis* con patrones idénticos de RFLP. En caso de no encontrar patrones idénticos de RFLP se dio por terminado el objetivo.

En caso de identificar dos o más cepas de *M. tuberculosis* con patrones idénticos de RFLP se procedió a una segunda etapa denominada "rastreo epidemiológico" que consistió en el interrogatorio directo y/o la revisión de la base de datos de los pacientes con estas cepas para determinar si se trató de un brote epidémico nosocomial, comunitario o contaminación del laboratorio.

Los pacientes con cepas idénticas que coincidieron por lo menos un mismo día en el hospital, ya sea en consulta externa u hospitalización, y habiendo descartado contaminación en el laboratorio, se consideraron como portadores de enfermedad tuberculosa de adquisición nosocomial y definió un probable brote epidémico nosocomial.

Los pacientes con cepas idénticas que no coincidieron en el hospital y habiéndose descartado contaminación en el laboratorio, se consideraron portadores de TB de adquisición comunitaria y constituyeron un probable brote epidémico comunitario.

### **6.3.2. PARA LOS OBJETIVOS 2 Y 3**

Diseño transversal descriptivo

### **6.3.3. PARA EL OBJETIVO 4.**

Estudio de casos y controles

## **6.4. DISEÑO DE LA MUESTRA**

### **6.4.1. POBLACION**

La población actual de pacientes con infección por VIH que se atiende en el HI, CMR es de aproximadamente 800 y, anualmente se diagnostican por cultivo 80 casos de TB, de los cuales el 50% (40 casos) está coinfectado con el VIH. Estas 40 cepas de *M. tuberculosis* en pacientes con infección por VIH constituyeron la población disponible (población finita) para la realización de los 3 primeros objetivos. Para el cálculo del tamaño de muestra de estos objetivos, se utilizaron porcentajes mínimos y máximos obtenidos por otros autores en trabajos con diseños similares al nuestro y publicados en la literatura nacional e internacional. Los tamaños de muestra para estos objetivos se ajustaron a esta población

finita, con lo que se mejora la factibilidad cuando el tiempo y los recursos son limitados; sin embargo, una desventaja es que se pierde validez externa. El cálculo del tamaño muestral para los dos primeros objetivos, se realizó principalmente para tener la certeza de que no se incurría en un error tipo I, es decir, no encontrar lo que se busca por un tamaño de muestra insuficiente y no porque no exista dicho fenómeno. Para calcular el tamaño de muestra del cuarto objetivo primero se realizó un estudio piloto con el objeto de determinar la prevalencia del factor de riesgo en los casos y controles. En este caso no se ajustó el tamaño de muestra y por tanto se conservó su validez externa.

#### 6.4.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA PARA EL OBJETIVO 1

En estudios previos con un diseño similar al que proponemos, el número de cepas estudiadas exclusivamente de pacientes con infección por VIH ha variado de 16 a 74, y los porcentajes en los que se encontró cepas relacionadas o idénticas en estos estudios varió de 36.6 a 95.8%<sup>35,40,41,58</sup>, lo cual no significa que en todas las muestras que se estudien deben existir brotes epidémicos, pues se debe considerar que la transmisión nosocomial es un evento esporádico que puede ocurrir cuando se rompe una ó más de las normas recomendadas para evitarlo, que puede involucrar únicamente a dos individuos y que puede pasar desapercibido por falta de un estricto control epidemiológico basado en el análisis de RFLP. A pesar de lo anterior, se calculó el tamaño de muestra considerando una población de 40 cepas, una prevalencia esperada de 66.2% (promedio de 36.6 y 95.8% que son los porcentajes mínimo y máximo de cepas asociados a brotes nosocomiales en estudios con un diseño similar al nuestro) un peor aceptable de 36.6%, un nivel de confianza de 95% y utilizando el programa Epi Info versión 6 se obtuvo un tamaño de muestra de 8 cepas, que se obtuvieron con un muestreo no probabilístico de casos consecutivos de pacientes con infección por VIH que se presentaron durante el periodo de estudio.

La fórmula que utiliza el programa es la siguiente:

$$S = z \times z \times \left[ \frac{P \times 1 - P}{D \times D} \right] \quad \text{donde} \quad \begin{array}{l} S = \text{tamaño de la muestra} \\ z = \text{percentil de la distribución estándar normal} \\ \quad \text{determinado por el nivel de confianza.} \\ \quad \text{Igual a 1.96 para 95\% de confianza} \\ D = \text{la mitad de la amplitud del intervalo de confianza} \\ \quad \text{calculado} \end{array}$$

Sin embargo, cuando la población es finita se ajusta el tamaño de muestra con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{S}{\left[ 1 + \frac{S}{\text{población}} \right]} \quad \text{donde} \quad n = \text{tamaño de muestra ajustado}$$

Estas fórmulas también se utilizaron para el cálculo de los tamaños muestrales de los objetivos 2 y 3.

### 6.4.3. TAMAÑO DE MUESTRA PARA EL OBJETIVO 2

Considerando una población de 40 cepas con una prevalencia esperada de casos por infección exógena de 57%, que fue lo reportado por el Dr Allan y cols. <sup>11</sup> en una población de pacientes con infección por VIH en la Ciudad de Nueva York, un peor aceptable de 10% <sup>9,10</sup>, que es lo que sucede en la población general de EU, con un intervalo de confianza de 95% y utilizando el programa Epi Info versión 6 se obtuvo un tamaño de muestra de 4 cepas. Para el caso de reactivación de infecciones antiguas, con base en la misma población, una prevalencia esperada de 90% <sup>9,10</sup>, un peor aceptable de 43% <sup>11</sup> y un nivel de confianza de 95% se obtuvo un tamaño de muestra de 2. Por lo tanto el tamaño de muestra fue de por lo menos 4 cepas.

### 6.4.3. TAMAÑO DE LA MUESTRA PARA EL OBJETIVO 3

Se tomó como referencia los resultados publicados por el Dr. Sifuentes y cols. <sup>19</sup> obtenidos en el INNSZ considerando que es un centro de referencia infectológico similar al HI, CMR; sin embargo, estos resultados proceden prácticamente de pacientes VIH negativos (77 de 84 o 92%), por lo que considerando algunas características descritas en pacientes con VIH/SIDA y TB como: mayor posibilidad de tratamientos antituberculosos empíricos, mayor posibilidad de interrupción del mismo, uso de profilaxis con isoniacida, mayor número de internamientos y exposición a pacientes con TB, mayor porcentaje de infección por cepas resistentes en brotes nosocomiales y comunitarios, etc., supusimos que los porcentajes de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia son mayores en la población VIH positiva. Para el caso de multiresistencia se obtuvo el promedio entre lo reportado por el Dr. Sifuentes y cols. en el INNSZ de 19% en población VIH negativa y lo reportado por la Dra. Ritacco y cols. <sup>35</sup> en Buenos Aires Argentina de 45% en pacientes con infección por VIH, obteniendo 32%, que es poco más de 10% de lo que sucede en población sin VIH. Se estimó que 10% más de lo reportado por el Dr. Sifuentes era clínicamente razonable y fue lo que se aplicó para el cálculo del tamaño de las muestras. No se utilizó directamente el porcentaje reportado por la Dra. Ritacco y cols. en pacientes con infección por VIH pues, como ya se comentó, procede de un brote epidémico causado por una cepa resistente, lo cual incrementó el porcentaje, no constituye una prevalencia real de la multiresistencia en este grupo de pacientes y hubiera disminuido importantemente el tamaño de muestra a 10 cepas.

	INNSZ Población 92% VIH negativa	Porcentajes propuestos en pacientes VIH positivos
Resistencia primaria	17%	27%
Resistencia secundaria	46%	56%
Multiresistencia	19%	29%

### **Tamaño de muestra para resistencia primaria**

Considerando una la población de 40 cepas, con una prevalencia esperada del factor en estudio de 27%, un peor aceptable de 17%, un nivel de confianza del 95% y utilizando el programa Epi Info versión 6, obtuvimos un tamaño de muestra de 26 cepas.

### **Tamaño de muestra para resistencia secundaria**

Con base en una población de 40 cepas, una prevalencia esperada del factor en estudio de 56%, un peor aceptable de 46%, un nivel de confianza de 95% y utilizando el programa Epi Info versión 6, se obtuvo un tamaño de muestra de 28 cepas.

### **Tamaño de muestra para multirresistencia**

Con base en una población de 40 cepas, una prevalencia esperada del factor en estudio de 29%, un peor aceptable de 19%, un nivel de confianza de 95% y utilizando el programa Epi Info versión 6, se obtuvo un tamaño de muestra de 27 cepas.

Tomando el mayor número de cepas obtenido, el tamaño de muestra para el objetivo 3 fue de 28 cepas; las cuales son una muestra muy seleccionada de la población de pacientes con infección por VIH del HI, CMR.

Si se hubiera utilizado la prevalencia de 45% reportada por la Dra. Ritacco nuestro tamaño de muestra hubiese sido de 10 y si el valor utilizado hubiera sido 32%, que es el promedio de lo reportado por el Dr. Sifuentes y la Dra. Ritacco, nuestro tamaño de muestra hubiese sido 22.

#### **6.4.4. TAMAÑO DE MUESTRA PARA EL OBJETIVO 4**

El tamaño de muestra se calculó sobre la base del factor de riesgo que más nos interesa y que además es el más importante para multirresistencia, que es el antecedente de tratamiento antituberculoso. Lo anterior debido a que una parte importante de nuestros pacientes han padecido TB o son enviados por TB activa con falla al tratamiento. Para esto, realizamos un estudio piloto con las primeras 15 cepas multirresistentes y las primeras 15 cepas no multirresistentes, para estimar la prevalencia del factor de riesgo tanto en los casos como en los controles. La prevalencia del factor de riesgo en controles fue de 26.6% (4/15) y de 80% (12/15) en los casos. Con estos datos y considerando un nivel de confianza del 95%, un poder de 80% y un control por cada caso se determinaron 16 casos y 16 controles. Por otra parte, al utilizar la razón de momios reportada por el Dr. Sifuentes de 8.93 y manteniendo los demás parámetros igual, obtuvimos 18 casos y 18 controles.

## 6.5. CRITERIOS DE SELECCION

### 6.5.1. PARA LOS OBJETIVOS 1 y 2

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes mayores de 16 años de edad, de cualquier sexo con infección por VIH del HI, CMR
2. Diagnóstico microbiológico de tuberculosis
3. Disponibilidad del cultivo para realización de RFLP y dendrogramas

#### CRITERIOS DE NO-INCLUSIÓN

1. Negativa de participar en el estudio
2. Cultivos contaminados con otras bacterias u hongos que no pudieron ser purificados

#### CRITERIOS DE ELIMINACION

1. Información epidemiológica incompleta o RFLP no valorable
2. Contaminación de laboratorio  
Las muestras con RFLP idénticos por contaminación en el laboratorio, se excluyeron del análisis de transmisión nosocomial pero no de la discusión de resultados generales.
3. Cuando el patrón de RFLP de dos o más cepas sean idénticos pero tengan 5 bandas o menos.<sup>11, 44, 55</sup>

### 6.5.2. PARA EL OBJETIVO 3

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes mayores de 16 años de edad, de cualquier sexo con infección por VIH del HI, CMR
2. Diagnóstico microbiológico de tuberculosis
3. Disponibilidad del cultivo para realización de sensibilidad a medicamentos

#### CRITERIOS DE NO-INCLUSIÓN

1. Negativa de participar en el estudio
2. Cultivos contaminados con otras bacterias u hongos que no pudieron ser purificados

#### CRITERIOS DE ELIMINACION

1. Información epidemiológica o de sensibilidad a medicamentos incompleta o no valorable

### 6.5.3. PARA EL OBJETIVO 4

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes mayores de 16 años de edad, de cualquier sexo con y sin infección por VIH del HI, CMR
2. Diagnóstico microbiológico de tuberculosis
3. Disponibilidad del cultivo para realización de sensibilidad a medicamentos

#### CRITERIOS DE NO-INCLUSIÓN

1. Negativa de participar en el estudio
2. Cultivos contaminados con otras bacterias u hongos que no pudieron ser purificados

#### CRITERIOS DE ELIMINACION

1. Información epidemiológica o de sensibilidad a medicamentos incompleta o no valorable

### 6.6. LUGARES DONDE SE DESARROLLÓ EL ESTUDIO

#### Hospital de Infectología, Centro Médico "La Raza"

Obtención de pacientes y cultivos de *M. tuberculosis*

**Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP)**. Segundo piso del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI - IMSS.

Determinación de sensibilidad a medicamentos antituberculosos, realización de RFLPs y dendrogramas

### 6.7. TIEMPO DEL ESTUDIO

Marzo de 1997 a Febrero de 1999

## 6.8. DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

Se estudiaron las cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con y sin infección por VIH que se atendieron en el HI, CMR. Una vez que hubo desarrollo en el medio de cultivo y antes de tener los resultados de sensibilidad y RFLP, se obtuvo la siguiente información a través de interrogatorio directo y/o revisión del expediente clínico del paciente correspondiente (Anexo 2): edad, género, antecedentes personales patológicos incluyendo infección por VIH, linfocitos CD4 y etapa clínica, DM II, alcoholismo, antecedente de TB, tratamiento, medicamentos utilizados y duración, fecha de citas en consulta externa en el HI, CMR, fecha de internamientos, piso y número de cama en donde fue internado, duración del (los) internamiento (s), fecha de diagnóstico del cuadro actual de TB, localización y tiempo de evolución previo al diagnóstico, entre las principales. Las variables necesarias para el presente trabajo fueron agregadas a un cuestionario ya existente dando como resultado el formato que se presenta en el Anexo 2, el cual es la base para otros proyectos de investigación colaborativos.

Después de resembrar las muestras en medio de agar Middlebrook 7H12 e incubado en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, se identificó a *M. tuberculosis* con el sistema automatizado BACTEC 460 mezclando una muestra del cultivo en crecimiento con NAP (p-nitro-alfa-acetilamino-hidroxiopropiofenona) que inhibe el crecimiento de las micobacterias que pertenecen al complejo tuberculosis. Posteriormente se determinó la sensibilidad a isoniazida, rifampicina, estreptomycin y etambutol con el método radiométrico BACTEC 460, utilizando el kit SIRE. Los antibióticos se diluyen a concentraciones predeterminadas y se agrega una muestra del cultivo. Se consideró como resistencia a uno o más de los medicamentos cuando el 1% o más de la población de *M. tuberculosis* mostró crecimiento. (Anexo 1)

A las cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con infección por VIH además se les determinó su patrón genético por RFLP. Como ya se comentó y puede observarse con detalle en el Anexo 1, para la realización de los RFLP inicialmente se extrajo el DNA de la micobacteria, posteriormente se purificó y cuantificó. Para cada cepa de *M. tuberculosis* se utilizaron 100 ng de DNA que se digirió (cortó) con la enzima de restricción PVU II. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa y posteriormente transferidos por capilaridad a una membrana de nylon. A esta membrana con los fragmentos de DNA se le agregó una sonda marcada que se unió a los fragmentos de DNA que contenían un segmento del elemento de inserción 6110; dichos fragmentos pudieron ser observados por autorradiografía ya que la sonda tiene un marcador quimioluminiscente que revela una placa de rayos X convencional. Los patrones de bandas obtenidos constituyeron los RFLPs, los cuales se realizaron por duplicado para comprobar su reproducibilidad. Posteriormente se realizaron dendrogramas en el programa Gel Manager 1.5 para determinar el índice de similitud entre las cepas y aquellas con índice de similitud de 100% (idénticas) se les investigó la posibilidad de contaminación en el laboratorio, transmisión nosocomial o transmisión comunitaria. A las cepas de pacientes con VIH se les determinó porcentajes de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia y a todas las cepas (de pacientes con y sin VIH) la fuerza de asociación entre multiresistencia y antecedente de tratamiento antituberculoso, y de forma exploratoria con DM II, alcoholismo e infección por VIH.

## 6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los objetivos 1 y 2 se realizaron dendrogramas e índice de similitud con el programa Gel Manager, Biosystemática, Reino Unido, Londres <sup>59</sup> para Windows 95 y se obtuvieron los porcentajes de cepas que resultaron estar o no relacionadas.

Para el objetivo 3 se determinaron porcentajes de resistencia.

Para los objetivos 2 y 3 se realizó además Bondad de Ajuste para comparar los resultados del presente trabajo con lo reportado por otros autores.

Para el objetivo 4 se utilizó  $\chi^2$  con corrección de Yates para la comparación de proporciones independientes considerando que las proporciones esperadas fueron mayores de 5%. La fuerza de asociación entre el factor de riesgo y multiresistencia se determinó con razón de momios e intervalos de confianza de 95%. Se realizó un análisis estratificado con  $\chi^2$  de Mantel-Haenzel entre multiresistencia y tratamiento previo, ajustándose por DM II, alcoholismo e infección por VIH. Para determinar la influencia del conjunto de factores de riesgo sobre la multiresistencia se realizó un análisis multivariado a través del modelo "backward" (quitando variables) de regresión logística.

El estadístico  $\chi^2$  de Mantel-Haenzel se realizó en el programa Stata 4.0, la  $\chi^2$  con corrección de Yates y razón de momios con intervalos de confianza de 95% con el programa Epi-Info 6 y la regresión logística con el programa SPSS 8.0

## 7. FACTIBILIDAD

**MUESTRAS:** Debido a que el HI, CMR es un centro de referencia infectológico dentro del IMSS, la prevalencia de casos con infección por VIH y/o TB es elevada. Además, los tamaños de muestra se ajustaron a una población muestral conocida.

**INFRAESTRUCTURA:** Los cultivos, identificación de la micobacteria, la determinación de sensibilidad a drogas antituberculosas y RFLPs se realizaron con el equipo de laboratorio y cómputo con que cuentan el HI, CMR y la UIMEIP, CMN Siglo XXI.

**HUMANOS:** Tanto en el HI, CMR como en la UIMEIP existe personal de base con amplia experiencia responsable de las secciones de micobacterias donde rutinariamente se cultivan, identifican y se determina su sensibilidad a medicamentos antituberculosos. El Dr. José Juan Terrazas Estrada se encargó de recabar la información clínica - epidemiológica necesaria y de realizar los RFLPs y dendrogramas.

**INSUMOS:** Se trabajó con los recursos propios de cada uno de los centros de trabajo; sin embargo, se solicitó y se consiguió apoyo financiero del IMSS por \$100,000/MN, que se ocupó en la compra de insumos.



## 6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los objetivos 1 y 2 se realizaron dendrogramas e índice de similitud con el programa Gel Manager, Biosystemática, Reino Unido, Londres <sup>59</sup> para Windows 95 y se obtuvieron los porcentajes de cepas que resultaron estar o no relacionadas.

Para el objetivo 3 se determinaron porcentajes de resistencia.

Para los objetivos 2 y 3 se realizó además Bondad de Ajuste para comparar los resultados del presente trabajo con lo reportado por otros autores.

Para el objetivo 4 se utilizó  $\chi^2$  con corrección de Yates para la comparación de proporciones independientes considerando que las proporciones esperadas fueron mayores de 5%. La fuerza de asociación entre el factor de riesgo y multiresistencia se determinó con razón de momios e intervalos de confianza de 95%. Se realizó un análisis estratificado con  $\chi^2$  de Mantel-Haenzel entre multiresistencia y tratamiento previo, ajustándose por DM II, alcoholismo e infección por VIH. Para determinar la influencia del conjunto de factores de riesgo sobre la multiresistencia se realizó un análisis multivariado a través del modelo "backward" (quitando variables) de regresión logística.

El estadístico  $\chi^2$  de Mantel-Haenzel se realizó en el programa Stata 4.0, la  $\chi^2$  con corrección de Yates y razón de momios con intervalos de confianza de 95% con el programa Epi-Info 6 y la regresión logística con el programa SPSS 8.0

## 7. FACTIBILIDAD

**MUESTRAS:** Debido a que el HI, CMR es un centro de referencia infectológico dentro del IMSS, la prevalencia de casos con infección por VIH y/o TB es elevada. Además, los tamaños de muestra se ajustaron a una población muestral conocida.

**INFRAESTRUCTURA:** Los cultivos, identificación de la micobacteria, la determinación de sensibilidad a drogas antituberculosas y RFLPs se realizaron con el equipo de laboratorio y cómputo con que cuentan el HI, CMR y la UIMEIP, CMN Siglo XXI.

**HUMANOS:** Tanto en el HI, CMR como en la UIMEIP existe personal de base con amplia experiencia responsable de las secciones de micobacterias donde rutinariamente se cultivan, identifican y se determina su sensibilidad a medicamentos antituberculosos. El Dr. José Juan Terrazas Estrada se encargó de recabar la información clínica - epidemiológica necesaria y de realizar los RFLPs y dendrogramas.

**INSUMOS:** Se trabajó con los recursos propios de cada uno de los centros de trabajo; sin embargo, se solicitó y se consiguió apoyo financiero del IMSS por \$100,000/MN, que se ocupó en la compra de insumos.

## 8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto fue sometido al comité científico y de ética del HI, CMR y fue aprobado. Además, posterior a una explicación amplia y suficiente se obtuvo el consentimiento por escrito de cada uno de los pacientes, garantizando absoluta confidencialidad en el manejo de la información proporcionada y de los resultados obtenidos (Anexo 3).

## 9. CRONOGRAMA DE TRABAJO

Tiempo límite para el desarrollo del trabajo: 1 de Marzo de 1997 al 28 de Febrero de 1999  
Sanción por el Comité Local de Investigación y Etica del HI, CMR: Enero - Febrero de 1997.  
Captación de pacientes y cultivos: 1 Marzo de 1997 a Junio de 1998  
Llenado de formatos de captación: Junio de 1997 - Enero de 1999.  
Determinación de sensibilidad a drogas y análisis del genoma de *M. tuberculosis* por RFLP:  
Julio de 1997 – Enero de 1999  
Análisis de la información: Diciembre de 1998 – Enero de 1999.  
Manuscrito de Resultados: Enero – Febrero de 1999.  
Presentación de manuscrito final para obtener el grado de maestro en ciencias: Marzo -  
Diciembre de 1999.

## 8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto fue sometido al comité científico y de ética del HI, CMR y fue aprobado. Además, posterior a una explicación amplia y suficiente se obtuvo el consentimiento por escrito de cada uno de los pacientes, garantizando absoluta confidencialidad en el manejo de la información proporcionada y de los resultados obtenidos (Anexo 3).

## 9. CRONOGRAMA DE TRABAJO

Tiempo límite para el desarrollo del trabajo: 1 de Marzo de 1997 al 28 de Febrero de 1999  
Sanción por el Comité Local de Investigación y Etica del HI, CMR: Enero - Febrero de 1997.  
Captación de pacientes y cultivos: 1 Marzo de 1997 a Junio de 1998  
Llenado de formatos de captación: Junio de 1997 - Enero de 1999.  
Determinación de sensibilidad a drogas y análisis del genoma de *M. tuberculosis* por RFLP: Julio de 1997 – Enero de 1999  
Análisis de la información: Diciembre de 1998 – Enero de 1999.  
Manuscrito de Resultados: Enero – Febrero de 1999.  
Presentación de manuscrito final para obtener el grado de maestro en ciencias: Marzo - Diciembre de 1999.

## 10. RESULTADOS

### OBJETIVO 1 Y 2

**Determinar la existencia de TB nosocomial y el porcentaje de casos por reactivación e infección exógena reciente en una muestra de pacientes con infección por VIH del HI, CMR.**

De las 31 cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de pacientes con infección por VIH, en 15 se realizaron RFLP. En las restantes no se pudieron realizar los RFLPs por imposibilidad de recultivar a la micobacteria para extracción del DNA, por obtención de DNA de mala calidad (degradado) o insuficiente. Sin embargo, el número de RFLPs realizados fue casi el doble del tamaño de muestra calculado.

Los dendrogramas de estos 15 RFLP no demostraron cepas con patrones idénticos entre sí, que pudieran relacionarse a un brote epidémico nosocomial, pero sí dos grupos de cepas con un índice de similitud superior al 80% (cepas relacionadas), el primer grupo comprendió 2 cepas (cepas número 545 y 490) y el segundo 3 (cepas 531, 539 y 517)(Figura 4). Los pacientes del primer grupo fueron pacientes masculinos de 37 y 34 años de edad, ambos con infección por VIH en etapa avanzada, con TB pulmonar cuyas cepas de *M. tuberculosis* presentaron el mismo patrón de sensibilidad a los 4 antituberculosos (pansensibles) y compartieron 10 bandas del patrón de RFLP. No existió contacto entre ellos previo al diagnóstico de TB dentro del hospital y dado que la cepa 545 se procesó 7 meses después que la 490, se descartó la posibilidad de contaminación en el laboratorio, por lo tanto, se consideró que estos dos pacientes presentaron TB por infección exógena de una cepa que se transmitió recientemente en la comunidad. El paciente con la cepa 490 era residente de Naucalpan, Estado de México, tenía educación profesional y adquirió la infección por VIH por vía heterosexual. El paciente con la cepa 545 vivía en Ciudad Nezahualcoyotl, Estado de México, era hojalatero y también adquirió la infección por VIH por vía heterosexual.

Los pacientes del segundo grupo fueron dos hombres y una mujer de 29, 35 y 38 años de edad respectivamente. El primer hombre y la mujer tenían infección por VIH avanzada (menos de 200 linfocitos CD4) y el segundo hombre tenía linfocitos CD4 normales. Uno de los paciente presentó TB ganglionar, el otro TB pleuropulmonar y pericárdica y la paciente TB pulmonar. Las 3 cepas de *M. tuberculosis* presentaron el mismo patrón de sensibilidad a los 4 antibióticos (pansensibles) pero ninguno de los tres pacientes estuvo en contacto con los otros dentro del hospital antes de enfermar de TB y tampoco existió la posibilidad de contaminación en el laboratorio debido a que las muestras se procesaron con 2 meses de diferencia entre cada una de ellas durante 1998, por lo que, al igual que los pacientes del grupo anterior, se consideró que estos 3 pacientes presentaron TB por infección exógena con una cepa que se transmitió recientemente en la comunidad. El paciente con la cepa 517 residía en Iztapalapa, D.F., era vendedor y homosexual, el paciente con la cepa 531 era residente de Ecatepec, Estado de México, laboraba como chofer y adquirió el VIH por vía heterosexual; por último, la paciente con la cepa 539 era residente de Texcoco, Estado de México, era empleada doméstica y se infectó con el VIH por vía heterosexual.

La Fig. 4 representa el dendrograma de las 15 cepas aisladas de pacientes con VIH donde puede observarse que el índice de similitud entre las cepas del grupo 1 y 2 es de aproximadamente 85%.

En las figuras 5 y 6 se observan los RFLPs de las dos cepas del grupo 1 y los 3 de las cepas del grupo 2 respectivamente. Las cepas de los otros 10 pacientes presentaron patrones de RFLP únicos o diferentes entre sí con un índice de similitud menor de 80% (cepas no relacionadas), por lo que es probable es que se trató de casos de TB por reactivación de infecciones antiguas (Figura 4 y 7).

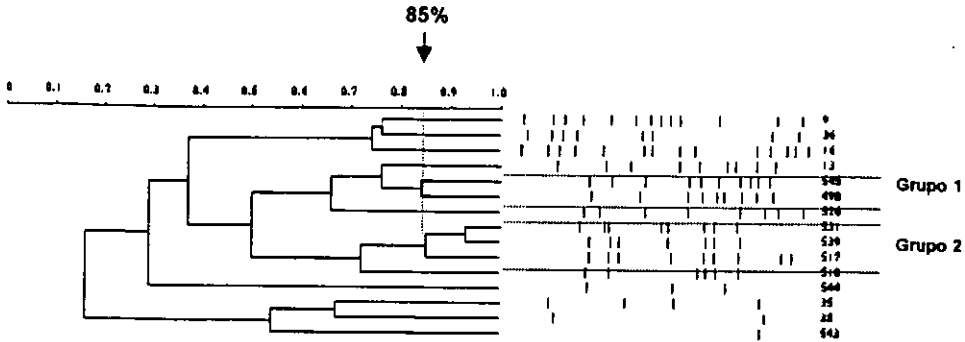
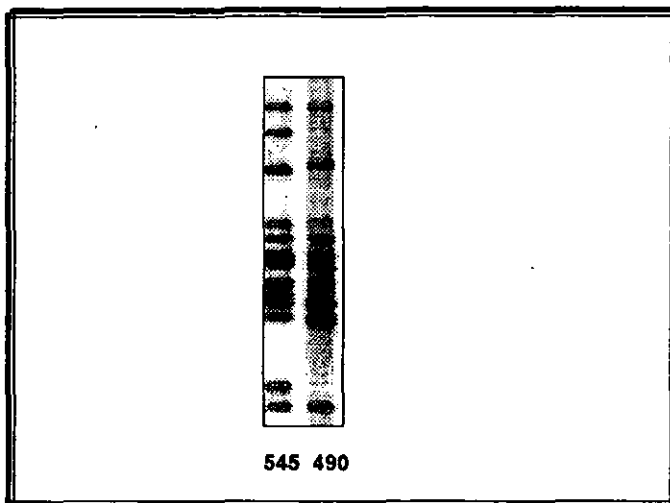
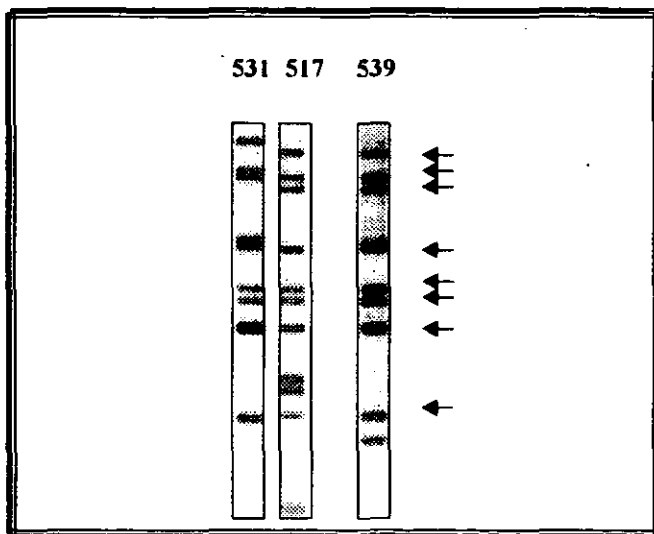


Fig. 4. Dendrograma de 15 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con VIH/SIDA, en el que se observan dos "clusters" o grupos de cepas relacionadas con un índice de similitud superior al 80%. En esta muestra no se detectaron cepas idénticas.

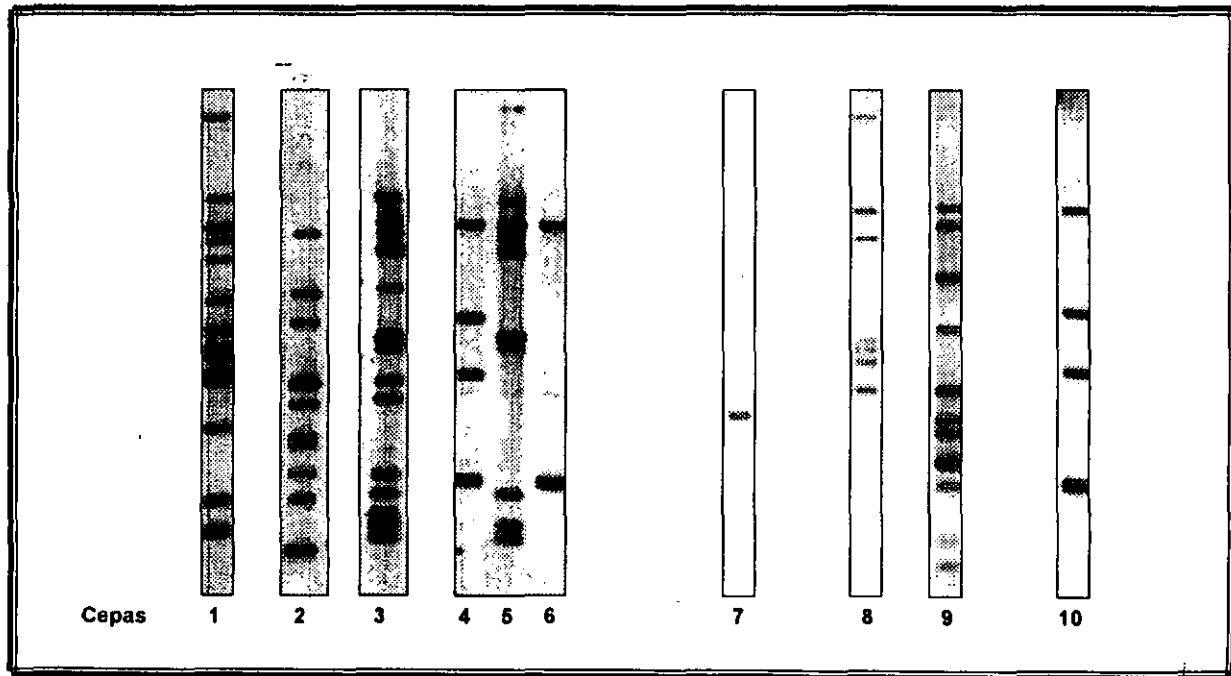
**Fig. 5. Patrones de bandas por RFLP de las dos cepas relacionadas del grupo 1. Nótese como los patrones de RFLP comparten 9 bandas y difieren en 4. Su índice de similitud fue de 85%.**



**Fig. 6. Patrones de RFLP de las tres cepas relacionadas del grupo 2. La comparación visual entre tres o más patrones de RFLPs puede ser difícil. La alineación de estos tres patrones de RFLP son inexactos debido a que los RFLPs proceden de diferentes geles y fueron unidos artificialmente para efectos de su presentación en esta figura: sin embargo, las flechas indican las bandas que comparten.**



**Fig. 7. RFLPs de 10 cepas de *M. tuberculosis* no relacionadas (RFLP diferentes) de pacientes con infección por VIH. Obsérvese como el número de bandas y sus posiciones varía significativamente entre los patrones, es decir, la relación entre ellas no existe o es muy pobre. En caso de que dos o más patrones de RFLP con menos de 5 bandas fueran idénticos hubieran sido eliminados del análisis.**



Por otra parte, se compararon los RFLPs de las 15 cepas de pacientes con infección por VIH con 60 RFLPs de pacientes VIH negativos, encontrando que el RFLP de la paciente del grupo 2 (cepa 539) descrito previamente es idéntico a los de dos pacientes VIH negativos (cepas 428 y 421).

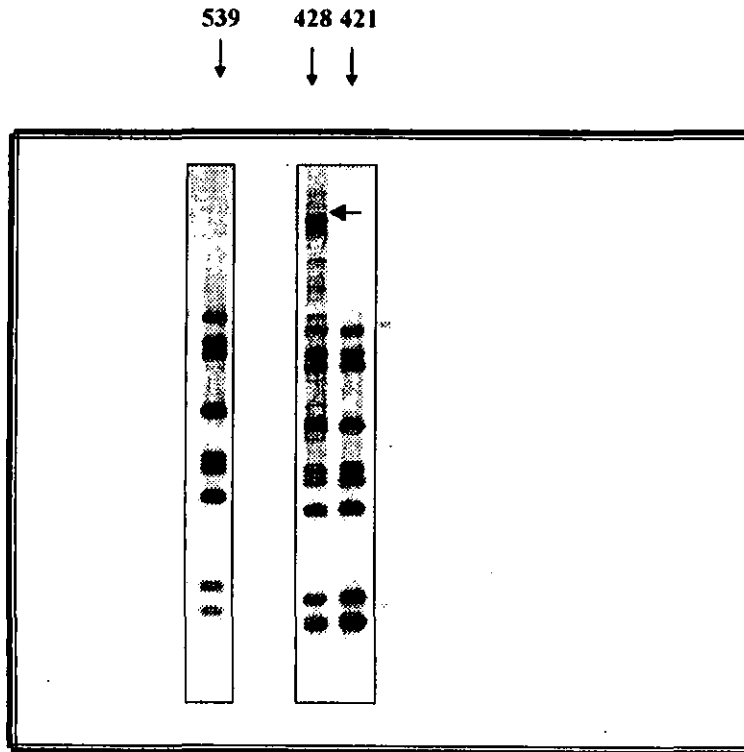
De los tres, al primero que se le diagnóstico TB fue al paciente con la cepa 421 (Octubre del 97), seguido de la paciente con la cepa 428 (Enero del 98) y por último la paciente con infección por VIH (Noviembre del 98). Debido a la diferencia temporal en que se procesaron las muestras se descartó la posibilidad de contaminación en el laboratorio y posterior a la revisión de los expedientes clínicos tampoco se pudo documentar contacto hospitalario entre los pacientes; por tal motivo es muy probable que se trate de un brote epidémico de origen comunitario (Figura 8 y 9). El paciente con la cepa 421 era un hombre de 44 años con domicilio en Ecatepec, Estado de México, de ocupación mecánico, tenía educación primaria, vivía en hacinamiento y tenía combe positivo, era alcohólico y tenía DM II, presentó TB pulmonar cavitada con baciloscopia positiva y al momento del diagnóstico tenía 60 días de evolución. La paciente con la cepa 428 era una mujer de 32 años, residente de Atotonilco el Grande, Hidalgo, con educación primaria, dedicada a las labores del hogar, vivía en hacinamiento, tenía combe positivo, no tenía antecedentes personales patológicos, se le diagnóstico TB pulmonar y el tiempo de evolución previo al diagnóstico fue de 365 días, su baciloscopia fue positiva (++) . Por último, la paciente con la cepa 539, era la paciente con infección por VIH de 38 años de edad, con domicilio en Texcoco, Estado de México, tenía educación primaria, laboraba como empleada doméstica, vivía en hacinamiento, tenía combe negativo y 30 días de evolución cuando se le diagnóstico TB miliar con baciloscopia positiva (+).

En el análisis de los RFLPs de cepas procedentes de pacientes con y sin infección por VIH, se identificaron otros tres pares de cepas con patrones de RFLPs idénticos. Uno correspondió a contaminación de DNA en la UIMEIP (cepas 36 y 39), otro (cepas 9 y 10) involucró a otro paciente con infección por VIH, sin embargo se eliminó del análisis debido a que no se localizó el expediente del paciente con VIH, pero se confirmó que no se debió a contaminación en el laboratorio; el último grupo también se eliminó por tener menos de 5 bandas (cepas 173 y 446) (Figura 9).

En los 75 RFLPs realizados, en general se encontraron 16 grupos, 37 cepas en total, con 80% o más de similitud (eliminando los casos por contaminación en el laboratorio y con menos de 5 bandas), es decir 49% de las cepas analizadas, muy probablemente se debieron a infecciones exógenas recientes y las restantes 51%, probablemente a reactivación de infecciones antiguas.



**Fig. 8. Tres cepas involucradas en un brote epidémico comunitario**



Los tres RFLPs (cepas) son idénticos. El RFLP de la cepa 428 presentó una banda extra, señalada con una flecha, y múltiples bandas extras muy tenues que se debieron a hibridaciones inespecíficas y por tanto no se consideraron para el análisis de similitud. La cepa 539 perteneció a una paciente con infección por VIH. Debido a que este último RFLP pertenece a otro gel, al ajustar las imágenes para efecto de su presentación en la figura, la alineación de las bandas es inexacta.

## Escala del Índice de similitud

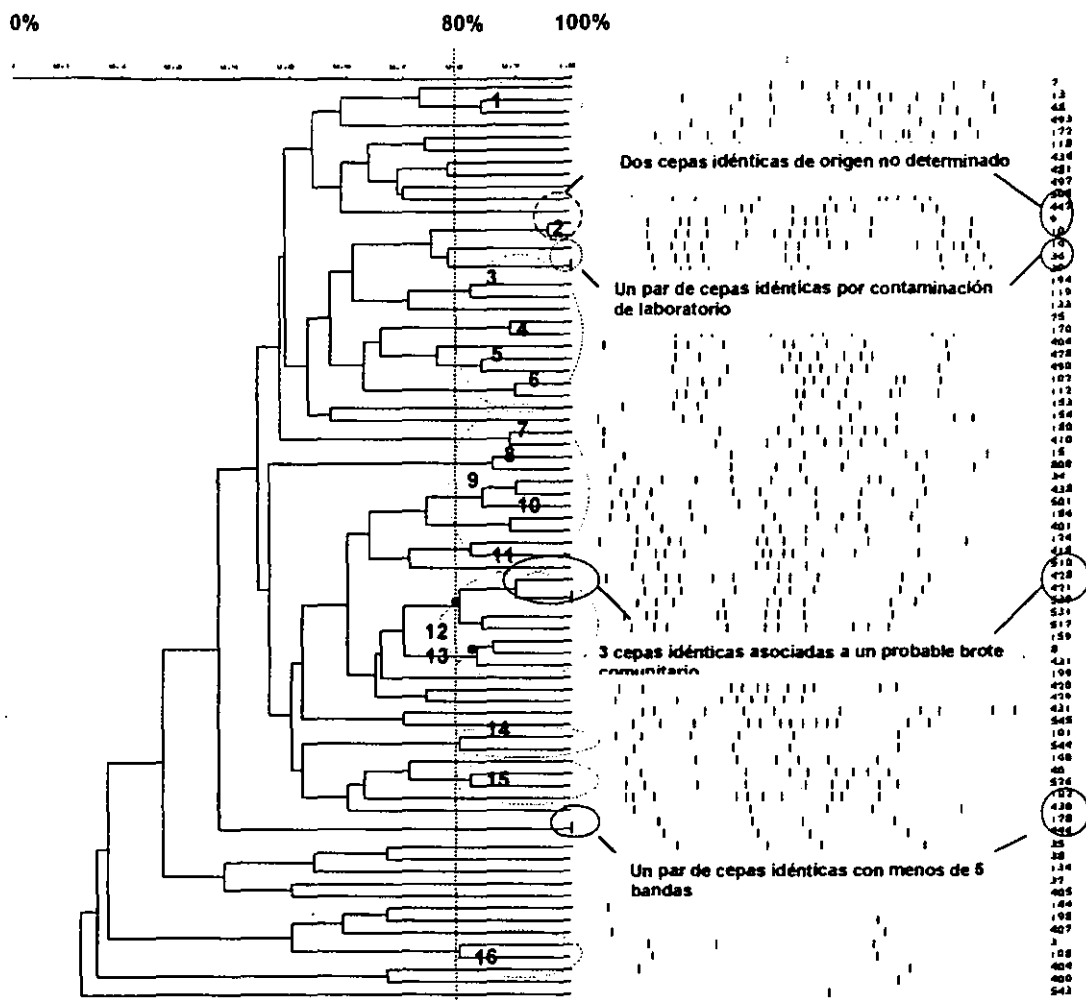


Fig. 9. Dendrograma de 75 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con y sin infección por VIH. Se observan 37 cepas en 16 grupos (señalados con números arábigos) con más de 80% de similitud, probablemente debidas a infección exógena reciente. Se observan también cuatro grupos de cepas que cumplen el criterio de "cepas idénticas". El primero está formado por las cepas 9 y 10, de las cuales la primera correspondió a un paciente con infección por VIH. El origen de este grupo no pudo establecerse por falta de información epidemiológica. El segundo grupo está constituido por las cepas 36 y 39 y fueron idénticas por contaminación de DNA en la UIMEIP. El tercer grupo con las cepas 539, 428 y 421 correspondió a un probable brote epidémico comunitario. La cepa 539 corresponde a un paciente con infección por VIH. El último grupo formado por las cepas 173 y 446 fue eliminado del análisis por tener menos de 5 bandas.

### OBJETIVO 3

#### Frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia en pacientes con infección por VIH

Se estudiaron 31 cepas de 31 pacientes con infección por VIH, 26 fueron hombres (83.8%) y 5 mujeres (16.1%) con una mediana de edad de 37 años (24-60 años), promedio de linfocitos CD4 de 124.8 células/mm<sup>3</sup> (7-775) y 89.6% (26/29) de los pacientes se encontraban en etapa avanzada o SIDA (etapa clínica C3). Tres de los pacientes (9.6%) presentaron TB ganglionar, dos (6.4%) TB diseminada y los restantes 26 (83.8%) TB pulmonar.

Diez cepas fueron resistentes por lo menos a un medicamento (tasa de resistencia global 32.2%). De los 31 pacientes 6 habían padecido TB y habían recibido tratamiento, de estos, dos tenían cepas resistentes por lo menos a un medicamento, por lo que la resistencia secundaria fue de 33.3%. De los 25 pacientes que no tenían antecedente de haber recibido tratamiento antituberculoso 8 presentaron cepas resistentes, por lo que la resistencia primaria fue de 32%. Dos de las 31 cepas fueron multiresistentes (6.4%).

**Tabla 1. Frecuencia de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia de 31 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con infección por VIH**

TIPO DE RESISTENCIA	NUMERO DE CEPAS	PORCENTAJE
Resistencia General	10/31	32.2
Resistencia Primaria	8/25	32
Resistencia Secundaria	2/6	33.3
Multiresistencia	2/31	6.4

### OBJETIVO 4

#### Factores de riesgo para multiresistencia

Se estudiaron 118 cepas procedentes del mismo número de pacientes, de las cuales 33 fueron casos y 85 controles.

En el análisis bivariado la fuerza de asociación entre multiresistencia y antecedente de tratamiento tuvo una razón de momios (RM) de 14.77 (IC 95% 5.1 - 44.1,  $p < 0.05$ ). De los tres factores que se evaluaron exploratoriamente, sólo la DMII alcanzó una RM mayor a 2 (IC 95% 0.9 - 5.6), pero en el intervalo de confianza esta incluido el 1 y por tanto el valor de  $p$  no fue significativo. La RM para alcoholismo fue de 1 (IC 95% 0.3 - 2.9) y la de infección por VIH inferior a 1 (IC 95% 0.02 - 0.59) con un valor de  $p < 0.05$ .

Por otra parte, al realizar el análisis estratificado y ajustar la RM que se obtuvo entre antecedente de tratamiento y multiresistencia con cada una de las otras tres variables (DM II, alcoholismo e infección por VIH), se observó que DM II e infección por VIH fueron variables confusoras; es decir, modificaron la RM de manera significativa, en ambos casos disminuyéndola. Dicho de otra forma, la fuerza de asociación entre tratamiento previo y

multirresistencia disminuyó significativamente si el paciente era además diabético o tenía infección por VIH. (Tabla No. 3)

Sin embargo, en el análisis multivariado a través de un modelo de regresión logística, sólo el antecedente de tratamiento persistió estar significativamente asociado a multirresistencia, con una RM de 12.28 (IC 95% 4.45 – 33.93). La RM de DM II disminuyó a 1.23 y la de alcoholismo a menos de 1, sin embargo, en el caso del alcoholismo no se pudo concluir que sea factor protector contra resistencia pues el intervalo de confianza incluyó al 1; por otra parte la RM de infección por VIH, aunque persistió por debajo de 1, aumentó casi el doble, de 0.12 a 0.22 y su intervalo de confianza también incluyó al 1, por lo que tampoco se pudo concluir que fuera factor protector contra multirresistencia. (Tabla No. 3)

**Tabla 2. Análisis bivariado entre multirresistencia y 4 diferentes probables factores de riesgo**

FACTOR DE RIESGO	MULTIRRESISTENCIA SI NO	RM*	IC <sub>95</sub>	Chi <sup>2</sup> **	p
Alcoholismo	SI 8/20 NO 25/65	1.04	0.36 – 2.91	0.03	0.87
DM II	SI 15/23 NO 18/62	2.25	0.9 – 5.63	2.89	0.08
Infección por VIH	SI 2/29 NO 31/56	0.12	0.02 – 0.59	8.27	<0.05
Tratamiento previo	SI 24/13 No 9/72	14.7	5.11 – 44.19	33.81	<0.05

\* Razón de Momios

\*\* Chi<sup>2</sup> con corrección de Yates

**Tabla 3. Análisis estratificado entre multirresistencia y tratamiento previo, ajustado por DM II, alcoholismo e infección por VIH.**

FUERZA DE ASOCIACION E IC 95%	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD	VARIABLE CONFUSORA
RM cruda	14.7 (5.11 – 44.19)	---
RM ajustada por DMII	13.07 (4.9 – 34.3)	0.11
RM ajustada por alcoholismo	13.28 (5.05 – 34.9)	0.09
RM ajustada por infección por VIH	12.71 (4.71 – 34.27)	0.13

**Tabla 4. Análisis multivariado a través del modelo "backward" (quitando variables) de regresión logística**

VARIABLES	OR	IC 95%	p
Tratamiento previo	12.28	4.45 – 33.93	< 0.05
DM II	1.23	0.42 – 3.62	0.69
Alcoholismo	0.61	0.18 – 1.98	0.41
Infección por VIH	0.22	0.04 – 1.19	0.07

## 11. DISCUSION

La TB es un problema de salud pública mundial <sup>1</sup> que presenta múltiples aspectos, de los cuales su asociación con el VIH, la aparición de cepas multirresistentes y su transmisión nosocomial, sobresalen por el impacto que han tenido sobre la mortalidad y el control de la enfermedad. A pesar de la magnitud del problema en nuestro país, donde se diagnostican 47 casos nuevos y mueren 11 personas diariamente <sup>6</sup>, la información publicada en los últimos años con relación a transmisión nosocomial, resistencia a los antibióticos y factores de riesgo es escasa o nula. De igual forma, tampoco existen publicaciones nacionales donde se haya utilizado el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción o RFLP (utilizado desde el inicio de la década y actualmente el estándar de oro a nivel internacional para el estudio epidemiológico de la TB) <sup>11, 48, 49, 58</sup> que ayuden al mejor entendimiento de los mecanismos de transmisión de la TB y a su control. En países no desarrollados donde la incidencia de TB es mayor, se han identificado y sugerido tres principales áreas de investigación para el uso del RFLP: transmisión comunitaria, transmisión nosocomial y TB relacionada a infección por VIH. <sup>50</sup>

El HI, CMR por ser un centro de referencia infectológico dentro del IMSS, tiene una elevada prevalencia de infección por VIH y TB. A pesar de lo anterior, se desconocen aspectos fundamentales como la frecuencia de resistencia de *M. tuberculosis* a antituberculosos primarios y factores de riesgo asociados a resistencia; además, debido a la falta de un programa para el control de la TB, se desconoce también si existen casos de TB transmitida intrahospitalariamente. Considerando que estos aspectos básicos son algunos de los más importantes en la toma de decisiones para el control de la enfermedad, se realizó el presente trabajo con el objetivo final de determinar algunas de las características y necesidades específicas del HI, CMR, que puedan ser útiles en la elaboración de un programa de control de la TB. Es decir, la aplicabilidad de estos resultados es local, con una limitada validez externa, considerando que las muestras de los tres primeros objetivos fueron muy seleccionadas.

**Tabla 4. Análisis multivariado a través del modelo "backward" (quitando variables) de regresión logística**

VARIABLES	OR	IC 95%	p
Tratamiento previo	12.28	4.45 – 33.93	< 0.05
DM II	1.23	0.42 – 3.62	0.69
Alcoholismo	0.61	0.18 – 1.98	0.41
Infección por VIH	0.22	0.04 – 1.19	0.07

## 11. DISCUSION

La TB es un problema de salud pública mundial <sup>1</sup> que presenta múltiples aspectos, de los cuales su asociación con el VIH, la aparición de cepas multirresistentes y su transmisión nosocomial, sobresalen por el impacto que han tenido sobre la mortalidad y el control de la enfermedad. A pesar de la magnitud del problema en nuestro país, donde se diagnostican 47 casos nuevos y mueren 11 personas diariamente <sup>6</sup>, la información publicada en los últimos años con relación a transmisión nosocomial, resistencia a los antibióticos y factores de riesgo es escasa o nula. De igual forma, tampoco existen publicaciones nacionales donde se haya utilizado el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción o RFLP (utilizado desde el inicio de la década y actualmente el estándar de oro a nivel internacional para el estudio epidemiológico de la TB) <sup>11, 48, 49, 58</sup> que ayuden al mejor entendimiento de los mecanismos de transmisión de la TB y a su control. En países no desarrollados donde la incidencia de TB es mayor, se han identificado y sugerido tres principales áreas de investigación para el uso del RFLP: transmisión comunitaria, transmisión nosocomial y TB relacionada a infección por VIH. <sup>50</sup>

El HI, CMR por ser un centro de referencia infectológico dentro del IMSS, tiene una elevada prevalencia de infección por VIH y TB. A pesar de lo anterior, se desconocen aspectos fundamentales como la frecuencia de resistencia de *M. tuberculosis* a antituberculosos primarios y factores de riesgo asociados a resistencia; además, debido a la falta de un programa para el control de la TB, se desconoce también si existen casos de TB transmitida intrahospitalariamente. Considerando que estos aspectos básicos son algunos de los más importantes en la toma de decisiones para el control de la enfermedad, se realizó el presente trabajo con el objetivo final de determinar algunas de las características y necesidades específicas del HI, CMR, que puedan ser útiles en la elaboración de un programa de control de la TB. Es decir, la aplicabilidad de estos resultados es local, con una limitada validez externa, considerando que las muestras de los tres primeros objetivos fueron muy seleccionadas.

El análisis por RFLP de 15 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con infección por VIH no demostró la presencia de algún brote epidémico nosocomial, pero sí la presencia de dos grupos de cepas, 5 en total, con patrones de RFLP relacionados que indican muy probablemente casos de infección exógena por cepas que se han diseminado recientemente en la población. Las 10 cepas restantes, debido a sus patrones de RFLP no relacionados, únicos o diferentes, probablemente correspondan a casos de TB por reactivación de infecciones antiguas. Es decir, 33.3% de los casos estudiados probablemente se debieron a reinfecciones exógenas y 66.6% a reactivación de infecciones latentes. Al comparar nuestros resultados con los datos obtenidos por el Dr. Alland y cols.<sup>11</sup> en Nueva York, quien utilizó la misma técnica de RFLP, en un grupo de pacientes con infección por VIH y TB, encontró que el 57% fueron debidos a reinfecciones exógenas y 43% a reactivación de infecciones antiguas, no hubo diferencia significativa según se puede observar en la siguiente tabla.

PROBABLE ORIGEN	HI, CMR	Nueva York <sup>11</sup>	Chi <sup>2*</sup>	p
Infección exógena	5/15 33.3 %	57 %	1.21	0.27
Reactivación infección antigua	10/15 66.6 %	43 %		

\* Bondad de Ajuste

Para el grupo total de cepas, de pacientes con y sin infección por VIH, el porcentaje de casos debidos a probable infección exógena reciente se incrementó a 49% y los casos debidos probablemente a reactivación de infecciones antiguas disminuyó a 51%. Es decir, aproximadamente la mitad de los casos de TB atendidos en el HI, CMR, se deben probablemente a infecciones exógenas recientes, lo cual refleja una elevada transmisión de la enfermedad y deficiencias en el programa de tratamiento de casos y estudio de contactos en niveles primarios y secundarios del IMSS. Lo anterior sugiere, que los programas de control de la TB, por lo menos en los hospitales afluentes del HI, CMR, deben enfocarse a la identificación de grupos con alto riesgo de transmisión, a la detección temprana de casos y a su tratamiento hasta la curación para cortar la cadena de transmisión de la enfermedad. En el caso de poblaciones con TB por reactivación de infecciones antiguas, será necesario implementar programas de detección con PPD y aplicación de tratamientos profilácticos.

En este punto es importante recordar que como el RFLP se aplica a grupos de cepas, los resultados y conclusiones obtenidas dependen del contexto epidemiológico de ese grupo de cepas en particular; por ejemplo, en el caso de las cepas con RFLPs únicos o diferentes concluimos que, "probablemente" se trate de casos por reactivación de infecciones antiguas, ya que podría suceder que alguna(s) de estas cepas sea(n) parte de algún grupo de casos por infección exógena reciente o incluso parte de algún brote epidémico no detectado en el presente trabajo. Esta incertidumbre siempre va a existir, independientemente del tamaño de muestra; sin embargo, debido a que generalmente los principales objetivos de este tipo de estudios pretenden determinar la presencia de un brote epidémico y rastrear su origen, y/o la detección de grupos de cepas transmitidas recientemente, donde radica el poder de la técnica, el efecto de esta incertidumbre sobre los resultados o toma de decisiones consideramos que no es significativo.

Con este tipo de información, los programas locales para el control de la enfermedad serán más eficientes, considerando que están elaborados con base en las características y necesidades particulares de cada comunidad.

Por otra parte, también fue posible evidenciar la probabilidad de un brote epidémico comunitario que no se había sospechado y que involucró 3 pacientes de los cuales uno tenía infección por VIH. Cuando dos o más cepas son idénticas por RFLP existen dos posibilidades: la primera, que sean idénticas debidas al azar; sin embargo, esta posibilidad es del orden de 1 en 1 millón<sup>(51,52,53)</sup>, motivo por el cual esta posibilidad es muy remota; la segunda explicación es que estas cepas idénticas realmente sean la misma cepa, lo cual a su vez tiene dos posibilidades: primero, que las muestras clínicas (expectoraciones, cultivos o DNA) se hayan contaminado (lo cual fue descartado) o que los pacientes involucrados se hayan infectados entre sí, ya sea en el ámbito hospitalario (lo que también se descartó) o en su comunidad. Por lo anterior pensamos que estas 3 cepas idénticas muy probablemente son parte de un brote epidémico comunitario, sin embargo, se debe esperar la conclusión del trabajo de campo para confirmarlo.

Se tiene información epidemiológica parcial de estos tres pacientes; sin embargo, dado que no fue uno de los objetivos del presente trabajo, está pendiente el trabajo de campo con visitas domiciliarias para interrogar directamente a los pacientes y familiares con el objeto de identificar otros enfermos involucrados, intentar determinar los factores que facilitaron la transmisión de la micobacteria entre los mismos, rastrear el origen del brote epidémico y detectar los contactos para su estudio y manejo. Los objetivos de esta segunda etapa, una vez detectado el brote epidémico, serían básicamente dos: el primero, tratar oportuna y adecuadamente a los involucrados para curar a los enfermos, evitar que otros enfermen y así romper la cadena de transmisión, y segundo, conocer los factores que facilitaron la transmisión de la enfermedad para que, al incidir sobre estos, evitar que otros brotes sucedan. A más largo plazo, con la experiencia y conocimientos generados por este tipo de trabajos, se podrá mejorar el control de la enfermedad, al desarrollar programas con base en las necesidades particulares de cada comunidad.

Con base en lo anterior, el RFLP mostró su utilidad en el estudio epidemiológico de la TB al diferenciar principalmente casos de infección exógena y al detectar un probable brote epidémico comunitario, que de otra forma hubiese pasado desapercibido. Como ya se comentó, una vez detectado el brote, es posible rastrear y localizar el origen del mismo, reconocer los factores que lo favorecieron y posteriormente implementar medidas que eviten la aparición de nuevos brotes.

De las cepas disponibles de pacientes con VIH, en 16 no se pudieron realizar los RFLPs; en algunos casos por la imposibilidad de recultivar a la micobacteria para extracción de DNA, y en otros, por obtención de DNA de mala calidad (degradado) o insuficiente. La mayor parte de las pérdidas sucedieron durante el proceso de aprendizaje y estandarización de la técnica. También se debe recordar que la técnica exige grandes cantidades de DNA de buena calidad y que es necesario hacer todos los RFLPs por duplicado. Por otra parte, para comprobar nuestra hipótesis se necesitaban por lo menos 8 cepas, y por tanto no era necesario analizar las 31 cepas estudiadas en otro objetivo. El aumentar el tamaño de muestra podría aumentar la posibilidad de encontrar casos de TB nosocomial, sin embargo, como la aparición de brotes epidémicos depende en mayor medida de factores propios del paciente, de los contactos y principalmente de factores ambientales, es la vigilancia epidemiológica estricta y continua, la que permite detectar más eficientemente este tipo de brotes epidémicos.

En una revisión bibliográfica de la literatura nacional, que comprendió de 1992 a 1998 se localizaron 73 trabajos relacionados a TB pero ninguno donde se utilizara el RFLP, por lo



que nuestros resultados constituyen el primer trabajo al respecto en el ámbito nacional y hasta donde sabemos, el cuarto en América Latina.<sup>35, 45, 60</sup>

En dicha revisión, además se encontró que sólo 3 trabajos estudiaron la resistencia de *M. tuberculosis*, y de estos, sólo el del Dr. Sifuentes del INNSZ hace referencia a 6 pacientes con infección por VIH, de los cuales dos tenían cepas resistentes.<sup>19</sup> Por tanto, nuestro trabajo es el primer estudio de prevalencia de resistencia primaria, secundaria y multiresistencia en pacientes con infección por VIH/SIDA en el país.

Al respecto, en esta muestra muy seleccionada de pacientes con infección por VIH, es particularmente grave que una de cada 3 cepas (32.2%) sea resistente por lo menos a un medicamento, pues si se continúa tratando a estos pacientes con el esquema tradicional de 3 medicamentos (isoniacida, rifampicina y pirazinamida ó RIFATER) la posibilidad de falla al tratamiento es elevada con el consecuente aumento en la mortalidad, incremento del número de casos crónico bacilíferos y la generación de mayor resistencia secundaria.

La resistencia primaria resultó ser superior a lo hipotetizado (32% vs 27%) y casi el doble de lo referido por el Dr. Sifuentes y cols. en población VIH negativa (17%).<sup>19</sup> Esto probablemente se deba a: 1) desarrollo de resistencia debido a tratamientos profilácticos o a la selección que ejercen los tratamientos empíricos comúnmente utilizados en este tipo de pacientes, 2) que parte de estos casos realmente se deban a reinfecciones exógenas por cepas resistentes que no fueron detectados en este estudio, o 3) menos probable, que la frecuencia de mutaciones espontáneas generadoras de cepas resistentes sea mayor en este tipo de pacientes. Contrariamente, la resistencia secundaria y multiresistencia resultaron ser inferiores a lo hipotetizado, lo cual creemos que probablemente se debió a que la mayor parte de los casos fueron por reactivación de infecciones antiguas o secundarias a infecciones recientes por cepas sensibles, como se observó en los resultados del objetivo número 1.

Para valorar el efecto que tuvo sobre la prevalencia de resistencia, eliminamos del análisis las 5 cepas relacionadas pansensibles debidas a infección exógena reciente, con lo que se incrementaron las frecuencias de resistencia global, primaria y multiresistencia, según se muestra en la siguiente tabla:

TIPO DE RESISTENCIA	RESULTADOS INICIALES		ELIMINANDO 5 CEPAS RELACIONADAS PANSENSIBLES	
Resistencia Global	10/31	32.2 %	10/26	38.4 %
Resistencia Primaria	8/25	32.0 %	8/20	40.0 %
Resistencia Secundaria	2/6	33.3 %	2/6	33.3 %
Multiresistencia	2/31	6.4 %	2/26	7.7 %

Con esta lógica, es probable que de existir más casos de cepas relacionadas por reinfecciones recientes o idénticas debido algún brote epidémico por cepas pansensibles, los porcentajes de resistencia podrían ser mayores.

De forma paralela al presente trabajo y como parte del trabajo colaborativo entre la UIMEIP y el HI, CMR, durante el mismo periodo también se determinaron las sensibilidades a los 4 antituberculosos primarios en 87 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes sin infección por VIH.

La siguiente tabla muestra de forma comparativa las frecuencias de resistencia en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con y sin infección por VIH del HI, CMR.

TIPO RESISTENCIA	DE	CON INFECCION POR VIH	SIN INFECCION POR VIH	Chi <sup>2</sup>	p	CON Y SIN INFECCION POR VIH
Global		10/31 32.2 %	42/87 48.2 %	1.7	0.18	52/118 44.0 %
Primaria		8/25 32.0 %	7/48 14.5 %	2.08	0.14	15/73 20.5 %
Secundaria		2/6 33.3 %	35/39 89.7 %	7.79	0.005*	37/45 82.2 %
Multirresistencia		2/31 6.4 %	31/87 35.6 %	8.27	0.004	33/118 27.9 %

\* Prueba Exacta de Fisher

Como puede observarse, las diferencias observadas en los casos de resistencia global y resistencia primaria en pacientes con y sin infección por VIH, no fueron significativas, pero con relación a resistencia secundaria y multirresistencia los porcentajes fueron significativamente mayores en los pacientes sin infección por VIH. Una vez más, consideramos que esto fue debido al efecto "diluyente" que tuvo el que una parte de las cepas de pacientes con infección por VIH fueran debidas muy probablemente a reactivación de infecciones antiguas y otra parte secundaria a infección exógena por cepas pansensibles.

Al comparar las frecuencias de resistencia obtenidas en las 118 cepas del HI, CMR con lo reportado durante esta década por tres centros de referencia nacionales<sup>19,36,37</sup>, observamos que los porcentajes de resistencia de *M. tuberculosis* en el HI, CMR, son los más altos reportados en el ámbito nacional hasta la actualidad.

TIPO DE RESISTENCIA	INNSZ* <sup>19</sup> 84 cepas 1991-93	INER** <sup>36</sup> 232 cepas 1990-93	INDRE*** <sup>37</sup> 1811 cepas 1989-1993	HI, CMR 118 CEPAS 1997-98
Global	29.7 %	—	—	44.0 %
Primaria	17 %	—	3 %	20.5 %
Secundaria	46 %	78.9 %	72 %	82.2 %
Multirresistencia	19 %	—	—	27.9 %

\* Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

\*\* Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

\*\*\* Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica

Lo cual podría deberse a un incremento real en las frecuencias de resistencia de *M. tuberculosis* en la población mexicana y evidenciado por la diferencia temporal entre los diferentes trabajos. Existe información nacional que apoya la hipótesis anterior; por ejemplo, la resistencia primaria a isoniacida en 1980 era de 1.8%<sup>19</sup>, en 1995 de 9%<sup>19</sup> y ahora en nuestro estudio de 12.6 %. Además en los resultados del INDRE<sup>37</sup> ya se advertía de un incremento en la frecuencia de resistencia secundaria de 59.4% en 1989 a 72% en 1993.

Con la limitada información actual, incluyendo nuestros resultados, no podemos concluir al respecto. Es necesario realizar periódicamente este tipo de trabajos, para valorar el cambio de las frecuencias de resistencia con respeto al tiempo.

Independientemente de cual sea la explicación para estos resultados, y considerando que la resistencia secundaria provoca la acumulación de casos crónicos y es un indicador de la efectividad de los tratamientos administrados, estos resultados reflejan inicialmente deficiencias en el manejo y control de la enfermedad en niveles primarios y secundarios del IMSS, y en segundo lugar, indican el tipo de cepa que afectará próximamente a la comunidad. Es decir, las frecuencias de resistencia podrían ser mayores debido a que los pacientes con cepas resistentes diseminan más eficientemente la enfermedad al permanecer bacilíferos durante más tiempo debido a la falta de respuesta al tratamiento convencional. Es decir, si se continúa tratando a estos pacientes con el esquema tradicional de 3 medicamentos sugerido por la Norma Oficial Mexicana y no con 4 medicamentos, como se sugiere para países con resistencia primaria a isoniacida mayor o igual a 4%<sup>61</sup>, la posibilidad de falla al tratamiento es mayor, con el consecuente aumento en la mortalidad y la generación de mayor resistencia secundaria.

De igual forma, las frecuencias de resistencia en esta muestra de pacientes con y sin infección por VIH del HI, CMR, son superiores de forma significativa, exceptuando resistencia primaria, a los resultados preliminares recientemente obtenidos en el estudio colaborativo con base poblacional, actualmente en curso, entre la Secretaría de Salud de nuestro país y los CDC en E.U.<sup>62</sup>

TIPO DE RESISTENCIA	PACIENTES CON Y SIN INFECCION POR VIH 118 cepas HI, CMR		ESTUDIO POBLACIONAL SSA** Y CDC*** 440 cepas		Chi <sup>2</sup> p
Global	52/118	44.0 %	113/440	26 %	7.4 <0.05
Primaria	15/73	20.5 %	38/309	12 %	1.25 0.26
Secundaria	37/45	82.2 %	49/98	50 %	8.45 <0.05
Multiresistencia	33/118	27.9 %	28/440	6 %	18.8 <0.05

\* Bondad de ajuste

\*\* Secretaría de Salud

\*\*\* Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, EU

Con relación a los factores de riesgo se encontró que el antecedente de tratamiento antituberculoso conlleva 12 veces más probabilidades de asociarse a multiresistencia que cuando no existe dicho antecedente, lo cual es mayor que lo reportado por el Dr. Sifuentes en el INNSZ de 8.93 (IC<sub>95</sub> 2.08 – 43.95, p <0.05)<sup>19</sup> y podría significar que un paciente tratado por TB en niveles secundarios y primarios del IMSS tiene más probabilidades de no curarse y desarrollar TB por una cepa multiresistente, probablemente debido a tratamientos deficientes, ya sea por mala prescripción, falta de apego al tratamiento o de supervisión; lo cual concuerda con los elevados porcentajes de resistencia encontrados en el HI, CMR. Por otra parte, las cepas resistentes y multiresistentes de esta muestra de pacientes derechohabientes del IMSS, muy probablemente se están diseminando en la población general ya que estos pacientes permanecen bacilíferos durante más tiempo debido a la falta

de respuesta al tratamiento convencional y a la falta de programas de estudio de contactos y profilaxis adecuados; por lo tanto, es muy probable que en un futuro, los porcentajes de resistencia, incluyendo multirresistencia, serán mayores.

Por otra parte, ninguno de los otros tres factores (DMII, alcoholismo e infección por VIH) que se estudiaron exploratoriamente, resultó estar asociado a multirresistencia. Tenemos varias explicaciones para ello; en el caso de DMII y alcoholismo, puede atribuirse a un tamaño de muestra insuficiente, pues para DMII se requerían 256 pacientes y 1422 para alcoholismo (considerando un control por cada caso). Además, es probable que se haya sobrestimado el número de pacientes alcohólicos (debido a la definición operacional) y con ello se haya "diluido" el número de casos "alcohólicos multirresistentes". En el caso de infección por VIH pensamos que la falta de asociación se debió básicamente a que la mayoría fueron casos de reactivación de infecciones latentes (como se pudo observar en el análisis por RFLP), es decir se trató de cepas silvestres en las cuales la frecuencia de multirresistencia es mucho menor y en menor grado, como en el caso de DMII y alcoholismo, a un tamaño de muestra insuficiente, pues se requerían de 36 casos y 36 controles.

## 12. CONCLUSIONES

- 1- No se detectó ningún brote de TB nosocomial en la muestra estudiada
- 2- Se detectó un probable brote epidémico de TB de origen comunitario en el que estuvo involucrado un paciente con infección por VIH. Está pendiente tratar de identificar otros pacientes involucrados y los mecanismos o factores por los cuales dicha cepa de *M. tuberculosis* se transmitió entre ellos.
- 3- La contribución de casos debidos a probable infección exógena reciente en la muestra estudiada de pacientes con y sin infección por VIH es elevada, lo que refleja una transmisión importante de la enfermedad en la comunidad afluente al HI, CMR. Por lo tanto, los programas de control de la TB locales, probablemente deben enfocarse a la detección de grupos de alto riesgo de transmisión, a la identificación temprana de casos, y su tratamiento hasta la curación.
- 4- En la muestra muy seleccionada de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH, los porcentajes de resistencia no fueron superiores a los de otra muestra de pacientes sin infección por VIH del HI, CMR. Los porcentajes de resistencia en la muestra de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con y sin infección por VIH del HI, CMR fueron superiores a los porcentajes de resistencia en la población general reportados por la Secretaria de Salud y los CDC de EU.
- 5- Existe una gran asociación entre antecedente de tratamiento y TB con cepas multirresistentes. Se requiere mayor tamaño de muestra para comprobar la probable falta de asociación entre multirresistencia y DMII, infección por VIH y alcoholismo.
- 6- Estos resultados sólo son aplicables a una parte de la población de pacientes del HI, CMR.

de respuesta al tratamiento convencional y a la falta de programas de estudio de contactos y profilaxis adecuados; por lo tanto, es muy probable que en un futuro, los porcentajes de resistencia, incluyendo multirresistencia, serán mayores.

Por otra parte, ninguno de los otros tres factores (DMII, alcoholismo e infección por VIH) que se estudiaron exploratoriamente, resultó estar asociado a multirresistencia. Tenemos varias explicaciones para ello; en el caso de DMII y alcoholismo, puede atribuirse a un tamaño de muestra insuficiente, pues para DMII se requerían 256 pacientes y 1422 para alcoholismo (considerando un control por cada caso). Además, es probable que se haya sobrestimado el número de pacientes alcohólicos (debido a la definición operacional) y con ello se haya "diluido" el número de casos "alcohólicos multirresistentes". En el caso de infección por VIH pensamos que la falta de asociación se debió básicamente a que la mayoría fueron casos de reactivación de infecciones latentes (como se pudo observar en el análisis por RFLP), es decir se trató de cepas silvestres en las cuales la frecuencia de multirresistencia es mucho menor y en menor grado, como en el caso de DMII y alcoholismo, a un tamaño de muestra insuficiente, pues se requerían de 36 casos y 36 controles.

## 12. CONCLUSIONES

- 1- No se detectó ningún brote de TB nosocomial en la muestra estudiada
- 2- Se detectó un probable brote epidémico de TB de origen comunitario en el que estuvo involucrado un paciente con infección por VIH. Está pendiente tratar de identificar otros pacientes involucrados y los mecanismos o factores por los cuales dicha cepa de *M. tuberculosis* se transmitió entre ellos.
- 3- La contribución de casos debidos a probable infección exógena reciente en la muestra estudiada de pacientes con y sin infección por VIH es elevada, lo que refleja una transmisión importante de la enfermedad en la comunidad afluente al HI, CMR. Por lo tanto, los programas de control de la TB locales, probablemente deben enfocarse a la detección de grupos de alto riesgo de transmisión, a la identificación temprana de casos, y su tratamiento hasta la curación.
- 4- En la muestra muy seleccionada de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección por VIH, los porcentajes de resistencia no fueron superiores a los de otra muestra de pacientes sin infección por VIH del HI, CMR. Los porcentajes de resistencia en la muestra de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con y sin infección por VIH del HI, CMR fueron superiores a los porcentajes de resistencia en la población general reportados por la Secretaria de Salud y los CDC de EU.
- 5- Existe una gran asociación entre antecedente de tratamiento y TB con cepas multirresistentes. Se requiere mayor tamaño de muestra para comprobar la probable falta de asociación entre multirresistencia y DMII, infección por VIH y alcoholismo.
- 6- Estos resultados sólo son aplicables a una parte de la población de pacientes del HI, CMR.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- 1- World Health Organization. TB a global emergency. W.H.O. report on the TB epidemic. World Health Organization, 1994 Geneva
- 2- Snider DE, Raviglione M, Kochi A. Global Burden of Tuberculosis. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. Ed. Bloom BR. Washington DC: ASM Press 1994: 3-12
- 3- Hopewell PC. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management and control of tuberculosis. Clin Infect Dis 1992; 15:540-547
- 4- Goble M, Iseman M, Madsen L, Waite D, Ackerson L and Horsburgh R. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. N Engl J med 1993; 328:527-32
- 5- Shafer RW and Edlin BR. Tuberculosis in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus: Perspective on the Past Decade. Clin Infect Dis 1996; 22:683-704
- 6- Yáñez Velasco LB. Programa de Micobacterias. Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Unico de Información. 39 (14), semana 39, 1997
- 7- Manjarréz Morales EM, Escandón Romero C, Estrada Servín A y Escobedo de la Peña J. La Tuberculosis Pulmonar: un problema de salud no resuelto. Rev Méd IMSS (Méx.) 1992; 30: 363-368
- 8- Gómez Campos G., Villarreal Urenda C., Robles Romo M. y Cano Domínguez C. Hallazgos histopatológicos en 102 autopsias de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Rev Méd IMSS (Méx) 1992; 30:171-76
- 9- The use of preventive therapy for tuberculous infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee for Elimination of Tuberculosis. MMWR 1990; 39(RR-8):9-12
- 10-Screening for Tuberculosis and Tuberculous Infection in High-Risk Populations. Recommendations of the Advisory Committee for Elimination of Tuberculosis. MMWR 1990; 39(RR-8):1-7
- 11-Alland D, Kalkut GE, Moss AR et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. N Engl J Med 1994; 330:1710-1716
- 12-Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance. Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis. MMWR 1993; 42 (RR-7):1-8

- 13-Barnes P. The influence of epidemiologic factors on drug resistance rates in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:325-328
- 14-Ben-Dov I, Mason G. Drug-resistant tuberculosis in a southern California hospital:trends from 1969 to 1984. *Am Rev Respir Dis*.1987; 135:1307-10
- 15-Cole ST and Telenti A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 1995; 8,suppl. 20:701s-713s
- 16-Mahmoudi A and Iseman M. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. Common errors and their association with the acquisition of drug resistance. *JAMA* 1993; 270(1):65-68
- 17-Costello H, Caras G and Snider D. Drug resistance among previously treated tuberculosis patients, a brief report. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121:313-316
- 18-World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis drug resistance surveillance. *WHO/TB* 1997; 229
- 19-Sifuentes-Osornio J, Ponce de León LA, Camacho-Mezquita FE et al. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. Características clínicas y factores de riesgo. *Rev Invest Clin* 1995; 47:273-281
- 20-Coronado VG, Beck-Sague CM, Hutton MD, Davis BJ, Nicholas P, Villarreal C, et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with HIV infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis*. 1993;168:1052-5
- 21-Green GM, Kass EH. The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung. *J Exp Med*. 1964;119:167-76
- 22-MacGregor RR. Alcohol and immune defense. *JAMA*. 1986;256:1474-9
- 23-Schopf RE, Trompeter M, Bork K, et'al. Effects of ethanol and acetaldehyde on phagocytic function. *Arch Dermatol Rev*. 1985;277:131-7
- 24-Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, et al. The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. *J Infect Dis*. 1989;160:422-9
- 25-Kaye K and Frieden TR. Tuberculosis control: the relevance of classic principles in an era of acquired immunodeficiency syndrome and multidrug resistance. *Epidemiol Rev* 1996; 18(1): 52-63
- 26-Davis L, Beck JM, Shellito J. Update: HIV infection and pulmonary host defenses. *Semin Respir Infect*. 1993; 8:75-85

- 27-Brudney K and Dobkin J. Resurgent tuberculosis in New York City. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:745-749
- 28-Snider DE, Kelly GD, Cauthen GM, Thompson NJ, Kilburn JO. Infection and disease among contacts of TB cases with drug-resistant and drug-susceptible bacilli. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:125
- 29-Beck-Sague C, Dooley S, Hutton M et al. Hospital outbreak of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections: factors in transmission to staff and HIV-infected patients. *JAMA* 1992; 268:1280-1286
- 30-Pearson ML, Jereb JA, Frieden TR et al. Nosocomial transmission of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a risk to patients and health care workers. *Ann Intern Med* 1992; 117: 191-196
- 31-Jereb JA, Burwen BR, Dooley SW et al. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 1993; 168: 1219-1224
- 32-Tabet SR, Goldbaum GM, Hooton TM, Eisenach KD, Cave MD, Nolan CM. Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994; 169:189-192
- 33-Luby S, Carmichael S, Shaw G et al. A nosocomial outbreak of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Fam Pract* 1994;39 (1) :21-25
- 34-Shafer RW, Small PM, Larkin Ch, Singh SP, Kelly P, Sierra MF, Schoolnik G and Chirgwin KD. Temporal Trends and Transmission Patterns during the Emergence of Multidrug-Resistant Tuberculosis in New York City: A Molecular Epidemiologic Assessment. *J Infect Dis.* 1995;171:170-76
- 35-Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, Dambrosi A, Lopez B, Isola N and N de Kantor I. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis* 1997; 176:637-42
- 36-Olvera Castillo R, Pérez González LE. Resistencia secundaria en tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* 1993,6(4): 185-190
- 37-García-García M de L y cols. Tuberculosis y SIDA en México. *Salud Publica Mex* 1995;37; 539-548
- 38-Dooley SW, Jarvis WR, Marlone WJ, Snider DE. Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 1992;117:257-259
- 39-Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis to health care workers and HIV infected patients in an urban hospital - Florida. *MMWR* 1990;39 (40) 718-722



- 40-Wenger P, Otten J, Breeden A, Orfas D, Beck-Sague C and Jarvis W. Control of nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among healthcare workers and HIV-infected patients. *Lancet* 1995;345:235-40
- 41-Edlin B, Tokars J, Grieco M, Crawford J, Williams J, Sordillo E, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326:1514-21
- 42-Dooley SW, Castro KG, Hutton MD, Mullan RJ, Polder JA and Snider DE. Guidelines for preventing the transmission of tuberculosis in health-care settings, with special focus on HIV-related issues. *MMWR*. 1990; 39 (RR-17): 1-29
- 43-Bendall RP, Drobniowski FA, Jayasena SD, Nye PM, Uttley AHC and Scott GM. Restriction fragment length polymorphism analysis rules out cross-infection among renal patients with tuberculosis. *J Hosp Infect* 1995;30:51-56
- 44-Niemann S, Rüscher-Gerdes S and Richter E. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (12): 3015-3020
- 45-Gómez Marin JE, Rigouts L, Villegas Londoño LE y Portaels F. Análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) y epidemiología de la tuberculosis. *Boletín Oficina Sanit Panam* 1995;119 (1):1-9
- 46-Yang ZH, De Haas PEW, Wachmann CH, Van Soolingen D, Van Embden JDA and Andersen AB. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol*, 1995;33:2077-2081
- 47-McGowan J E. Jr. Nosocomial Tuberculosis: New Progress in Control and Prevention. *Clin Infect Dis* 1995;21:489-505
- 48-David E. Hoffman. Clinical Implications of Basic Research. DNA on trial-The molecular basis of DNA fingerprinting. *N Engl J Med* 1995;332,8:534-535
- 49-Drobniowski F.A., Kent R.J, Stoker N.G. and Uttley A.H.C. Molecular biology in the diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Hosp Infect* 1994;28,249-263
- 50-Cohn DL, O'Brien R.J. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2(1):16-26
- 51-Thierry D, Cave MD., Eisenach KD y cols. Is6110, an Is-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:188-93

- 52-Van Embden JD, Cave M, Crawford J and cols. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31 (2):406-409
- 53-Hermans PW, Van Soolingen D, Dale JW, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1990; 28:2051-8
- 54-Daley CL, Small PM, Schechter GF, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1992; 326:231-5
- 55-Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous Detection and Strain differentiation on *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35(4):907-914
- 56-The use of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis for Epidemiologic Studies of Tuberculosis in Developing Countries. WHO, Geneva, 7-8 December 1994
- 57-Salman H. Siddiqi. BACTEC TB SYSTEM. Product and Procedure Manual January, 1989
- 58-Sepkowitz KA and Raffalli J. Tuberculosis at the end of the twentieth century. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13(11):902-907
- 59-Gel Manager, para Windows 95, Byosistemica. Manual de Usuario
- 60-Burger M, Raskin S, Brockelt SR, Amthor B, Geiss HK and Haas WH. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex culture isolates collected in Brazil and spotted onto filter paper. J Clin Microbiol 1998;36: 573-576
- 61-American Thoracic Society/CDC. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 1994;149:1359-74
- 62-Population-based survey for drug resistance of tuberculosis – Mexico, 1997. MMWR; 47(18): 371-375
- 63-Small PM, Shafer RW, Hopewell PC et al. Exogenous reinfection with multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. N Engl J Med 1993; 328:1137-1144

## 14. ANEXOS

### ANEXO 1

#### PROCEDIMIENTOS

##### 1. - IDENTIFICACIÓN DE *M. tuberculosis* (SISTEMA BACTEC 460)

Para el crecimiento e identificación de *M. tuberculosis* las muestras se resembraron e incubaron a 37°C en medio de agar Middlebrook 7H12, complementado con polimixina B, anfotericina B, ácido nalidixico, trimetropin y azocicina (Panta Becton & Dickinson) en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se midieron los índices de crecimiento en el sistema radiométrico automatizado BACTEC 460 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, USA), hasta lograr un índice de crecimiento de 50 a 100 en la escala del aparato. Para la identificación de *M. tuberculosis* se tomó 1 ml del cultivo de crecimiento y se mezcló con p-nitro-alfa-acetil amino-hidroxipropiofenona (NAP) el cual inhibe casi completamente las micobacterias que pertenecen al complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*), mientras que otras micobacterias muestran una ligera inhibición o no muestran ninguna. Al mismo tiempo se incubó un control y ambos frascos se incubaron a 37°C; los índices de crecimiento se compararon durante un mínimo de 4 días. Los valores diarios del índice de crecimiento del control continuaron aumentando. En el frasco de ensayo de NAP, la disminución o el aumento dependió de la especie de micobacteria presente. Una disminución o la no-variación de los valores del índice de crecimiento es indicativa de la presencia del complejo tuberculosis, mientras que un aumento de los índices de crecimiento indica la presencia de bacilos que no pertenecen al complejo.<sup>57</sup> Una vez identificados los cultivos con la prueba de NAP negativa, se transfirió una alícuota al medio de Lowenstein Jensen para su crecimiento y estos cultivos fueron posteriormente utilizados para la extracción de DNA.

##### 2. - MÉTODO DE BACTEC PARA SENSIBILIDAD A ANTITUBERCULOSOS DE PRIMERA LÍNEA

El análisis de la sensibilidad a drogas antituberculosas de primera línea se realizó con el método BACTEC 460 (Becton Dickinson, Diagnostic Instruments Systems) el cual utiliza medio de cultivo líquido y monitorea el crecimiento del bacilo radiométricamente. Se utiliza el kit SIRE que contiene soluciones concentradas de estreptomycin, isoniacida, rifampicina y etambutol que se diluyen con medio 12B a las siguientes concentraciones: estreptomycin 4 µg/ml, isoniacida 0.1 µg/ml, rifampicina 2 µg/ml y etambutol 7.5 µg/ml. Se considera como resistencia a uno o más de los fármacos cuando el 1% o más de la población de *M. tuberculosis* muestra crecimiento. La resistencia se determinó al comparar los índices de crecimiento de las cepas en los medios de cultivo 12B con respecto a la velocidad de crecimiento en cepas control de resistencia conocida. Todos los frascos en los que se detectaron índices de crecimiento mayores a los controles se cultivaron en agar sangre y agar chocolate durante 96 hrs para descartar casos de contaminación.<sup>57</sup>

##### 3. - ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

El manual donde se describe esta técnica fue preparado para el curso de entrenamiento sobre Inmunología que organizó la Organización Mundial de la Salud en Génova en 1994 con el objeto de que los resultados obtenidos en diferentes laboratorios fueran comparables.<sup>56</sup>

##### 4. - PURIFICACION DEL DNA DE *M. tuberculosis*

La extracción del DNA de *M. tuberculosis* se realizó por medio de rompimiento mecánico de la pared bacteriana con perlas de vidrio. Una asada de micobacterias se colocó en un tubo Eppendorf que contiene 300 µl de perlas de vidrio, 500 µl de buffer TE IX y 500 µl de fenol; el tubo se agita vigorosamente (vortex) y se centrifuga a máxima velocidad durante 5 minutos para recuperar la fase acuosa. A esta fase acuosa se le realiza una extracción con fenol-cloroformo (1:1) e inmediatamente después otra con cloroformo. Después de centrifugar por 10 min. se separó la fase acuosa y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol para precipitar los ácidos nucleicos. Las muestras se congelaron a -20°C y se centrifugaron nuevamente con lo que se obtuvo una

pastilla concentrada de ácidos nucleicos. Dicha pastilla, después de lavarse y resuspenderse en 50  $\mu$ l de buffer TE fue cuantificada por fluorometría (Fluoroskan Ascent, Labsystems) de acuerdo a una curva estándar de concentración conocida.

#### 5. - DIGESTION DEL DNA

La digestión o corte del DNA de *M. tuberculosis* se realizó con la enzima de restricción PVU II. Se utilizaron 100 ng de DNA para la digestión (aproximadamente 2.5  $\mu$ l de una concentración de 50 ng/ $\mu$ l de DNA) más 25  $\mu$ l de agua y 3.5  $\mu$ l de enzima (0.5  $\mu$ g/ml de enzima más 3  $\mu$ l de buffer M 3X) para un volumen total de la mezcla de reacción de 30.5  $\mu$ l. La mezcla de digestión se incubó a 37° C durante una hora en un termomixer (Eppendorf, USA).

#### 6. - ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% durante 16 hrs a 20 V y la tinción de las bandas de ácidos nucleicos se realizó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml. Posteriormente el gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Life Sciences, USA).

#### 7. - PREPARACION DE LA SONDA POR PCR ESPECIFICO

Como sonda de hibridación se utilizó un fragmento de 245 pb del elemento de inserción 8110, obtenido por amplificación específica utilizando los iniciadores INS-1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) e INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA), bajo las siguientes condiciones: 3 min de desnaturalización a 94°C seguido de 25 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 65°C, 2 min a 72°C y una extensión final de 4 min a 72°C. El fragmento obtenido se marcó con digoxigenina utilizando un kit comercial (DIG-Higt Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II, Boehringer Mannheim).

#### 8. - TRANSFERENCIA E HIBRIDACIÓN DNA-DNA.

Una vez que el DNA de las micobacterias fue digerido y separado por electroforesis se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon:

Previo a la transferencia el gel se trató con buffer de desnaturalización (1M NaCl, 0.5M NaOH) durante 30 min, seguido de buffer neutralizante (3M NaCl, 0.5M Tris base a pH 7) durante 30 min. El gel depurinado se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham Life Science) por capilaridad. Esta membrana de nylon fue prehibridada a 43.5°C durante dos horas con una mezcla de volúmenes iguales de las siguientes soluciones: solución I (20X SSC 25 ml, 100X Denhardtts 10 ml, 0.5M EDTA 1 ml, 20% SDS 2.5 ml, agua hasta 50 ml), solución II (formamida 50 ml, DNA de esperma de salmón 5 mg/ml 1 ml, 20% SDS 2.5 ml). Posteriormente esta solución fue sustituida por solución de hibridación constituida por volúmenes iguales de las soluciones II y III (20X SSC 25 ml, 100X Denhardtts 5 ml, 0.5M EDTA 0.5 ml, dextrán sulfato 10 gr, agua hasta 50 ml) más la sonda de 245 pb a una concentración de 10 ng/ml marcada con digoxigenina. La membrana se incubó con esta solución de hibridación a 43.5°C durante toda la noche (14-16 horas), posterior a lo cual la membrana se lavó tres veces (un lavado de 5 min y dos de 15 min) a 65°C con buffer de lavado (0.1XSSC, 0.1%SDS) y una vez a 37°C durante 5 min con buffer de lavado No. 2 (buffer de ácido málico -0.1M ácido málico, 0.15M NaCl a pH de 7.5- y tween 20 0.3%).

Para el revelado la membrana se incubó en buffer de solución bloqueadora (reactivo de bloqueo al 10% en buffer de ácido málico) durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente 30 min más con la misma solución más conjugado Anti-DIG-AP a una concentración de 1:5000. A continuación la membrana se lavó dos veces a 37°C durante 15 min con el buffer de lavado No. 2 y una vez a 37°C por 5 min con buffer de lavado No. 3 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl a pH de 9.5). Finalmente se vertió a la membrana solución reveladora conteniendo CSPD (Chemiluminescence Substrate, Boehringer Mannheim GmbH Germany) y se incubó 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente la membrana húmeda se incubó a 37°C durante 5 min y se expuso a una placa de rayos X durante 7 min.

ESTA TESTS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

#### 9. - ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LOS PATRONES DE BANDAS

El análisis de los patrones de bandas obtenidos por RFLP se realizó utilizando un procesador de imágenes computarizado (Gel Doc 1000 BIO RAD, Ca USA) y los dendrogramas se realizaron con el programa Gel Manager para Windows, Versión 1.5 BioSystematica (London UK England) <sup>59</sup> considerando las premisas descritas por Alland y cols. (1994) <sup>11</sup> y por Small y cols. (1994). <sup>63</sup> El análisis por RFLP para identificar patrones de transmisión en un grupo de cepas de *M. tuberculosis*, se basa en el supuesto de que casos no epidemiológicamente relacionados, que son generalmente el resultado de reactivación de infecciones latentes, tendrán patrones únicos de RFLP, mientras que los casos que están ligados como causa de una infección reciente o infección exógena, tendrán altos índices de similitud en sus patrones de DNA por RFLP.

## ANEXO 2

El presente formato de captación de datos es el cuestionario base para el trabajo colaborativo entre la UIMEIP, CMN y otros hospitales e institutos, al cual se agregaron las variables necesarias para el desarrollo del presente trabajo.

# PROYECTO TUBERCULOSIS

## HOJA DE CAPTACION DE DATOS

Fecha de llenado: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Encuestador: \_\_\_\_\_

### FICHA DE IDENTIFICACION

Clínica de adscripción \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Filiación: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ años

Sexo: 1) Masculino

2) Femenino

Calle y No: \_\_\_\_\_

Colonia: \_\_\_\_\_

Delegación o Municipio: \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES

Ocupación previa: \_\_\_\_\_ Ocupación actual: \_\_\_\_\_

Trabajador de la salud: 0) No hay dato 1) Si 2) No Categoría: \_\_\_\_\_

Escolaridad: 0) No hay dato 1) analfabeta 2) primaria 3) secundaria  
4) preparatoria o técnico 5) profesionista

Nivel Socioeconómico:

Combe: 0) No hay dato

1) Positivo

2) Negativo

Alcoholismo: 0) No hay dato 1) Si 2) No

Uso de drogas: 0) No hay dato 1) Si 2) No

Hacinamiento: 0) No hay dato

1) Si

2) No



Tx utilizado: 1) isoniacida 2) rifampicina 3) pirazinamida 4) etambutol  
5) estreptomicina 6) RIFATER 7) Rifinah

Duración del tratamiento: \_\_\_\_\_ meses

Evolución: curación 1) Si 2) No

### TUBERCULOSIS PULMONAR ACTUAL

Embarazo: 1) Si 2) No

Fecha del Dx de TB: \_\_/\_\_/\_\_ Tiempo de evolución previo al Dx: \_\_\_\_\_ días

PPD: 1) positivo 2) negativo 3) diámetro \_\_x\_\_ mm 4) No

Requirió de hospitalización: 1) Si fecha \_\_/\_\_/\_\_ al \_\_/\_\_/\_\_ Cama: \_\_\_\_\_  
2) No

Tratamiento utilizado:            MEDICAMENTO            TIEMPO

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Comentarios: \_\_\_\_\_

1) Tratamiento supervisado 2) Tratamiento autoadministrado

### MANIFESTACIONES CLINICAS

- |                    |                                     |            |
|--------------------|-------------------------------------|------------|
| 1) febrícula       | 5) astenia, adinamia, hiporexia     | 11) disnea |
| 2) fiebre          | 6) tos no productiva                | 12) otros: |
| 3) diaforesis      | 7) tos con expectoración mucosa     |            |
| 4) pérdida de peso | 8) tos con expectoración purulenta  |            |
| a) menor del 10%   | 9) tos con expectoración hemoptoica |            |
| b) mayor del 10%   | 10) hemoptisis                      |            |





## ANEXO 3

### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### TITULO DE LA INVESTIGACIÓN

**TUBERCULOSIS EN PACIENTES CON Y SIN INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA:** Análisis de la sensibilidad a antituberculosos primarios y del polimorfismo de fragmentos de restricción del DNA de *Mycobacterium tuberculosis*.

**INVESTIGADORES:** Dr. José Juan Terrazas Estrada, Dr. Carlos Lavalte Montalvo, Dr. José Antonio Enciso Moreno y Dr. Sigfrido Rangel Frausto

**ANTECEDENTES:** La tuberculosis es una enfermedad crónica que afecta a un gran número de individuos. El problema es mayor en países en desarrollo como el nuestro y en pacientes con infección por el VIH. Además existe la posibilidad de que un sujeto con tuberculosis pulmonar infecte a otro u otros individuos, principalmente en lugares donde se concentran pacientes VIH positivos, como los hospitales. Un problema mayor es que la tuberculosis puede ser causada por un microbio resistente a los medicamentos que se utilizan para su tratamiento, lo cual dificulta su manejo e incrementa la mortalidad. En nuestro país se desconoce si existe transmisión de tuberculosis pulmonar entre pacientes con VIH dentro de los hospitales y la frecuencia de resistencia a los antibióticos en este tipo de pacientes.

**OBJETIVO:** Determinar si existe transmisión de tuberculosis pulmonar entre pacientes con infección por VIH del Hospital de Infectología, CMR y la frecuencia de resistencia a los antibióticos de mayor uso.

#### PROCEDIMIENTOS:

- 1) A los pacientes con infección por VIH con sospecha de tuberculosis se les solicitará, por lo menos 3 muestras de expectoración para la búsqueda del microbio tuberculoso.
- 2) En casos comprobados de tuberculosis pulmonar se interrogará al paciente y/o se buscará en su expediente clínico la siguiente información: tiempo de atención en el HI, CMR, etapa de la infección por VIH, tiempo de evolución de la tuberculosis pulmonar, número y fecha de consultas e internamientos previos en el HI, CMR, número de cama, etc.
- 3) El estudio del microbio tuberculoso se llevará al cabo en el laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional, Siglo XXI.

#### BENEFICIOS

- 1) Al saberse a que antibióticos es sensible el microbio tuberculoso tendré la oportunidad de recibir de mi médico tratante el tratamiento más adecuado para mí.
- 2) En caso de confirmarse que existe transmisión de tuberculosis entre los pacientes con infección por VIH del HI, CMR, se mejorarán las condiciones de aislamiento de pacientes, diagnóstico, tratamiento, etc. que redundará en mejoría de la calidad de la atención médica para mí y el resto de los pacientes.

#### RIESGOS

- 1) El dar muestras de expectoración en la forma habitual no representa riesgo alguno.

**CONFIDENCIALIDAD**

Toda la información obtenida y los resultados que se deriven del estudio se manejarán con estricta confidencialidad. En caso de publicación siempre se mantendrá el anonimato de los pacientes. Toda la información y resultados obtenidos serán conocidos únicamente por los investigadores y serán comentados conmigo por mi médico tratante.

**DERECHO A NO PARTICIPAR**

La decisión de participar en el estudio es voluntaria y puedo negarme a hacerlo sin que esto repercuta en la atención médica actual o futura a que tengo derecho en este hospital.

**PREGUNTAS**

Todas las dudas que de este estudio puedan surgirme pueden ser aclaradas por mi médico tratante o por el Dr. José Juan Terrazas Estrada en el teléfono 6 27 69 00, extensión 3203 en días y horas hábiles.

**CONSENTIMIENTO**

Después de haber recibido una explicación amplia y suficiente, de haber leído el presente documento y tener una copia del mismo, acepto participar.

Nombre del paciente, firma y fecha: \_\_\_\_\_

Testigo, nombre y firma: \_\_\_\_\_

Testigo, nombre y firma: \_\_\_\_\_

Médico tratante, nombre y firma: \_\_\_\_\_