

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Facultad de Medicina
Programa de Maestría y Doctorado en
Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

Protocolo de investigación
Para obtener el título de Maestra en Ciencias Médicas

Frecuencia de cepas resistentes y clonalidad de *Mycobacterium tuberculosis* en niños con enfermedad tuberculosa

Alumna

Dra. Mercedes Macías Parra.

Tutor

Dr. Jesús Kumate Rodríguez.
Investigador Nacional Emérito

Co-tutores

Dr. José Luis Arredondo García

Dra. Yolanda López Vidal



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

DEDICATORIAS

*A MI MADRE:
POR SU AMOR Y APOYO, INCONDICIONALES*

*A MIGUEL, REBECA Y JIMENA:
POR SER LA RAZÓN DE MIS LOGROS*

*A MIS HERMANAS:
POR SU CARIÑO Y ESTIMULO*

AGRADECIMIENTOS.

BIOL. SUSANA BALANDRANO CAMPOS: Referencia de las cepas

DR. EN CIENCIAS MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA: Asesoría para el estudio molecular

DR. PEDRO GUTIÉRREZ CASTRELLÓN: Asesoría en metodología y estadística

DR. JAVIER VALENZUELA ANTELO: Apoyo en datos demográficos

LAURA MAGALLI GARCÍA ESCUTIA: Apoyo secretarial.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	3
PALABRAS CLAVES.....	4
RESUMEN.....	5
MARCO TEÓRICO.....	10
Resistencia en México.....	12
Resistencia Primaria y Secundaria	16
Clasificación.....	18
Diagnóstico microbiológico.....	18
Determinación de Patrones de Resistencia	19
Diagnóstico Molecular	20
Epidemiología Molecular de <i>M. tuberculosis</i>	20
Planteamiento del problema	24
Pregunta de Investigación.....	25
Justificación.....	26
Objetivos.....	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos.....	27
HIPÓTESIS.....	27
Diseño del estudio	28
MATERIAL Y MÉTODO	29
Población Objetivo.....	29
Población Elegible.....	29
Criterios de exclusión.....	29
Descripción de los Métodos	30
Identificación.....	30
Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana	31
Aislamiento de ácidos nucleicos.....	33
Amplificación de la región DR por PCR.....	33
Espoligotipificación.....	34
Definiciones Operacionales.....	38
Variables.....	38
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	41
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65
AGRADECIMIENTOS.....	82

PALABRAS CLAVES.

Tb Tuberculosis

MDR Multifármaco-resistente

RP Resistencia Primaria

RS Resistencia Secundaria

TAES Tratamiento acortado estrictamente supervisado

InDRE Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

S Estreptomina

R Rifampicina

H Isoniazida

Z Pirazinamida

E Etambutol

ADN Ácido Desoxirribonucleico

RESUMEN.

La tuberculosis es un problema de salud pública con un mayor impacto en países en vías de desarrollo en los que se presenta el 97% y 98% de la morbilidad y mortalidad respectivamente, a pesar de disponer desde hace más de 50 años de medicamentos eficaces que en los últimos años se han administrado en forma de tratamientos acortados con la finalidad de obtener apego al tratamiento.

La resistencia presenta variaciones regionales con una mayor prevalencia en países menos industrializados, lo que ha inducido a que en los últimos años se utilice un cuarto fármaco antituberculoso (estreptomicina o etambutol) para disminuir el desarrollo de resistencia a rifampicina al tomar en cuenta el incremento de resistencia a Isoniazida. En México la información de resistencia a los diferentes antituberculosos, si bien es limitada, proviene generalmente de población adulta en la cual se reporta una resistencia primaria del 12 % a Isoniazida y del 2.4% de multifármaco-resistente (MDR).

Con el objetivo de determinar la prevalencia de resistencia a antituberculosos primarios y la clonalidad de *M. tuberculosis*, se realizó un estudio observacional, descriptivo, ambispectivo y transversal.

Se incluyeron las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes de 18 años o menores que fueron referidas al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE), de 18 entidades federativas en el período comprendido entre enero del 2002 y diciembre del 2003.

La identificación de cepas de *Mycobacterium* se hizo por medio de pruebas bioquímicas tradicionales e identificación de especie por medio de sondas específicas las cuales reconocen el 16sRNAm para cada especie y para pruebas de sensibilidad se utilizó el sistema BACTEC (Becton Dickinson, MS, EEUU), la tipificación molecular se realizó por el método de

espoligotipificación en el laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La información epidemiológica y clínica se obtuvo de las solicitudes requerida por el InDRE y se corroboró a través de la información concentrada en los expedientes clínicos a través de la Secretaría de Salud del Estado de referencia.

Se analizó la información en un paquete SPSS versión 12.0, se utilizó promedio \pm desviación estándar en el caso de variables numéricas continuas con distribución Gaussiana, se calculó sesgo, kurtosis por prueba de Kolmogorov Smirnov, se utilizó mediana con mínimos y máximos para las variables numéricas sesgadas, se describieron las variables categóricas con frecuencias relativas (porcentajes). Para la comparación de variables numéricas se utilizó t de Student o U de Mann-Whitney para aquellas variables con varianzas diferentes y la prueba exacta de Fisher, para la contrastación de variables categóricas, se consideró significancia estadística una $p = 0 < 0.05$.

La información epidemiológica se recolectó de fuentes secundarias y las cepas para la descripción y análisis molecular fueron referidas de los diferentes bancos de cepas hospitalarias, manteniéndose la confidencialidad de los datos.

RESULTADOS.

Durante el período, fueron referidas al InDRE 95 cepas de *M. tuberculosis* correspondientes a pacientes menores de 18 años. De éstas muestras cuatro fueron excluidas. Las 91 cepas incluidas representaron entre el 0.4 y el 15% de los casos de tuberculosis en este grupo de edad notificados a la Dirección General de Epidemiología por esas entidades durante el período de estudio.

El aislamiento de la micobacteria fue más frecuente en muestras de expectoración. 43 cepas (47%) correspondieron al género femenino y 48 (53%) al masculino. La edad promedio fue de 13 ± 5 años.

La forma de localización más frecuente de la enfermedad fue la pulmonar en 65 casos (71%) seguida de la meníngea en 8 (9%) y otras localizaciones con menor frecuencia.

La edad fue significativamente menor en los niños con Tb sistémica (7.7 ± 6.2 años) en comparación con los niños con Tb localizada (15 ± 3.4 años), $p=0.000$.

En 10 de 71 casos (14%) se identificó alguna patología adyacente. Veinticuatro aislamientos (26%) fueron resistentes. La resistencia para isoniazida fue del 23% y del 11% para rifampicina, que en todos los casos se asoció a resistencia para isoniazida.

La resistencia inicial fue menor que la resistencia secundaria [$14/57$ (25%) vs. $7/14$ (50%), $p=0.06$], con una razón de momios (OR) de 2.03 (IC95% 1.01 a 4.07, $p=0.06$). El antecedente de tratamiento previo incrementó el riesgo significativamente en el caso de MDR con un OR de 5.08 (IC95% 1.5 a 16.5 $p=0.01$).

La prevalencia de la resistencia global mostró variaciones en los diferentes estados. En doce de ellos, se documentó resistencia y en siete se encontraron cepas MDR.

En 65 pacientes (71%) se logró el seguimiento, de ellos 6 (9%) fallecieron, dos (3%) abandonaron el tratamiento y en un paciente (1%) se reportó fracaso al tratamiento, sin que la presencia de resistencia o MDR representara riesgo para el fallecimiento en este grupo.

La genotipificación de los aislamientos mostró 55 patrones de espoligotipos, 43 genotipos únicos y 12 conglomerados en los que se agruparon de 2 a 12

cepas con genotipos idénticos (39.56% de los aislamientos). Los espoligotipos fueron designados en orden ascendente con base en el dendograma general, en E1, E3, E7, E31, E33 y E43 se concentró el 24.17% de los aislamientos estudiados. En el conglomerado 31 (E31) el 50% de las cepas (6/12) mostraron un patrón de resistencia (66.6% resistentes y 33.4% multi-resistentes), este genotipo representa el 25% de las cepas que mostraron resistencia y el 13.2% de los aislamientos. Los genotipos de mayor prevalencia en los dos años, fueron el E1 y el E31 que representan el 23.8% de las cepas. En el conglomerado 31 (E31) se encontró un mayor porcentaje de cepas resistentes en los dos años (66.66% en 2002 v. 33.33% en el 2003).

No se encontró una asociación entre el genotipo y la presencia de resistencia o MDR. El 25% de las cepas con resistencia se asociaron al espoligotipo E31 (6/24). Los genotipos encontrados tampoco estuvieron asociados a la procedencia del aislamiento.

CONCLUSIONES.

La resistencia de *M. tuberculosis* a antituberculosos primarios y la MDR encontrada en este estudio fue mayor a la estimada en la población general.

El antecedente de tratamiento previo fue un factor de riesgo para la presencia de cepas MDR.

Existe una gran diversidad de genotipos circulantes en la comunidad.

El patrón de resistencias no guardó ninguna asociación con algún genotipo específico.

No se encontraron diferencias significativas en relación a la prevalencia de cepas resistentes en las diferentes entidades federativas.

Se requiere contar no solo con laboratorios, sino tener programas y actividades coordinadas que permitan identificar en forma temprana y confiable la

presencia de resistencias y de esta manera ofrecer a los pacientes un tratamiento adecuado y disminuir el riesgo de transmisión.

La OMS en general recomienda la baciloscopía como la base para el inicio del tratamiento antituberculoso. En los niños la realización de cultivo con la determinación de su sensibilidad resulta de gran utilidad.

MARCO TEÓRICO

La tuberculosis es un problema global de salud pública que tiene un mayor impacto en los países menos industrializados ¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 40% de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y que cada año existen en el mundo entre 7 y 8 millones de casos nuevos de tuberculosis y esta es responsable de 2 a 3 millones de fallecimientos, la tuberculosis causa la muerte de más adultos que todas las demás causas de infección juntas, por lo que de continuar esta tendencia en la próxima década se espera que la epidemia de tuberculosis sea causa de 90 millones de casos nuevos y 30 millones de fallecimientos, de los cuales el 97% de la morbilidad y el 98% de la mortalidad ocurre en los países menos industrializados en los que la mayor incidencia se presenta en individuos entre los 15 y 40 años, que es la edad de la población económicamente activa en países en desarrollo ^{2,3}.

En México en los últimos años se ha observado una disminución en el número de casos de tuberculosis, notificándose en el año 2005 a la Dirección General de Epidemiología 14000 casos nuevos de los cuales el 85% corresponde a la forma pulmonar, aproximadamente el 1% a Tb meníngea y el 14% lo constituyen otras formas como la Tb renal, Tb ósea etc. La tasa de incidencia varía de 17 a 110 casos por 100,000 habitantes por año dependiendo de la región geográfica, lo que resulta en una tasa ajustada de 45 casos/100,000 habitantes, de estos, el 80% se presentó entre los 15 y 60 años de edad y el 6% en menores de 15 años de edad.

En el mismo año la mortalidad reportada por tuberculosis fue de 6,000 casos. (Norma SSA 02/93 para la prevención y control de la tuberculosis, Boletín SSA 071, marzo 1998).

Es universalmente reconocido que la tuberculosis en el niño tiene un impacto limitado sobre la dinámica de la epidemia en una comunidad, no obstante, la tuberculosis infantil siempre apunta a la transmisión reciente de un caso que no ha sido tratado o diagnosticado y por lo tanto puede ser el reflejo de la ineficiencia de los programas para el control de la enfermedad.

Desde mediados del siglo XX, no solo se cuenta con fármacos antituberculosos eficaces, sino que en los últimos 25 años, el tratamiento de los pacientes con tuberculosis pulmonar ha presentado un cambio significativo al demostrarse la eficacia de los tratamientos acortados tanto en adultos,⁴ como en niños,⁵⁻¹² lo que sugeriría la posibilidad de controlar esta enfermedad, en por lo menos algunas partes en el mundo industrializado, en contraste con lo que se presenta en algunos países en vías de desarrollo en donde la eficiencia puede ser inferior al 50% debido entre otras cosas al poco apego al tratamiento y al suministro ineficiente de medicamentos, incluyendo la monoterapia encubierta¹². El esquema antituberculoso más utilizado incluía tres fármacos rifampicina, isoniazida y pirazinamida, con una eficacia superior al 90%, sin embargo, debido a la presencia de cepas resistentes a isoniazida principalmente en países en vías de desarrollo, se agregó al tratamiento un cuarto fármaco. En México a partir del año 2000 se introduce un cuarto fármaco (myambutol o estreptomycin) en la fase intensiva del tratamiento antituberculoso con la finalidad de disminuir el riesgo de resistencia a rifampicina (Norma Oficial NOM-006-SSA2- 1993 modificación 2000).

El tratamiento inadecuado, no solo impide el control de la enfermedad, sino que es uno de los principales factores que ha favorecido en los últimos años la aparición de micobacterias resistente a los antituberculosos de primera línea. Se estima que en el mundo existen alrededor de 50 millones de individuos con tuberculosis resistente a al menos un antituberculoso.

Resistencia en México

En México la información si bien es fragmentada, los datos disponibles señalan:

En dos encuestas realizadas por la Secretaría de Salud en 1974 y 1981, en las que se incluyeron 12 Entidades Federativas, no se encontraron cambios en las tasa de resistencia a isoniazida (3.9% y 3.7% respectivamente), y sí una disminución significativa en la resistencia a estreptomycinina de 14.3% a 8.9%, probablemente relacionada al menor uso de ésta al incluirse la rifampicina en el esquema de tratamiento primario en los 80s.¹³

En un estudio conducido por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS en 10 países de Latino América, de 1986 a 1990 en México se encontró una resistencia primaria global del 19.1%, siendo del 13.8% para un antituberculoso y del 4.6% para dos o más, con una resistencia para isoniazida del 4% y para rifampicina del 1%¹⁴. En el período comprendido entre 1989 y 1993, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) en 1811 aislados de *M. tuberculosis* (878 provenientes de pacientes sin tratamiento antituberculoso previo y 933 de pacientes ya tratados) encontró una resistencia primaria global del 3% y una resistencia secundaria del 59.4%, la cual se incrementó al 72% en 1993. En los casos de resistencia primaria la mayor frecuencia de resistencia fue para estreptomycinina (6.8%), isoniazida (3.4%), sin embargo la resistencia secundaria fue más frecuente para isoniazida (53.2%), seguida de estreptomycinina (35.3%) y rifampicina (34.2%)¹⁵.

En un estudio poblacional conducido en 1997 por la OMS, en colaboración con el “Center for Diseases Control” (CDC) de Atlanta EU en la que se incluyeron 3 regiones del país estratificadas en relación a su incidencia (baja, media o alta), de acuerdo a la tasa notificada en 1997 por la Dirección General

de Epidemiología. En este estudio se evaluaron en forma aleatoria 460 cepas de un total de 816 muestras y se encontró que la tasa de resistencias primarias fue menor en comparación con la resistencia secundaria: isoniazida 11% vs. 41%, para rifampicina fue del 2% vs. 27%, pirazinamida 1% vs. 18%, para estreptomicina del 11% vs. 28%; para el myambutol la resistencia tanto primaria como secundaria fue del 14% y para MDR fue de 1% vs. 8% respectivamente ^{16,17}.

En un estudio realizado de marzo de 1995 a julio 1999 en la Jurisdicción de Orizaba, en Veracruz, México, en 238 aislados de *M. tuberculosis* de una cohorte de 284 pacientes adultos, la resistencia global fue del 28.4% y la MDR del 10.8%, con un riesgo significativamente mayor de falla al tratamiento (RR=394.9, IC95% 30.7-5084.9, p<.001) y un mayor riesgo de fallecer (RR=3.1, IC95% 1.2-8.4, p=.02) en aquellos pacientes con resistencia a isoniazida y rifampicina ^{18,19}.

En un estudio de vigilancia epidemiológica (de 1991 a 1993) realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMN), en 51 aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis con una mediana de edad de 44,7 años (límites 6 a 80 años), en el 30% de los casos se encontró resistencia a cuando menos un fármaco, el 33% (17) mostraron resistencia a dos antituberculosos, 94% (16/17) de los cuales, fueron resistentes a rifampicina e isoniazida, con una resistencia primaria del 9% para isoniazida y del 6% a rifampicina (Cuadro 1) ²⁰.

Con estos antecedentes se pone en manifiesto la limitada información en población pediátrica que es fundamental para poder establecer un tratamiento antituberculoso adecuado.

Cuadro 1
RESISTENCIA DE *M. Tuberculosis*
MÉXICO

	AÑO	No. DE CASOS	EDAD AÑOS	RESISTENCIAS %					
				H	S	R	E	Z	MDR
Encuestas (SS)	1974	126		3.9	14.3				
12 Entidades Federativas (6 estados de la frontera Norte)	1981	571		3.7	8.6	0.3	1	1	
Sifuentes expedientes INNSZ,	1995	81	Md 44 (L 6-80 años)	23.8	9.5	196	11.9		
García García INER, INDRE	1995 a	326		10	2.7	8.5	2.3		7.3 a
Orizaba	1999		$\bar{X} 42 \pm 17$						9.4
Cohorte									
Estudio poblacional. 3 Estados (California, Sinaloa, Oaxaca)	1997	440	Md 36 (L 10-99 años)	12	11	2	3	1	6

H= Isoniazida E= Etambutol
 S= Estreptomycin Z= Pirazinamida
 R= Rifampicina MDR=Multifarmacoresistente
 SS =Secretaría de Salud
 Md=Mediana \bar{X} Promedio
 L= Límites

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2001, 19-25 Agosto
 Arch Intern Med 2000; 160:639
 Rev. Invest. Clin. 1995; 478-273

La resistencia natural o primaria de *M. tuberculosis* a los fármacos antituberculosos es una característica que se presenta en forma natural, cuya importancia clínica no se había manifestado al no contar con fármacos previamente sin embargo, su disponibilidad y el uso inadecuado de ellos hizo evidente este hecho, al seleccionarse cepas resistentes o favorecer su desarrollo. En la actualidad se acepta que en un cultivo de *M. tuberculosis* aparece por mutación espontánea, resistencia a cada uno de los antituberculosos, esta resistencia se manifiesta independiente entre sí y la posibilidad de que se presenten asociadas es igual al producto de su tasa de mutación ²¹. Se han descrito diversas mutaciones que confieren resistencia para isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomycin y ciprofloxacina. La frecuencia estimada de resistencia para isoniazida y rifampicina, que son considerados los antituberculosos más eficaces, es de 3×10^{-8} y 10×10^{-10} respectivamente. La monoresistencia a rifampicina es muy poco frecuente, por lo que su presencia constituye un buen indicador de MDR ²².

La rifampicina es un derivado semisintético de la rifamicina B, altamente eficaz contra *M. tuberculosis*. Su mecanismo de acción es a través de su unión a la subunidad S de la RNA polimerasa, impidiendo la elongación en la transcripción.

El empleo de técnicas de biología molecular ha permitido demostrar que la mutación responsable de la resistencia de *M. tuberculosis* a la rifampicina en el 90 a 98% de los casos ocurre en la porción central del codon 27 del gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta. La resistencia fenotípica, está relacionada con mutaciones encontradas en los codones Ser531 o His526 las cuales no codifican ninguna actividad vital para la supervivencia o virulencia del microorganismo, por lo tanto los individuos infectados con estas cepas no

solo podrán desarrollar la enfermedad, sino que también tendrán la misma capacidad para transmitir el bacilo con resistencia a otros individuos²³⁻²⁶.

Las cepas con resistencia fenotípica en quienes no se documenta mutación en *rpoB* son poco frecuentes y la resistencia puede estar relacionada a alteraciones en la permeabilidad de la membrana²⁷.

La simplicidad que se observa en la mutación que confiere resistencia a rifampicina, contrasta con la encontrada para isoniazida, la cual puede ser resultado de diferentes mutaciones en el mismo gen o en otros genes.

La mutación más frecuentemente encontrada se sitúa en *KatG* (del 22 al 64% de los casos)^{25,28}, que codifica para la enzima con actividad de catalasa y peroxidasa. Al estar mutado o ausente *KatG* se adquiere resistencia pero se pierde la actividad enzimática de la proteína, la cual es fundamental para su supervivencia intracelular y probablemente en consecuencia las cepas son menos virulentas, lo que explicaría su mayor capacidad para producir enfermedad en los pacientes con VIH/SIDA²⁹.

En otros casos la resistencia a isoniazida es resultado de mutaciones en *inhA*, *ahpC*, *kasA*, sin repercusiones en patogenicidad y virulencia del microorganismo. En el 50% de los casos en que se encuentran mutaciones en *kasA* y en la mayoría de los casos con mutación en *ahpC* también se encuentra mutado *katG*^{23,30,31}.

El principal mecanismo de acción de la isoniazida es bloquear la biosíntesis del ácido micólico en el paso dependiente de oxígeno. La proteína que codifica *inhA* es una enoil reductasa, la cual cataliza la reducción de la delta-trans enoil tioester de la CoA o del sustrato acilCoA. Estas interacciones pueden contribuir a la depleción intracelular de dinucleótido-adenina-nicotinamida intracelular a las pocas horas de estar expuesta la micobacteria a isoniazida³².

La tercera proteína asociada a resistencia a isoniazida es una alquilhidroxiperoxidasa reductasa (codifica *ahpC*), involucrada en la respuesta celular al estrés oxidativo ³³.

Resistencia Primaria y Secundaria

En la práctica clínica, se considera que un paciente con tuberculosis presenta resistencia cuando no responde al tratamiento con los fármacos habituales. En éste contexto se define como resistencia primaria (RP) a la resistencia presente en aquellos pacientes que nunca recibieron tratamiento antituberculoso y resistencia secundaria (RS), la consecutiva a una quimioterapia incorrecta.

Por lo tanto la resistencia primaria es esencialmente un fenómeno de transmisión por circulación endémica de la bacteria y está en relación al área geográfica.

La resistencia adquirida es consecuencia directa de las terapéuticas, ya sea por una prescripción inadecuada o por falta de apego al tratamiento, por lo tanto toda monoterapia real o encubierta (por asociación de fármacos previamente resistentes o ineficaces) es considerada como el principal factor de riesgo para el desarrollo de resistencia.

Esto ha condicionado que en la última década la aparición de multifármaco resistencia que incluye resistencia a rifampicina e isoniazida considerados como los antituberculosos más eficaces surja como un problema de salud pública. ³⁴⁻³⁶.

Los principales factores que han contribuido al desarrollo de cepas resistentes son:

- 1.- Uso de tratamiento antituberculoso no controlado
- 2.- No apego al tratamiento
- 3.- Prescripción medica inadecuada ^{20,37}

Otros factores de riesgo asociados a la infección por cepas resistentes son: Evolución crónica de la enfermedad con una razón de momios (OR) de 4.8, (IC95% 2.7-8.4 $p=0.001$) y edad mayor de 40 años OR de 1.9 (IC95% 1.1-3.2 $p=0.02$)¹⁹, sin embargo, el tratamiento inadecuado es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de resistencia con un OR de 4.2 (IC95% 3.7-4.7) y OR de 10.5 (IC95% 8.5-12.9) para MDR³⁴, lo que hace evidente la necesidad de diferenciar en un enfermo tuberculoso en retratamiento entre:

- a) Recaída o reactivación endógena**, la cual se define como la aparición de un *nuevo brote de actividad bacteriológica* en un paciente que completó adecuadamente el tratamiento, que se encontraba asintomático y cuyas baciloscopias y/o cultivo de control en el cuadro previo eran negativas. En este proceso no se seleccionan cepas resistentes, la causa de esta reactivación se relaciona a la población bacilar persistente o latente que no se dividió durante la fase del tratamiento previo y por lo tanto no hubo las condiciones necesarias para seleccionar mutantes resistentes.
- b) Fracaso**. Es la aparición de un brote de actividad bacteriológica en un enfermo durante el curso de tratamiento, con o sin negativización inicial de los cultivos, por lo general hay resistencia a todos los fármacos que se están administrando.

Si el enfermo abandona el tratamiento se presentará una situación similar a la recaída, si es un abandono parcial el cuadro se asemeja más al fracaso.

En la actualidad se reconoce que la Estrategia TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) es una de las intervenciones que mayor costo-beneficio ha tenido en el campo de la salud pública³⁹.

En México el costo del tratamiento antituberculoso estándar por paciente es de aproximadamente 1,000 pesos, en el caso de tuberculosis MDR el tratamiento puede ser hasta de 18,000 pesos, con una eficacia menor, ya que aún con el

tratamiento estrictamente supervisado usando fármacos antituberculosos de segunda línea, se logra la curación en solo el 50% al 60% de los casos.

En México se estima que la MDR constituye aproximadamente el 2.4% de los casos nuevos de tuberculosis y aún cuando no se considera una de las principales preocupaciones del programa para el control de la tuberculosis, se reconoce como un problema importante de salud pública (Guía para la atención de pacientes con tuberculosis MDR Secretaria de Salud 2004).

Por lo que un aspecto fundamental en el control de la Tb es su rápida detección, tratamiento adecuado y detección de contactos con la finalidad de interrumpir su transmisión.

Clasificación

Se conocen cinco especies de *Mycobacterium sp.* que causan enfermedad tuberculosa en el humano *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum*, y *M. microti* que conforman el grupo denominado Complejo *M. tuberculosis*. Existen además alrededor de 100 miembros del género *Mycobacterium* distribuidas ampliamente en el medio ambiente (suelo y agua). Con excepción de *M. leprae*, las micobacterias no tuberculosas son habitualmente oportunistas más que patógenos obligados y la mayoría no son patógenas para el hombre.

Hoy día los seres humanos constituyen el único reservorio de *M. tuberculosis*.

Diagnóstico microbiológico.

M. tuberculosis es un bacilo gram positivo, el 50% de su peso esta constituido por ácido micólico, la resistencia al alcohol esta dada por la composición de su pared celular.

Los bacilos teñidos con la tinción de Ziehl Neelsen (Z-N)) se observan en cadenas características con forma de cordones serpenteantes, que a pesar de proceder de una sola clona no poseen un comportamiento homogéneo.

Los cultivos convencionales para micobacterias comprenden medios sólidos como el Lowenstein Jensen con base de huevo e incorporación de malaquita, en el cual se requiere de tres a seis semanas para su crecimiento o medios de agar como el Middlebrook 7H10 y 7H11 los cuales son considerados como el estándar de referencia para su aislamiento. En general los medios sólidos son menos sensibles que los líquidos, sin embargo en ninguno de los dos tipos de medio se logra la recuperación del 100% de los aislamientos, por lo que se recomienda el empleo de ambos medios ⁴⁰.

No obstante que en forma anecdótica se reportó el crecimiento de *M tuberculosis* en medio de agar sangre, recientemente se ha demostrado su crecimiento en este medio, lo que podría constituir una alternativa para el aislamiento de este micro-organismo ⁴¹.

Desde hace varios años se ha utilizado el método semicuantitativo radiométrico de BACTEC que tiene la ventaja no solo de tener un crecimiento más rápido sino que es más sensible que los medios sólidos y puede ser utilizado para la determinación de la resistencia antimicrobiana. En este sistema se emplea ácido palmítico marcado con C¹⁴ que es utilizado por la micobacteria como sustrato para su crecimiento, la consecuente liberación de ¹⁴CO₂ ⁴².

Determinación de Patrones de Resistencia

Método BACTEC (Radiométrico)

Este método emplea un medio de cultivo a base de caldo Middlebrook enriquecido, rico en ácido palmítico marcado con carbono 14 (C₁₄), que es un isótopo radiactivo natural, que mide cuantitativamente el CO₂ producido por el metabolismo de las micobacterias. Este sistema aspira el CO₂ marcado presente en la atmósfera del frasco y determina un valor de radioactividad

(Índice de crecimiento) que es directamente proporcional a la cantidad de crecimiento microbiológico.

Es un método semiautomatizado de alta sensibilidad (cuanto) y especificidad que permite hacer el diagnóstico de Tuberculosis en menos de una semana en alrededor del 95% de los casos y permite diferenciar a la micobacteria de otras no tuberculosas (MOTT), a través de la prueba del NAP (p-nitro-alfa-acetil-beta-hidroxi-propiofenona).

Este método permite la determinación de los patrones de sensibilidad a estreptomicina, etambutol, rifampicina, isoniazida y Pirazinamida.

Diagnóstico Molecular

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar hasta 10 microorganismos por ml. de muestras clínicas, comparada con los 10,000 microorganismos necesarios para su detección en un frotis teñidos con Z- N; ambos métodos no discrimina entre bacterias vivas o muertas.

Se ha explorado la utilización de varios marcadores genéticos, sin embargo, la herramienta más robusta es el uso de la secuencia de inserción IS6110, miembro de la familia de elementos transponibles IS3 que es específica para el complejo *M.tuberculosis*⁴⁹. Esta secuencia se encuentra distribuida en forma uniforme alrededor del cromosoma, el número de copias varía desde algunas copias hasta cepas que contienen más de 26 copias, sin embargo, también se han reportado algunas clonas poco frecuentes que no contienen estas secuencias.

Epidemiología Molecular de *M. tuberculosis*

El análisis del genoma de *M. tuberculosis* ha evidenciado un alto grado de conservación en su secuencia nucleotídica (DNA cromosomal) con mutaciones pausadas, lo que ha conducido a la hipótesis de que es de aparición reciente con una edad aproximada de 15,000 años⁴³.

No obstante que el genoma de *M. tuberculosis* se encuentra altamente conservado en relación a otras bacterias, existen regiones polimórficas que frecuentemente se asocian a la presencia de secuencias de inserción y/o elementos repetitivos y son estas regiones variables las que constituyen las bases para su genotipificación ⁴⁴.

Dentro de las técnicas moleculares para la tipificación de la huella digital del DNA basada en la identificación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la fragmentación del DNA se realiza por acción de una endonucleasa de restricción, los fragmentos después son separados por electroforesis mediante hibridación hasta llegar a secuencia de inserción IS6110. Los patrones son analizados en base a las diferencias en migración de los fragmentos hibridados y el número de copias de IS6110 que varían de 0 a 26.

Esta técnica molecular para la genotipificación de la huella digital del DNA basadas por el método de RFLP en la actualidad es considerada como el estándar de oro en la epidemiología molecular de la tuberculosis.

Si bien la contribución de la técnica de RFLP en el campo de la epidemiología es ampliamente reconocida, es claro que no es un indicador epidemiológico absoluto entre los casos de tuberculosis, debido a que patrones idénticos no necesariamente son prueba de asociación entre casos, lo que se ejemplifica en el estudio de Malawi y Kenia en donde se han encontrado cepas con patrones idénticos sin una asociación epidemiológica aparente, lo que podría sugerir una cepa ancestral común más conservada que permanece en el ambiente ⁴⁵.

Es ampliamente conocido el hecho de que los pacientes con baciloscopias positivas son altamente contagiosos, sin embargo el estudio molecular de la huella digital de DNA de los aislados ha permitido documentar que hasta el 17% de los casos de Tb se originan por transmisión de pacientes con

baciloscopia negativa, con una mayor probabilidad de presentar resistencia primaria ⁴⁶.

La genotipificación de *M. tuberculosis* también ha contribuido a la confirmación y estudio de la dinámica de brotes y expansión clonal, entre otras ^{47,48}.

Desafortunadamente una proporción de micobacterias contienen pocas o no contienen copias de IS6110, lo que representa una desventaja debida a la poca capacidad discriminante de esta técnica, cuando existen menos de 5 copias además de que no diferencia a los otros componentes del complejo *M. tuberculosis*.

Otra desventaja es que para realizar esta tipificación se requieren 2 mcg de DNA y esta cantidad solo puede ser extraída de bacterias cultivadas de material clínico, lo que puede requerir inclusive semanas además de ser costosa ^{49,50}.

Otras técnicas de genotipificación más sensibles utilizan oligos sintéticos basados en el conocimiento de las secuencias de los espaciadores de DNA en el locus DRs e incluyen: La Espoligotipificación (espaciador de oligonucleótidos), ⁵¹ tipificación de las repeticiones en tandem (VNTR), polimorfismo de secuencias repetitivas ricas en GC (PGRS) ⁵² y mas recientemente la tipificación de repeticiones interespaciadas (MIRU) ⁵¹⁻⁵³.

La espoligotipificación se basa en la determinación del patrón de las secuencias espaciadoras de las repeticiones directas (DRs) de 36pb que se localizan en los extremos de la secuencia de inserción IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* ⁵⁴. La espoligotipificación tiene la ventaja de requerir pocas bacterias para su tipificación y, en contraste con el método de RFLP IS6110 puede ser utilizada en cultivos no viables, en tinción de Ziehl-Neelsen y en muestras de parafina con capacidad de discriminación y reproducibilidad

comparable con la RFLP IS6110⁵⁴⁻⁶⁵. Es una prueba robusta y altamente reproducible, fácil de realizar y es actualmente uno de los métodos más utilizados para la tipificación del complejo *M. tuberculosis* y de cepas con menos de 5 copias de IS6110.

Las desventajas de este método son: un menor poder discriminativo para *M. bovis* así mismo se han evidenciado patrones idénticos de cepas de *M. tuberculosis* con marcadas diferencias detectadas por el método RFLP IS6110⁶⁶⁻⁶⁸.

Planteamiento del problema

La frecuencia de micobacterias resistentes a los antifímicos de primera línea es considerada como un problema de salud pública. Sin embargo, la magnitud global del problema no está bien definida debido a que la información para adultos es limitada y de niños inexistente en los países en vías de desarrollo. Así como su posible asociación de clonalidad y resistencia.

Pregunta de Investigación

¿Existe resistencia a los antituberculosos primarios en los aislamientos de pacientes pediátricos?

¿Es igual la tasa de resistencia de *M. tuberculosis* aislados de pacientes pediátricos a la descrita en adultos?

¿Existe clonalidad entre las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en niños?

Justificación

El estudio del patrón de resistencia y la clonalidad de *M. tuberculosis* permitirá determinar las características de la población de micobacterias circulantes en el niño.

Objetivos.

Objetivo general.

Frecuencia de cepas resistentes y clonalidad de *M. tuberculosis* en niños con enfermedad tuberculosa.

Objetivos específicos.

Conocer el patrón de resistencia de *M. tuberculosis* a los diferentes antituberculosos en niños con enfermedad tuberculosa.

Determinar si existe clonalidad entre los aislamientos de *M. tuberculosis* de población pediátrica y si ésta se asocia a la resistencia a antituberculosos.

HIPÓTESIS

La frecuencia de resistencia y la clonalidad de *M. tuberculosis* en niños con enfermedad tuberculosa es similar a la reportada en los adultos.

Diseño del estudio

Observacional, descriptivo, ambispectivo (Recolección de información epidemiológica en fuente secundaria y generación de información nueva para la identificación secuencial de sensibilidad antimicrobiana de la micobacteria y determinación de polimorfismo) y transversal.

MATERIAL Y MÉTODO

Población Objetivo.

Cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes mexicanos menores o iguales a 18 años con enfermedad tuberculosa.

Población Elegible.

Cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes mexicanos de 18 años o menores con enfermedad tuberculosa de diferentes entidades federativas al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) para su estudio del 2002-2003.

Criterios de exclusión

- Pacientes que no cuenten con la corroboración demográfica de los datos.

Descripción de los Métodos

Se incluyeron todas las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en niños de 18 años o menores, procedentes de 19 entidades federativas durante el período de enero del 2002 a diciembre del 2003, referidas al InDRE para identificación de especie y patrón de sensibilidad, estas se realizaron con el sistema BACTEC (Becton Dickinson, MS, EEUU) y la tipificación molecular se realizó por el método de espoligotipificación en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La información epidemiológica y clínica se obtuvo de las solicitudes requeridas por el InDRE para el procesamiento de las muestras y se corroboró a través de la información concentrada en los expedientes clínicos a través de la Secretaría de Salud del Estado de referencia.

Identificación

Las muestras clínicas crecieron en medio sólido de Lowenstein Jensen durante 3-6 semanas y medio líquido BACTEC Alert. Los cultivos en los que se observaron colonias típicas blancas a color crema de aspecto rugoso a seco, con la característica de ser bacilo ácido alcohol resistentes se identificaron como *M. tuberculosis* por las pruebas bioquímicas convencionales: producción de niacina, actividad de pirazinaminidasa, reducción de nitratos, catalasa (negativa), arisulfatasa (negativa), y por sondas moleculares que reconocen el 16sRNAr.

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

Se utilizó el sistema automatizado radiométrico (BACTEC, Becton & Dickinson Coxckevsille MA), que emplea medio de cultivo a base de caldo Middlebrook enriquecido y ácido palmítico marcado con carbono 14 (C_{14}). Esta técnica mide cuantitativamente el CO_2 marcado, presente en la atmósfera del frasco y determina el valor de radioactividad (Índice de crecimiento) que es directamente proporcional a la cantidad de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo. Se tomaron .2 ml de dicha concentración y se incubaron a $37^\circ C$ hasta alcanzar un índice de crecimiento entre 500 U y 800 U, se tomó 0.1 ml de esta concentración y se incubó con diferentes concentraciones de antituberculosos (Estreptomina $6\mu g/ml$, isoniazida $0.1\mu g/ml$, rifampicina $2\mu g/ml$, etambutol $7.5\mu g/ml$). Se empleó como organismo de referencia la cepa tipo *M. tuberculosis* H37Rv. Se realizaron lecturas entre los 4-12 días de inoculado el medio. La determinación de la sensibilidad se realizó con la diferencia (valor delta Δ) entre los resultados obtenidos en las mediciones del último día y el día previo.

Se consideró resistente a todo valor de delta mayor que la cepa control.

Procedimiento para determinar los patrones de susceptibilidad de *M. tuberculosis*.

Sistema automatizado radiométrico (BACTEC, Becton & Dickinson Coxckevsville MA)

Sensibilidades primarias de *Mycobacterium tuberculosis* 12 B

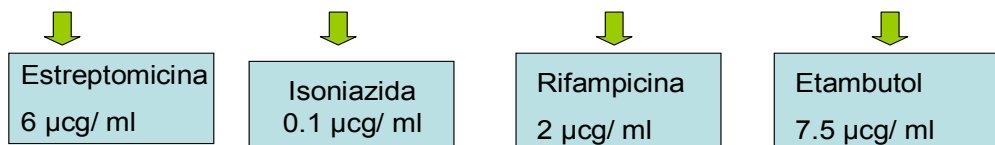
12B IC 500-800

.1 ml de cepa de 12 B

.1 ml de cepa de 12 B

.1 ml de cepa de 12 B

.1 ml de cepa de 12 B



- Lectura > 1% resistente
- Control
- Cepa en estudio
- Rango: 4-12 dias

(+)

Δ = valor final – valor
del dia previo



REPORTE DE SENSIBILIDADES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
C	3	4	5	12	15	18	21	23	27	30			Δ3
S	3	12	23	50	70	112	220	460	500	530			Δ30 R
H	1	8	13	25	23	22	21	20	15	13			Δ2 S
R	2	3	20	25	20	18	17	16	15	13			Δ2 S
E	4	24	26	75	213	413	500	800	900	980			Δ80 R

Aislamiento de ácidos nucleicos

Para la extracción del ADN las cepas fueron inactivadas por calor (20 min a 80 °C). Posteriormente se adicionó lisozima en amortiguador Tris pH 9.0 y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente a cada muestra se le adicionó 0.1 vol de SDS al 10% / proteinasa K y se incubó por 3 h a 55°C al término del cual se adicionó un volumen igual de fenol saturado a pH 8.0, se mezcló en Vortex y se centrifugó por 10 min, a 14000 rpm. Sin romper la interfase, la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 ml con 500 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), seguido de Vortex por 10 seg. y centrifugación a 14 000 rpm por 10 min. Nuevamente se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se adicionaron 65 µl de NaCl 5M y 450 µl de isopropanolol, se incubó por 20 min. a -20°C y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. a 4°C y después se decantó. El ADN se lavó 2 veces con alcohol etílico al 70% y finalmente se dejó evaporar el alcohol a temperatura ambiente y el precipitado se resuspendió en 25 µl de agua para PCR.

Amplificación de la región DR por PCR.

Del ADN purificado se tomaron 3 µL y se le agregaron 47 µL de una mezcla de reacción que contenía 5 µL de amortiguador para PCR 10x, 1 µL del iniciador tb11 (5'ACCAACGAACCGACTACCCT-3'), 1 µL del iniciador tb12 (5'CTTGTCGAACCGACTACCCT-3'), 10 µL de dNTP's, (datp, dTTP,dCTP, dGTP), 30 µL de agua para PCR y 0.3 µL de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación consistieron en un precalentamiento de 5 min. a 94°C por 1 minuto y 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento de los iniciadores a 60° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 30 segundos. Después del ciclo final, la reacción fue terminada manteniendo una temperatura de 72° C por 10 minutos.

Espoligotipificación

Amplificación de las secuencias directas repetidas

A partir del ADN extraído de cada uno de los aislamientos clínicos se realizó una amplificación de las regiones espaciadoras de las secuencias directas repetidas utilizando los iniciadores DRa (5'- 3') y DRb (5'- 3'). La mezcla de reacción consistió en 4 µL iniciador Dra (20pmol), 4 µL Iniciador DRb (20 pmol), 4 µL dNTPs (2.5mM con una concentración final 0.2 mM cada dNTP), 5 µL amortiguador 10x, 0.1 µL Taq DNA polimerasa (Amersham Biosciestems) y 33 µL agua para PCR de 18 mΩ. A cada tubo de reacción se les adicionaron 2 µL de ADN. De forma simultánea se utilizo ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG como controles positivos y agua de PCR como control negativo de la amplificación. La amplificación se realizó en un termociclador PerkinElmer 9700 aplicando un ciclo de desnaturalizaron a 96°C × 5 min. seguido de treinta ciclos de amplificación: 1 min. 96°C / 1 min. 55°C / 30 seg. 72°C. Finalmente dio un ciclo de extensión a 72°C × 10 min. y los productos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

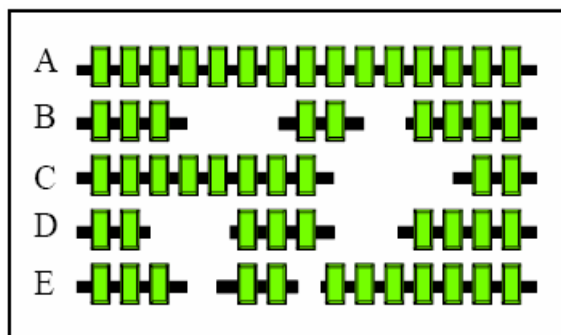
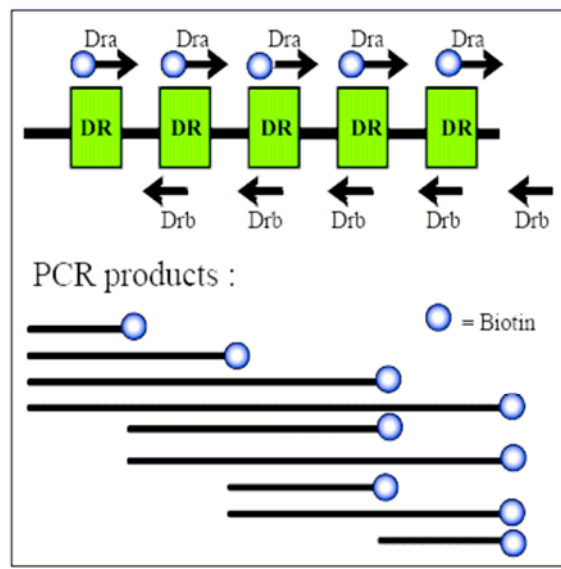
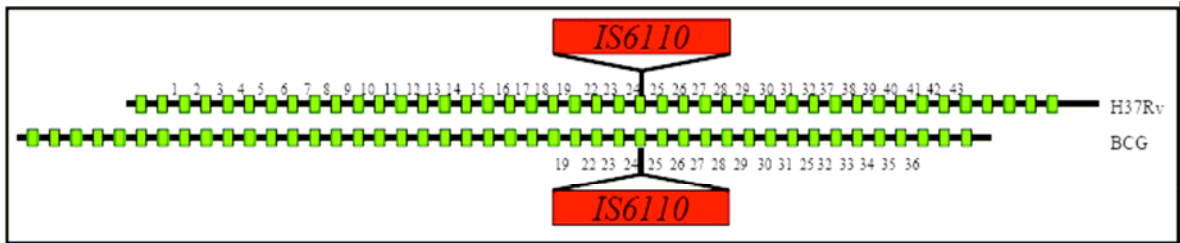
Hibridación

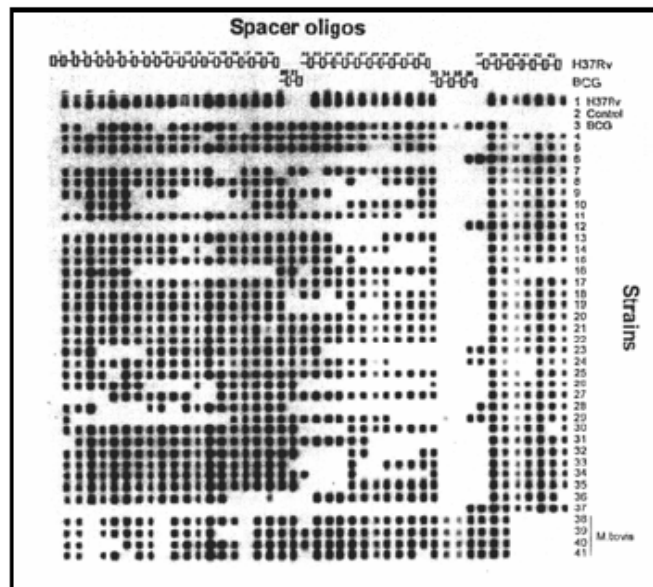
Los productos de PCR (pPCR) se diluyeron 1:7.5 en amortiguador 2xSSPE/0.1% SDS antes de ser desnaturalizados por calentamiento a 96°C durante 10 min. Para retardar la formación de productos de doble cadena, los PCR se incubaron la muestra en hielo durante 2 min. La hibridación de los amplicones se realizó en membranas previamente sensibilizadas con oligonucleotidos complementarios a las secuencias espaciadoras de las DRs. La hibridación se realizó en un horno de hibridación a 42°C utilizando el Miniblotter 45 teniendo cuidado de que los productos de PCR no contaminaran los carriles contiguos. Al término de la hibridación se retiro el

exceso de PCR de los carriles del Miniblotter y se retiró la membrana del mismo para ser lavada 2 veces a $60^{\circ}\text{C} \times 10 \text{ min.}$ con amortiguador 2xSSPE/0.1% SDS, 60°C y 2xSSPE/0.5% SDS, 60°C . Después de los lavados la membrana se colocó en amortiguador 2xSSPE $\times 5 \text{ min.}$ a 42°C al término de los cuales se adicionó una solución 2xSSPE/0.5% SDS que contenía $2.5\mu\text{L}$ de streptavidina-peroxidasa (500U/ml) por cada 10 ml del amortiguador y se incubó la membrana en esta solución $\times 60 \text{ min.}$ a 42°C . Al término de la incubación se decantó la solución y se lavó con amortiguador 2xSSPE/0.5% SDS para eliminar el exceso de streptavidina-peroxidasa. Todos los lavados e incubaciones se realizaron en un horno de hibridación con agitación rotatoria. Finalmente la membrana se colocó en un contenedor a temperatura ambiente en el que se equilibró con amortiguador 2xSSPE $\times 5 \text{ min.}$ El revelado de la hibridación se realizó adicionando un sustrato quicio-luminiscente (ECL) y exponiendo una placa fotosensible con la membrana durante 20 min. La placa fotosensible se procesó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis de Espoligotipos

Con la placa expuesta se determinó el espoligotipo de cada aislamiento, a cada aislamiento, se le asignó un código binario de 43 caracteres dependiendo de la presencia o ausencia de las regiones espaciadoras. Con todos los patrones se conformó una base de datos en las cuales se asignó el carácter A para denotar que la secuencia que se encontraban y G, para denotar que la secuencia no se encontraba presente. Con la base de datos obtenida se determinó la relación de los espoligotipos utilizando el software MEGA 3.1 (<http://www.megasoftware.net/mega.html>) utilizando la función UPGMA para construir los dendogramas de los aislamientos de *M. tuberculosis*.





Definiciones Operacionales

En la correlación de la identificación de las micobacterias aisladas con los datos clínicos se estudiaron las siguientes variables.

Variables

Edad: En años cumplidos

Escala: Numérica continua

Género: masculino, femenino

Escala: Nominal dicotómica

Lugar de Procedencia

Escala: Nominal politómica

Estado nutricional.

Definición: Se utilizó la información obtenida del expediente clínico en relación a la presencia o no de desnutrición de tercer grado

Escala: Nominal dicotómica

Categoría: Sí / No.

Tratamiento previo de antifímicos.

Definición: Ingestión de una o más drogas antituberculosos durante por lo menos un mes

Escala: Nominal dicotómica.

Categoría: Sí / No.

Sitio de aislamiento de M. tuberculosis.

Definición: Lavado gástrico, líquido peritoneal, expectoración o lavado bronquial, material de biopsia, líquido cefalorraquídeo, tejido osteoarticular, orina.

Escala: Nominal dicotómica.

Categoría: Sí / No.

Resistencia a antimicrobianos.

Definición: Se consideró resistente a todo valor de delta mayor que la cepa control.

Escala: Nominal/dicotómica.

Categoría: Presente o ausente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizó la información en un paquete en SPSS versión 12.0. La información obtenida se describió mediante promedio \pm desviación estándar en el caso de variables numéricas continuas con distribución gaussiana, para lo cual se calculó sesgo, kurtosis y prueba de Kolmogorov Smirnov. Las variables numéricas sesgadas se describieron con mediana con mínimos y máximos y las variables categóricas con frecuencia relativas (porcentajes). Para la comparación de variables numéricas se utilizó t de Student o U de Mann-Whitney para aquellas variables con varianzas diferentes y la prueba exacta de Fisher, para la contrastación de variables categóricas, se consideró significancia estadística una $p=0 < 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

La información epidemiológica se recolectó de fuentes secundarias y las cepas para la descripción y análisis molecular, fueron referidas de los diferentes bancos de cepas hospitalarios, manteniéndose la confidencialidad de los datos.

RESULTADOS

Durante este periodo de estudio fueron referidas al InDRE 95 cepas de *M. tuberculosis* correspondientes a pacientes menores de 18 años. De estas muestras dos fueron excluidas debido a que correspondían a un mismo paciente y también fueron excluidas otras dos en las que no se logró corroborar la información demográfica, por lo que solo 91 cepas fueron analizadas.

59 (65%) correspondieron al año 2002 y 32 (35%) al 2003, procedentes de 18 entidades federativas que representaron entre el 0.4 y el 15.5% de los casos de tuberculosis en este grupo de edad, notificados a la Dirección General de Epidemiología por esas entidades durante el período de estudio. (Cuadro 1)

El aislamiento de la micobacteria fue más frecuente en muestras de expectoración, principalmente en pacientes con TbP en contraste con los pacientes con las formas diseminadas de la enfermedad en quienes el diagnóstico microbiológico se realizó a partir de las muestras de LCR, lavado gástrico o por estudio histopatológico en material de biopsia. (Gráfica 1)

Se encontró la siguiente distribución de acuerdo al género: 43 (47%) correspondieron al femenino y 48 (53%) al masculino. La edad promedio fue de 13 años con una desviación estándar de ± 5 años, el 60% tenían entre 15 y 18 años. Sólo el 8% eran menores de dos años de edad. (Gráfica 2)

La forma de localización más frecuente de la enfermedad fue la pulmonar en 65 casos (71%) seguida de la meníngea en 8 (9%) y otras con menos frecuencia. El 76% correspondió a la forma localizada y 24% a la forma sistémica. (Gráfica 3)

La edad fue significativamente menor en los niños con Tb sistémica (7.7 ± 6.2 años) en comparación con los niños con Tb localizada (15 ± 3.4 años), $p=0.000$.

Del total de pacientes, en 20 no se logró conocer su situación previa, de los 71 restantes, en 10 casos (14%) se identificó alguna patología adyacente, 6 (8.4%) tenían desnutrición de tercer grado, 2 (2.8%) cursaban con coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana, 1 (1.4%) presentaba diabetes mellitus y 1 más (1.4%) alcoholismo, en los 2 últimos pacientes tenían dieciocho años de edad y en 61 no se encontró patología asociada.

24 aislamientos (26%) fueron resistentes, 8 (9%) fueron resistentes a un solo fármaco (siete a isoniazida y uno a estreptomicina), 16 (17%) fueron resistentes a dos o más antituberculosos y en 4 (4%) hubo resistencia a los cinco antituberculosos primarios. La resistencia a rifampicina se asoció en todos los casos a resistencia para isoniazida.

La resistencia mas elevada fue para isoniazida en el 23% de las cepas. En 10 (11%) se documento MDR. (Cuadro 2)

En 14/71 pacientes (20%) se logró documentar el antecedente de tratamiento antituberculoso previo, en estos casos la resistencia inicial fue menor que la resistencia secundaria [14/57 (25%) vs. 7/14 (50%), $p=0.06$].

Se efectuó análisis bivariado de riesgos, identificándose un mayor riesgo para la presencia de cepas resistentes en pacientes con tratamiento previo con una razón de momios (OR) de 2.03 (IC95% 1.01 a 4.07, $p=0.06$) que si bien no alcanzó la significancia estadística si muestra una diferencia clínica relevante. Este riesgo se incrementó significativamente en el caso de MDR con un OR de 5.08 (IC95% 1.5 a 16.5 $p=0.001$).

No encontramos diferencias significativas entre la edad y la presencia de cepas resistentes (13.7 ± 5.4 años vs. 13.1 ± 5.2 años, $p=0.4$), sin embargo, sí fue significativa en el caso de los pacientes de mayor edad para MDR (16 ± 2.2 años vs. 12.9 ± 5.4 años $p=0.005$).

No se encontraron diferencias significativas en relación a la presentación localizada o diseminada de la enfermedad y la presencia de cepas resistentes, de los pacientes con resistencia el 27.5% tenían la forma localizada mientras el 22.7% presentaban la forma sistémica ($p=.44$), sin embargo la MDR mostró una menor tendencia a producir las formas sistémicas de la enfermedad (13 % vs 4.5 % $p= .24$).

La prevalencia de la resistencia global mostró variaciones en las diferentes entidades federativas. En doce entidades se documentó resistencia y en siete estados se encontraron cepas MDR. (Cuadro 3)

Al comparar las resistencias o la MDR, ajustadas por las diferentes entidades federativas no se encontraron diferencias significativas, ni tampoco al agruparlas por región. (Cuadro 4)

Se logró seguimiento en 65 pacientes (71%), de los cuales 6 (9%) fallecieron, 2 (3%) abandonaron el tratamiento y en 1 paciente (1%) más se reportó fracaso al tratamiento, sin que la presencia de resistencia o MDR representara riesgo para el fallecimiento en este grupo de pacientes. (Cuadro 5)

La genotipificación de los aislamientos clínicos por espoligotipos, mostró que existe una gran diversidad de genotipos, encontrándose 55 espoligotipos en las 91 cepas estudiadas. Se encontraron 43 genotipos únicos y 12 conglomerados en los que se agruparon de 2 a 12 cepas con genotipos idénticos (39.56% de los aislamientos). Los espoligotipos fueron designados en orden ascendente con base en el dendograma general, en el que se muestra la distribución de las 91 cepas.(Figura 1) En los espoligotipos E1,E3,E7,E31,E33 y E43 se concentró el 24.17% de los aislamientos estudiados. En el conglomerado 31 (E31) el 50% de las cepas (6/12) que lo conformaron mostraron un patrón de resistencia (66.6% resistentes y 33.4% multi-resistentes), este genotipo

representa el 25% de las cepas que mostraron resistencia y el 13.2% de los aislamientos. (Figura 1)

Al analizar el modo en el cual se agruparon las cepas de acuerdo al año de aislamiento se observó que en los aislamientos referidos del año 2002 (59 cepas) presentaron 39 genotipos de los cuales 29 fueron únicos (57.14% de las cepas). En ese año los genotipos más frecuentes fueron el E1 y E31 que representan el 24.5% de las cepas. (Figura 2) En las cepas referidas en el año 2003 (32 aislados) se encontraron 14 genotipos únicos y 6 genotipos que incluyen de 2 a 4 cepas. Al igual que lo observado en el año 2002, los genotipos más prevalentes fueron el E1 y el E31 que representan el 23.8% de las cepas. (Figura 3) En el conglomerado 31 (E31) se encontró un mayor porcentaje de cepas resistentes (66.66% en 2002 v. 33.33% en el 2003).

Al analizar la forma en la que se agrupan los genotipos que presentaron las cepas resistentes o multiresistentes, en ninguno de los casos se encontró una asociación entre el genotipo y la presencia de resistencia a uno o varios antituberculosos. El 25% de las cepas con resistencia se asociaron al espoligotipo E31 (6/24). La mayoría de los aislamientos presentó un genotipo único (16 cepas). Los genotipos encontrados tampoco estuvieron asociados a la procedencia del aislamiento. (Figura 4)

Para buscar si existía asociación entre los genotipos de las cepas estudiadas y el origen de las mismas, se analizó en forma independiente a los genotipos en seis Entidades Federativas en las que se tenían al menos seis cepas para la construcción de los cladogramas.

El estado de Jalisco fue el de mayor número de aislamientos, aportó 20/91 (21.9%). En esta entidad se encontraron 18 genotipos de los cuales el 80% (16) fueron únicos. Dos de los aislamientos que presentaron resistencia también presentaron el mismo espoligotipo (E31). En esta entidad se encontró

un aislamiento que presentó el genotipo Beijín y un genotipo asociado a este. (Figura 5)

Las cepas provenientes de Baja California (11) presentaron 10 genotipos y solo 2 cepas presentaron el mismo genotipo. (Figura 6) En las cepas provenientes de Sinaloa se encontró un patrón similar observándose 9 genotipos en las 10 cepas estudiadas. (Figura 7) Las cepas que presentaron resistencia en este estado aunque no compartieron el mismo genotipo, estos si estuvieron relacionados como se observa en el cladograma de la Figura 6.

En los aislamientos referidos del estado de Guanajuato se encontraron 6 genotipos, de los cuales la mitad estaban conformados por 2 aislamientos. (Figura 8) Dos de los aislamientos que presentaron resistencia estaban cercanamente relacionados.

En los estados de Guerrero y Tamaulipas, en los que se contó con 6 aislamientos de cada uno, se encontró que la mayoría de estos presentaba un genotipo único (5 genotipos para cada estado) y, en el caso de Guerrero, en el cual el 50% de los aislamientos presentaba resistencia a algún antituberculoso, esta no se relacionó al genotipo. (Figura 9 y 10)

No se encontraron diferencias en la distribución de los genotipos en relación a la forma localizada o sistémica de la enfermedad así como en los diferentes grupos de edad. (Figura 11-16)

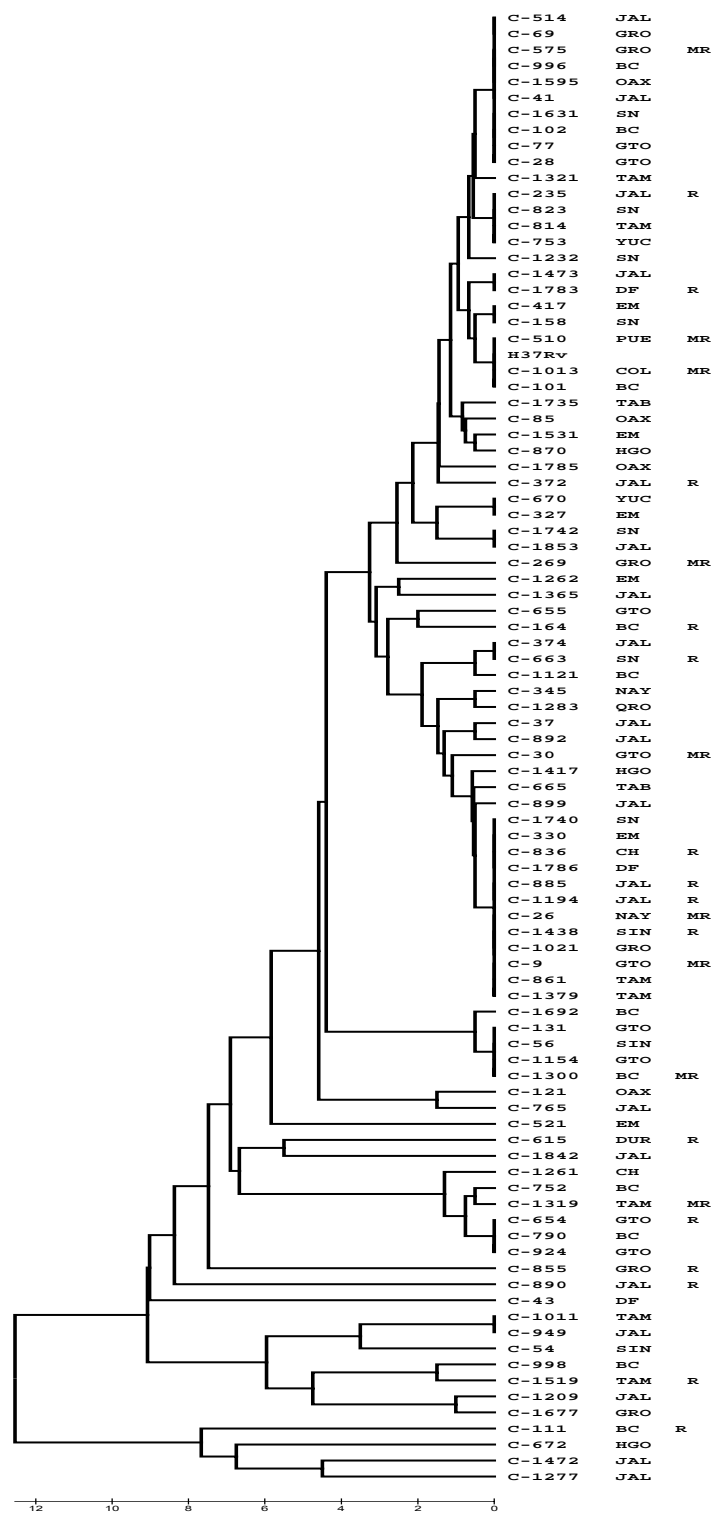


Figura 1. Dendrograma de los genotipos (espoligotipos) obtenidos de 91 cepas de *M. tuberculosis* aislados de pacientes menores de 18 años y referidas al INDRE entre 2002 y 2003.

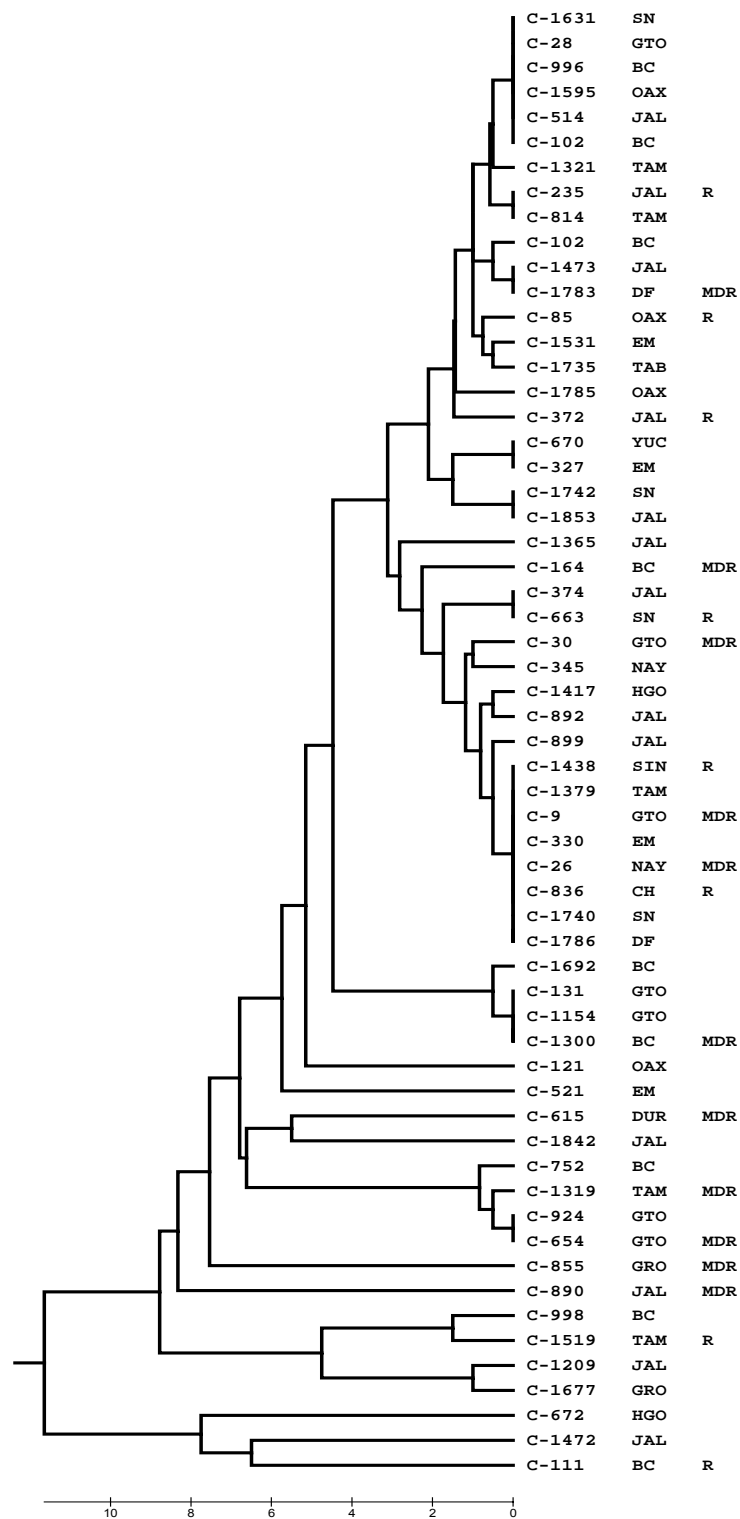


Figura 2. Dendrograma de los genotipos (espoligotipos) obtenidos de los aislamientos de *M. tuberculosis* referidos al INDRE en 2002. R= Resistente, MDR= Multiresistente.

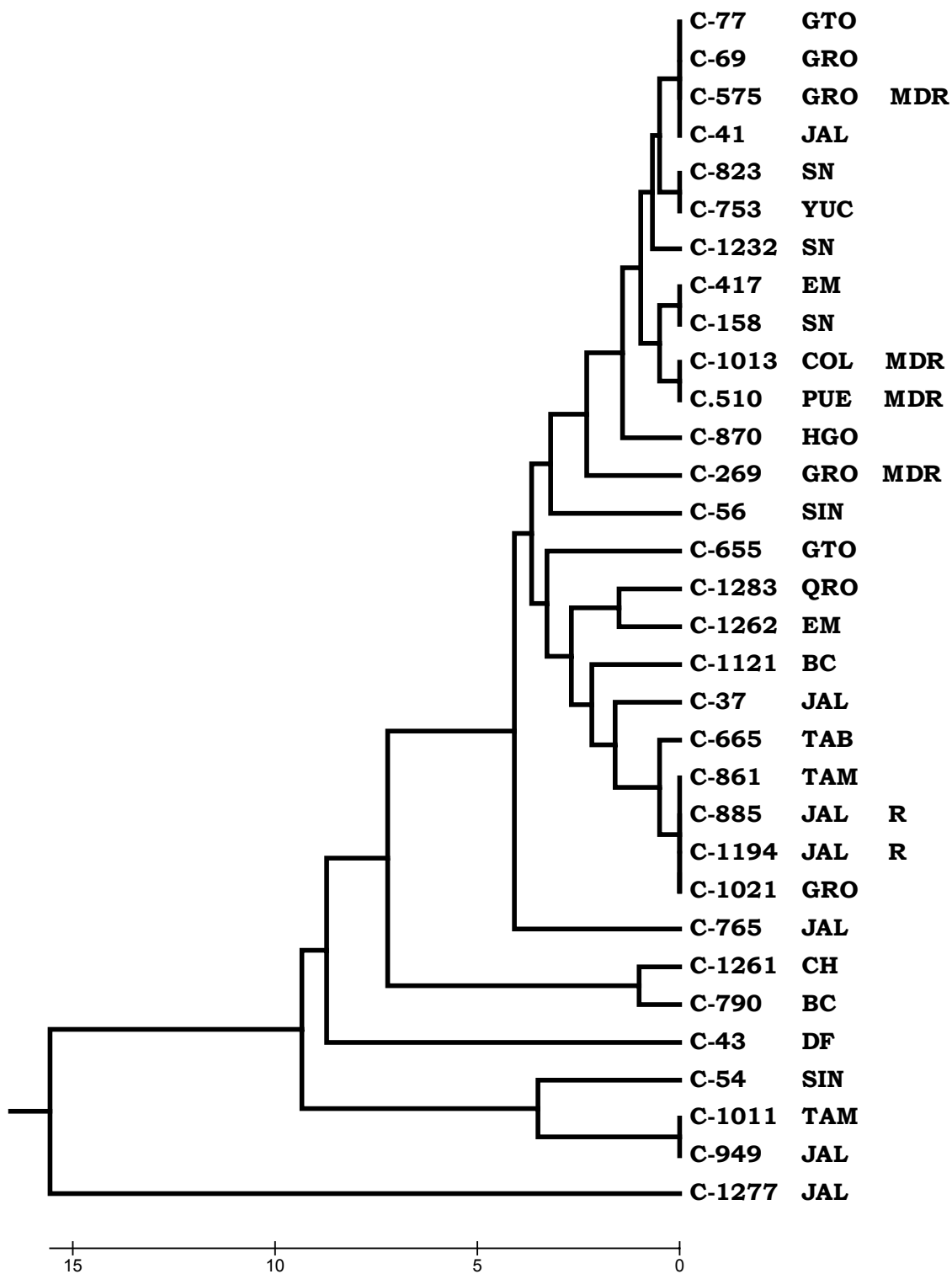


Figura 3. Dendrograma de los genotipos (espoligotipos) obtenidos de los aislamientos de *M. tuberculosis* referidos al INDRE en 2003. R= Resistente, MDR= Multiresistente.

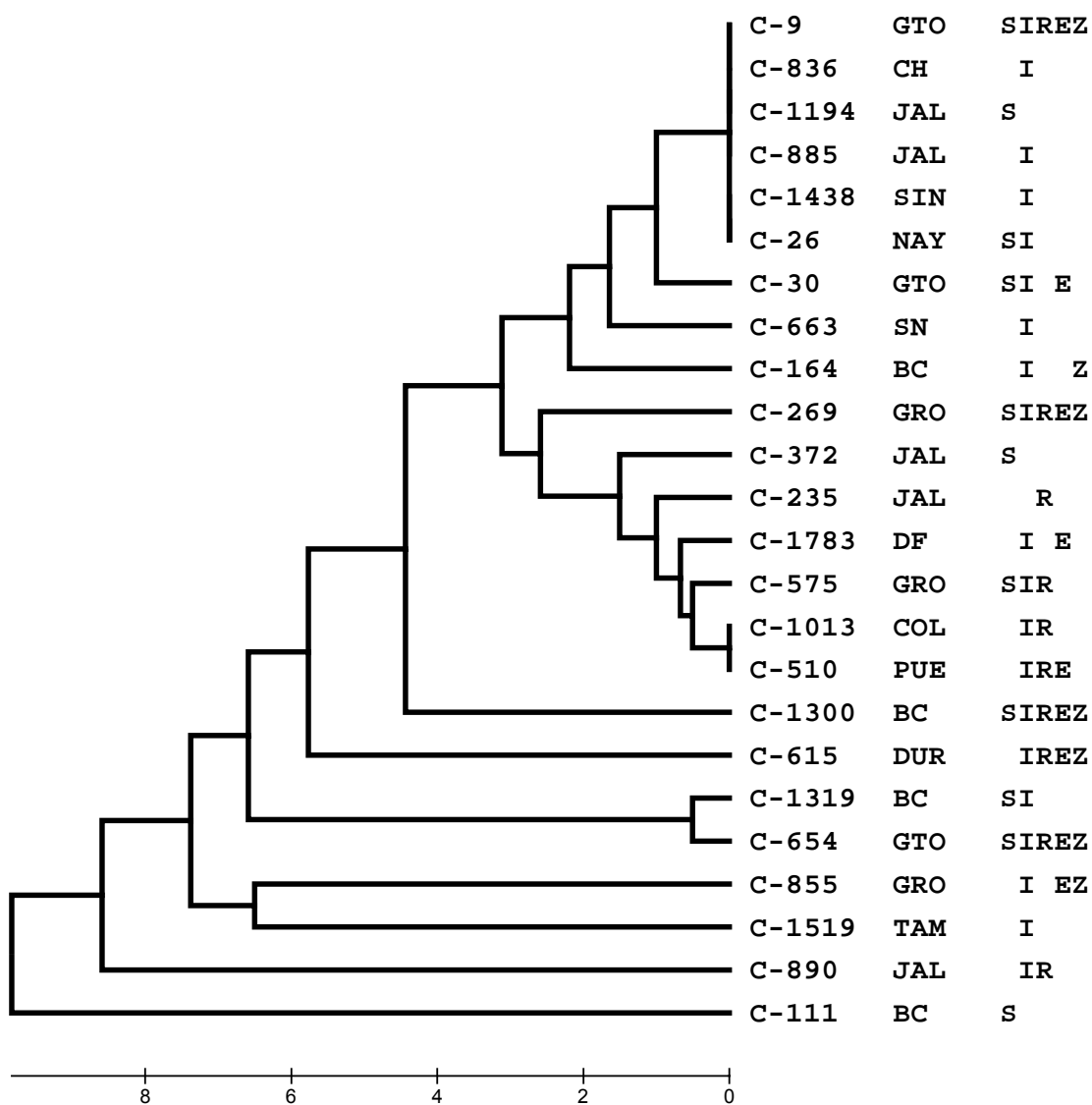


Figura 4. Espoligotipos de los aislamientos de *M. tuberculosis* que mostraron resistencia a uno o varios antifímicos. S= Estreptomycin, I= Isoniazida, R= Rifampicina, E= Etambutol, Z= Pirazinamida.

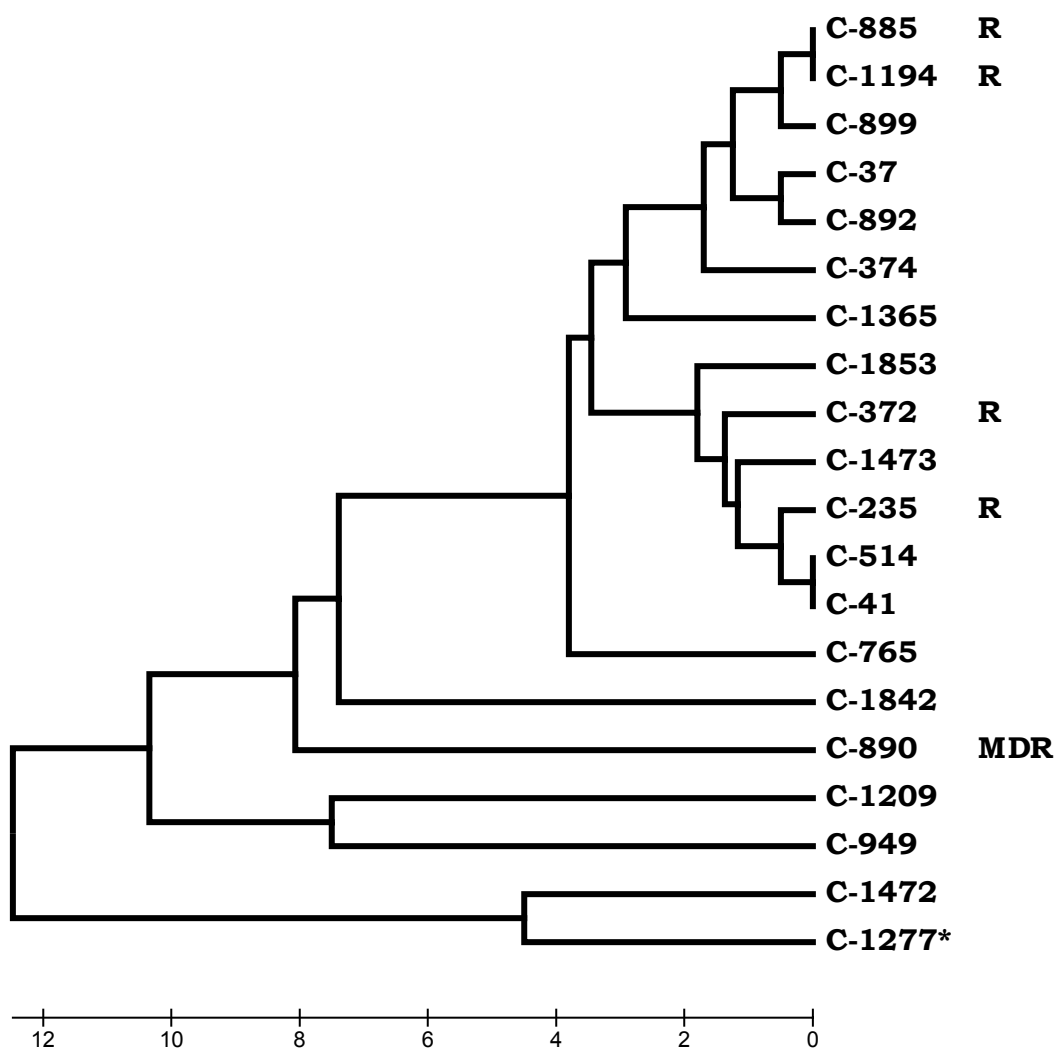


Figura 5. Clasificación de los espoligotipos obtenidos de los 20 asilamientos referidos al INDRE por el estado de Jalisco. R= Resistente, MDR= Multiresistente.

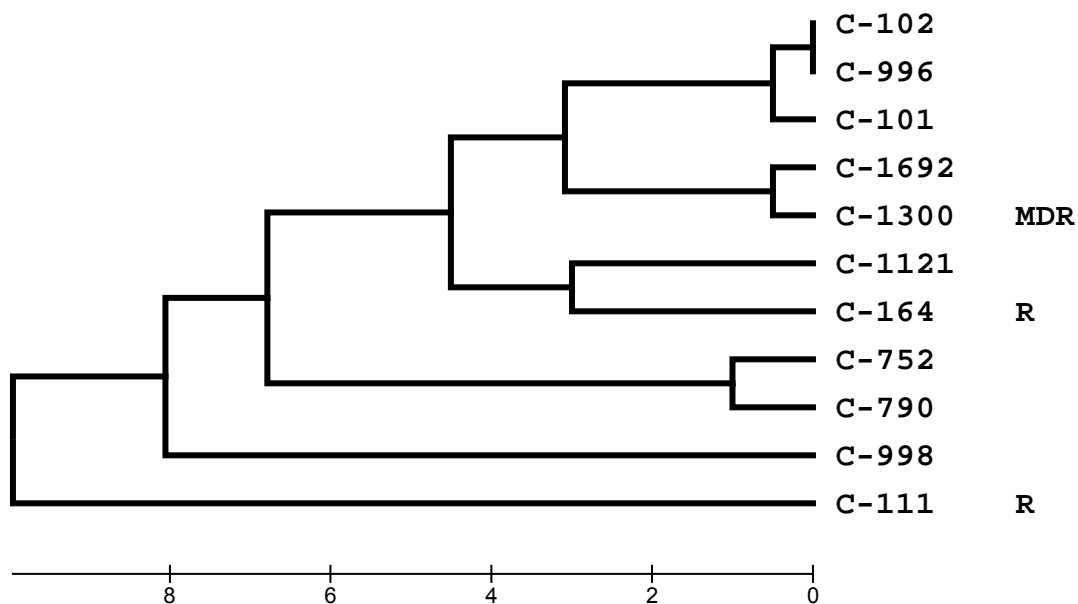


Figura 6. Clasificación de los espigotipos obtenidos de los 11 asilamientos referidos al INDRE por el estado de Baja California. R= Resistente, MDR= Multiresistente.

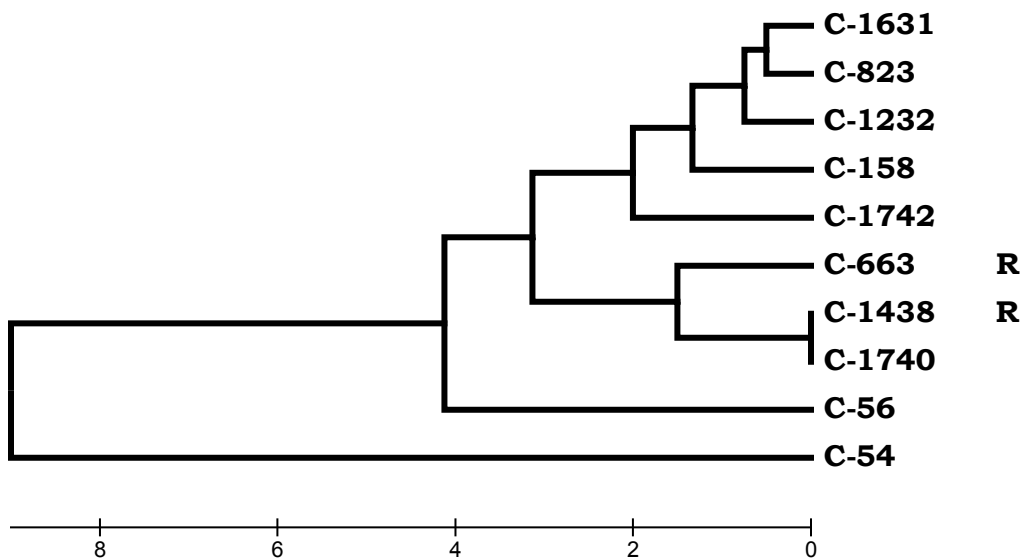


Figura 7. Clasificación de los espigotipos obtenidos de los 10 asilamientos referidos al INDRE por el estado de Sinaloa. R= Resistente.

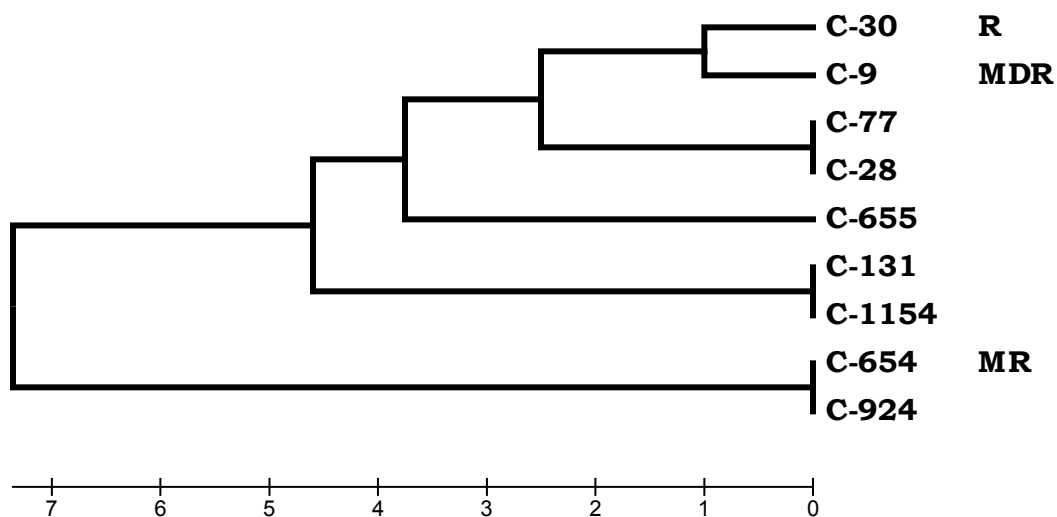


Figura 8. Clasificación de los espoligotipos obtenidos de los 9 asilamientos referidos al INDRE por el estado de Guanajuato. R= Resistente, MDR= Multiresistente.

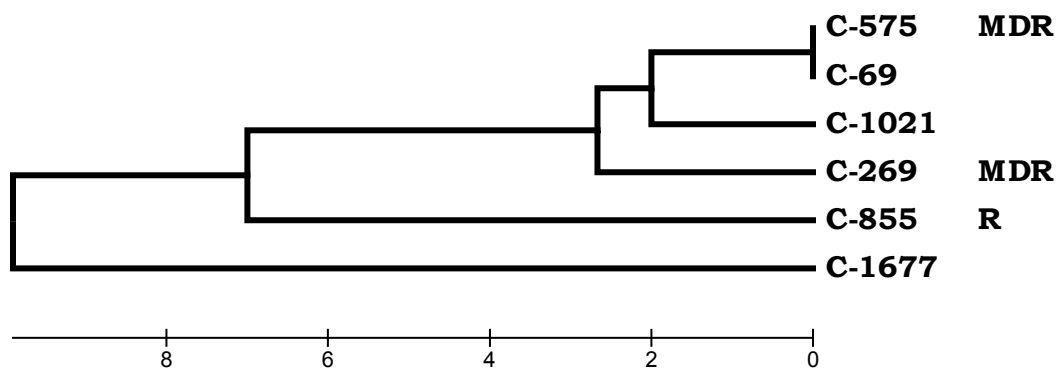


Figura 9. Clasificación de los espoligotipos obtenidos de los 6 asilamientos referidos al INDRE por el estado de Guerrero. R= Resistente, MDR= Multiresistente.

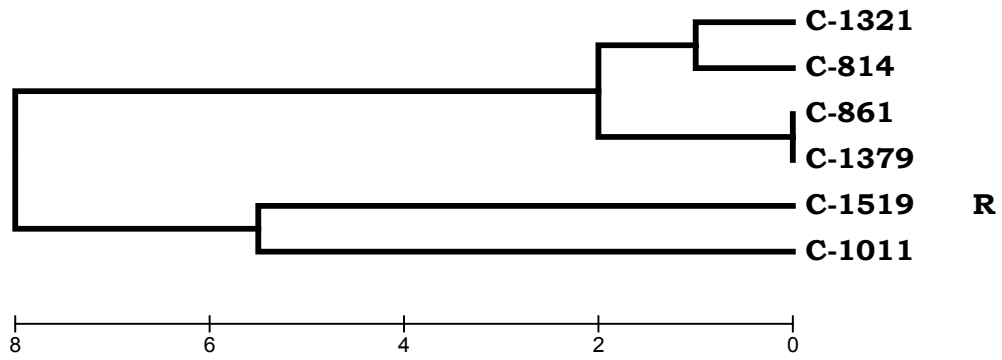


Figura 10. Clasificación de los espigotipos obtenidos de los 6 asilamientos referidos al INDRE por el estado de Tamaulipas. R= Resistente.

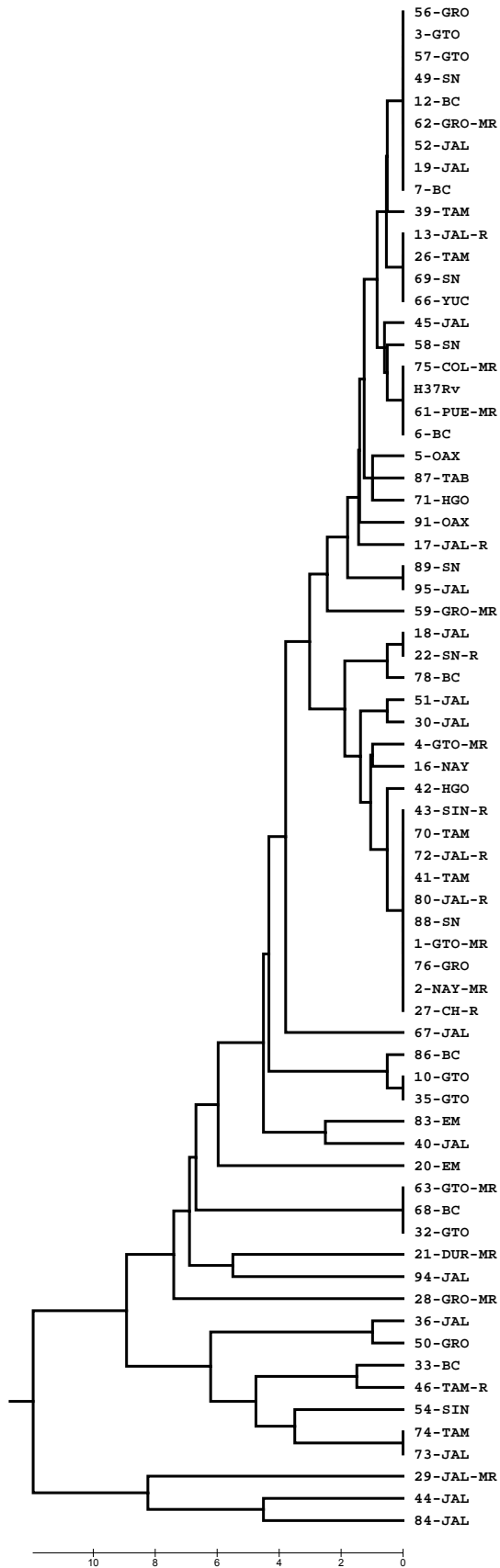


Figura 11. Clasificación de los espoligotipos en Infección tuberculosa Focal

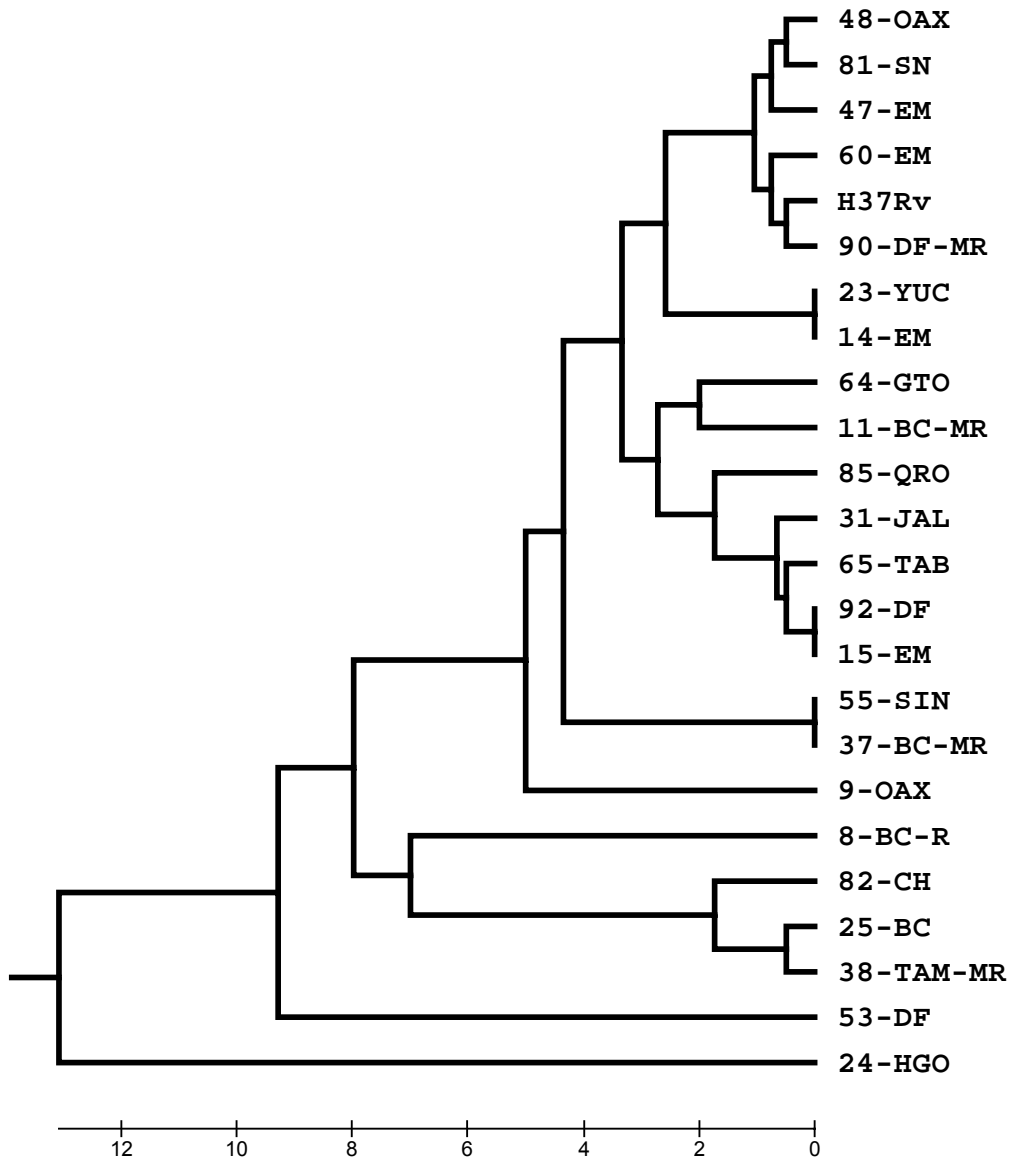


Figura 12. Clasificación de los espoligotipos en Infección tuberculosa Diseminada

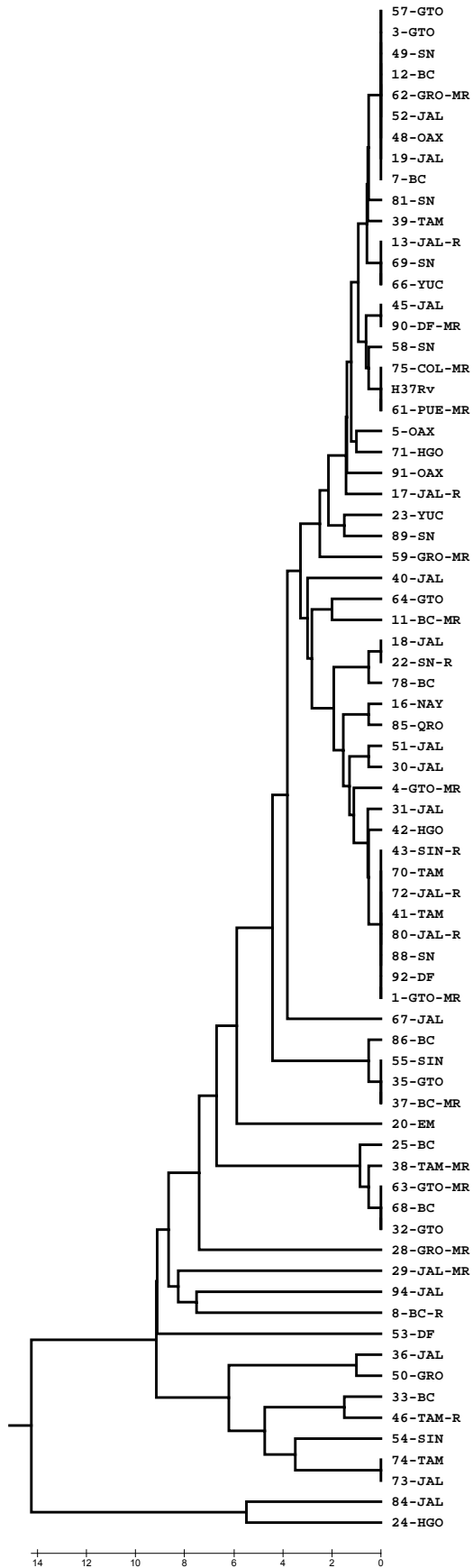


Figura 13. Clasificación de los espoligotipos en Mayores de 14 años.

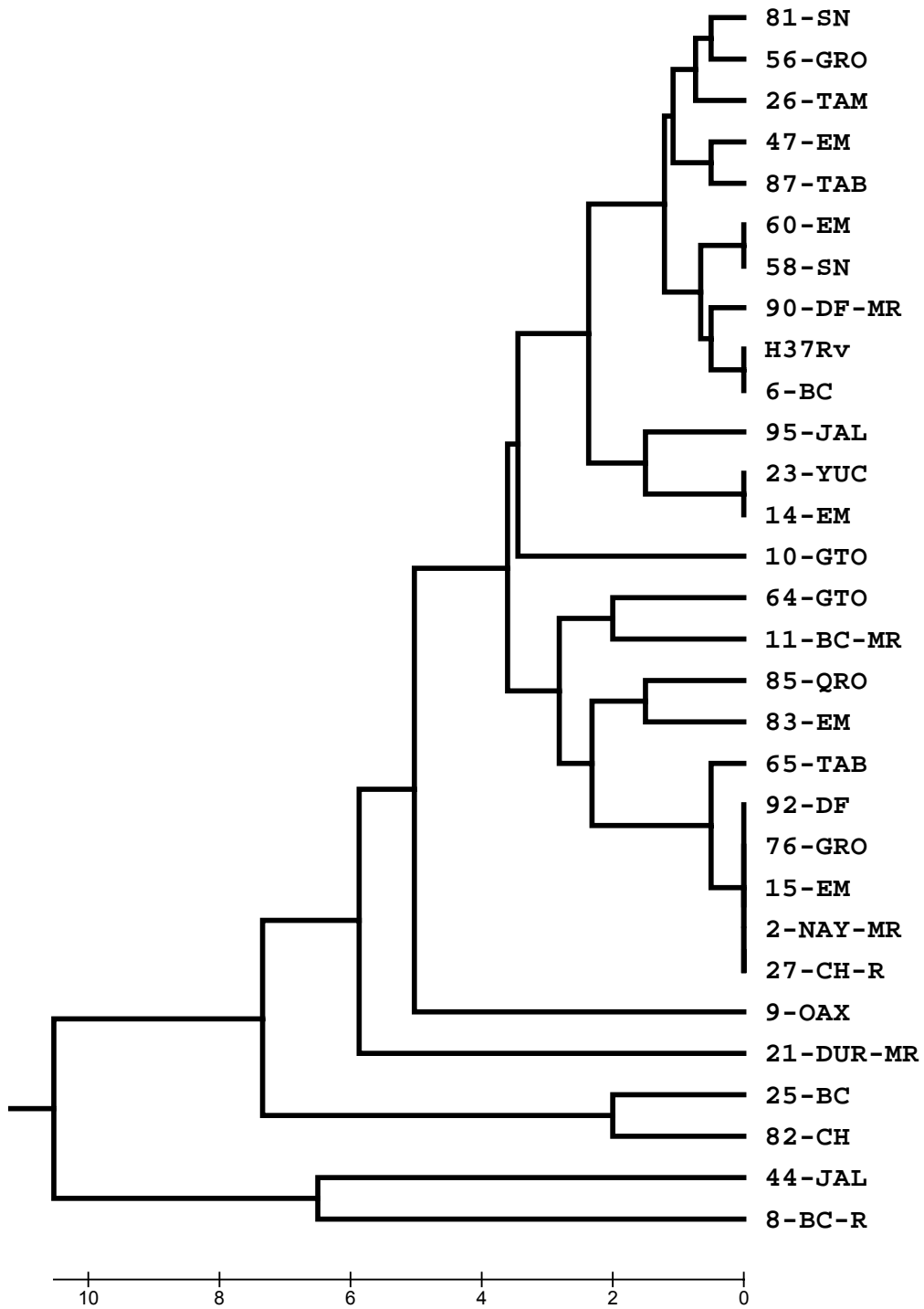


Figura 14. Clasificación de los espoligotipos en Mayores de 5 años y Menores de 14 años

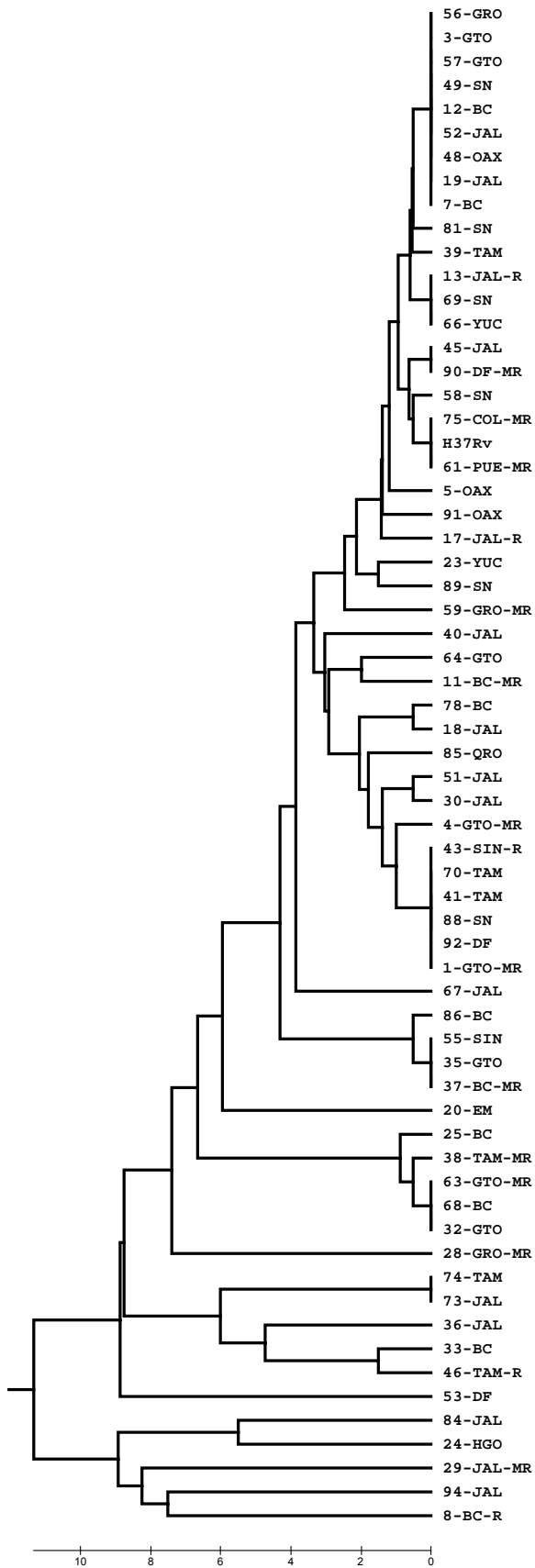


Figura 15. Clasificación de los espigotipos en Mayores de 15 años

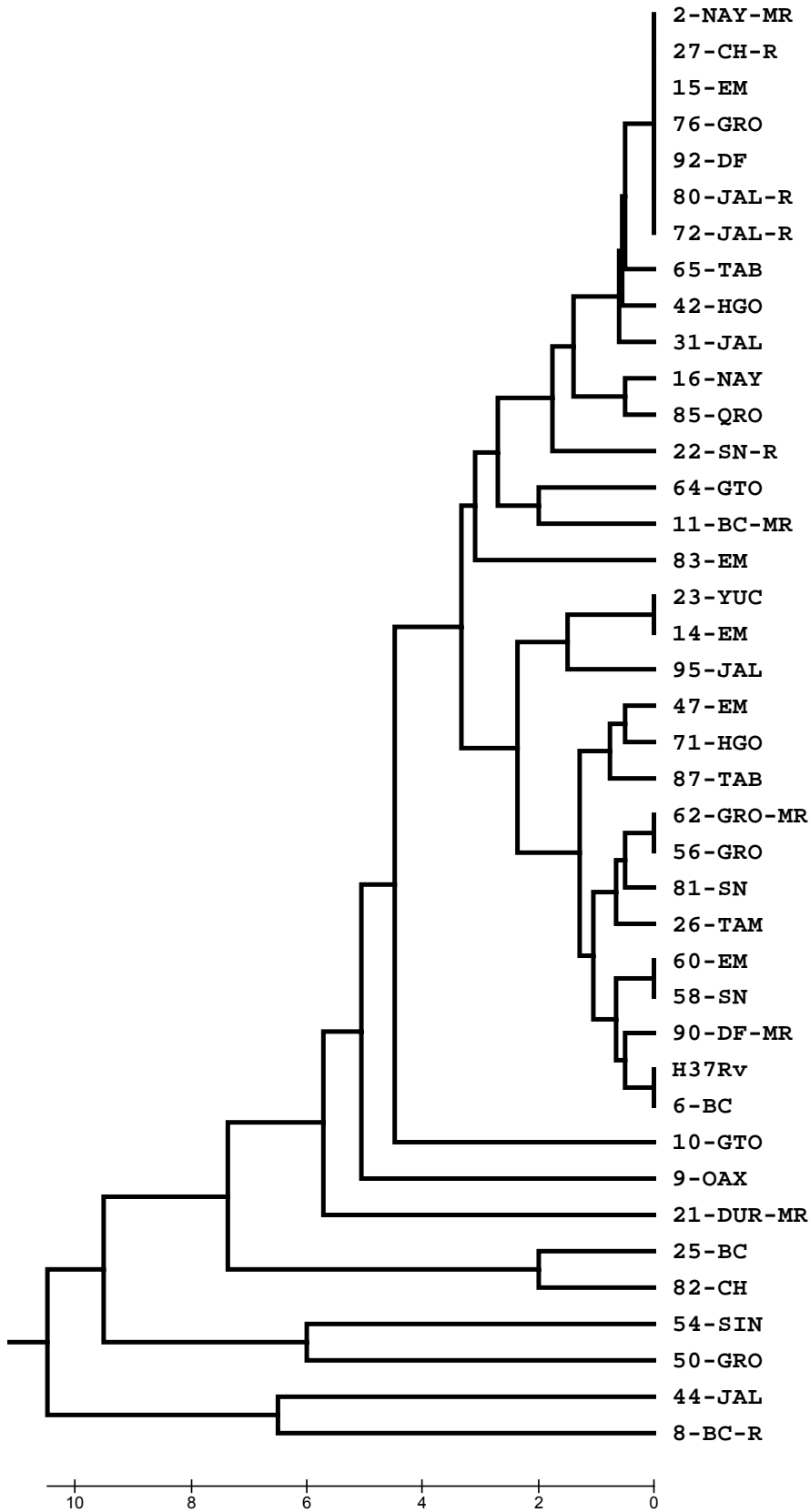


Figura 16. Clasificación de los espoligotipos en Mayores de 5 años y Menores de 15 años

DISCUSIÓN

En nuestro conocimiento este es el primer informe en México de resistencia a fármacos antituberculosos primarios que incluye exclusivamente población pediátrica y se realizó con el propósito de tener una estimación acerca de la prevalencia global de resistencia a los fármacos antituberculosos en este grupo de edad.

Se encontró una elevada frecuencia de resistencias para las drogas antituberculosas primarias, uno de cada cuatro resultó resistente al menos a un fármaco. La resistencia a isoniazida en forma aislada o en combinación con otros medicamentos antituberculosos fue la de mayor prevalencia con una resistencia global del 23%, lo que resulta mayor al 18% reportado en estudios poblacionales en nuestro país¹⁶ y similar a los estudios realizados por otros autores en poblaciones seleccionadas²⁰, no obstante se han reportado mayores tasas de resistencia que oscilan del 29% al 56% en los estudios realizados en Chiapas y Veracruz^{69,70}.

Se ha considerado que la prevalencia de resistencia a isoniazida del 4% o más es indicación de utilizar un cuarto fármaco (myambutol o estreptomina), para garantizar el éxito terapéutico, medida que fue adoptada en México a partir del año 2000 como parte de la estrategia TAES (Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud).

Llama la atención la magnitud de la resistencia a rifampicina (11%) lo que resulta muy elevado en relación a lo informado en estudios poblacionales realizados en nuestro país. En este estudio este fenotipo se asoció a MDR como ha sido informado por otros autores²⁰, lo que adquiere gran relevancia porque tanto la rifampicina como la isoniazida constituyen un elemento fundamental en la estrategia TAES y la presencia de MDR tiene implicaciones

logísticas por la necesidad de realizar pruebas de sensibilidad y el uso de fármacos de segunda línea.

El impacto de la MDR es evidente, ya que marca una mayor probabilidad de fracaso terapéutico y menor sobrevida, con un riesgo para mortalidad estimado en (RR 2.5 IC95% 1.02-6.16 $p=0.04$)⁷⁰. En función del número limitado de la muestra en este estudio, es difícil comparar los resultados en cuanto a mortalidad aunque aparentemente es menor a lo reportado en otras series ⁷¹.

No se observaron nichos en la distribución de las cepas resistentes.

En dos pacientes se documentó coinfección con VIH/SIDA, en uno diabetes y en uno mas, alcoholismo que son considerados como factores de riesgo para la presencia de cepas de *M. tuberculosis* resistente. En este estudio estos factores no contribuyeron a una mayor resistencia antimicrobiana, sin embargo, esto es difícil de evaluar debido al pequeño número de casos y a diferencia en la población estudiada.

Se observó que la edad fue significativamente mayor en pacientes con tuberculosis MDR, en la literatura la MDR se ha relacionado con una mayor exposición con enfermos con tuberculosis a través del tiempo o a una terapia encubierta.

El antecedente de tratamiento previo es un predictor de resistencia, en este estudio el 20% había reingresado a tratamiento debido a falla terapéutica, lo que puede ser un factor que incrementa el riesgo de transmisión de cepas resistentes.

Estos resultados resaltan la importancia de contar con estudios poblacionales que se realicen en forma periódica para conocer la prevalencia e incidencia de la resistencia y así establecer las estrategias adecuadas para el control de la tuberculosis en nuestro país.

La geotipificación de las 91 cepas estudiadas mostró que en las entidades federativas incluidas existe una gran diversidad en los genotipos circulantes, lo cual es común en países en donde la tuberculosis es endémica y existe un gran número de cepas circulantes. En los conglomerados encontrados se observó que éstos no se asocian al origen de la cepa, siendo los espoligotipos más prevalentes el E1 y E31, conformados por 10 y 12 aislamientos respectivamente. De los 24 aislamientos que presentaron resistencia, no se encontró ninguna asociación entre el genotipo y la resistencia a uno o varios de los antituberculosos, sin embargo, el genotipo E31 concentró el 25% de las cepas resistentes las cuales provinieron de cinco entidades federativas. Otro de los hallazgos encontrados fue que tanto en el año 2002 como en el 2003 los genotipos E1 y E31 fueron los de mayor prevalencia y en ambos casos más del 50% de los aislamientos presentaron genotipos únicos. Adicionalmente se encontró un aislamiento en el estado de Jalisco que presentó el genotipo Beijín, que ha sido poco referido en México y epidemiológicamente es de gran importancia si tenemos en cuenta que este es el genotipo prevalente en Asia ⁷³. A pesar de ser un número reducido de cepas en relación a los casos notificados en las 19 entidades federativas incluidas, la muestra ilustra la gran diversidad de genotipos circulantes en la comunidad, los cuales deberán ser comparados con los observados en población adulta.

Las limitantes del estudio son: sesgo de referencia (identificación de casos, muestras no aleatorizadas procedentes de pacientes hospitalizados), el número limitado de cepas y de entidades federativas. Por lo que pueden no ser representativas de la población general.

Otras limitantes incluyen la dificultad de obtener información completa de los pacientes y el análisis de los resultados a corto plazo que dificulta evaluar la eficacia del tratamiento.

CONCLUSIONES

La resistencia de *M. tuberculosis* a antituberculosos primarios y la MDR encontrada en este estudio fue mayor a la estimada en la población general.

El antecedente de tratamiento previo fue un factor de riesgo para la presencia de cepas MDR.

Existe una gran diversidad de genotipos circulantes en la comunidad.

El patrón de resistencias no guardó ninguna asociación con algún genotipo específico.

No se encontraron diferencias significativas en relación a la prevalencia de cepas resistentes en las diferentes entidades federativas.

Se requiere contar no solo con laboratorios, sino tener programas y actividades coordinadas que permitan identificar en forma temprana y confiable la presencia de resistencia y de esta manera ofrecer a los pacientes un tratamiento adecuado y disminuir el riesgo de transmisión.

La OMS en general recomienda la baciloscopias como la base para el inicio del tratamiento antituberculoso. En los niños la realización de cultivo con la determinación de su sensibilidad resulta de gran utilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Starke J. Current Chemotherapy for tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 6:215-236.
2. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991; 72:1-6.
3. Dye C, Snee S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement: global burden of tuberculosis estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999; 282:677-86.
4. American Thoracic Society. Treatment of tuberculosis and tuberculous infection in adults and children. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 355-363.
5. Starke JR, Taylor-Watts KT. Six months chemotherapy of intrathoracic tuberculosis in children. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(suppl 1):A314.
6. Khubchandani RP, Kunta NB, Bharucha NB et al. Short-course chemotherapy in childhood pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141 (suppl):A338.
7. Ibanez S, Ross G. Quimioterapia abreviada de 6 meses en tuberculosis pulmonar infantil. *Rev Chil Pediatr* 1980; 51:249-252.
8. Varudkar BL. Short-course chemotherapy for tuberculosis in children. *Indian J Pediatr* 1985; 52:593-597.
9. Biddulph J. Short course chemotherapy for childhood tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9:794-801.
10. Medical Research Council Tuberculosis and Chest Disease Unit. Management and outcome of chemotherapy for childhood tuberculosis. *Arch Dis Child* 1989; 64:1004-1012.
11. Kumar L, Dhand R, Singhi PD et al. A randomized trial of fully intermittent vs daily followed by intermittent short-course chemotherapy for childhood tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9:802-806.

12. American Academic of Pediatrics Chemotherapy for tuberculosis in Infants and children Pediatrics 1992;89:161-165.
13. Olvera R., Rodríguez SF., Perez LE., Villalba JC. Experiencia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias sobre drogo resistencia Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2001,29; 18:1-3.
14. Lazlo A, Cantor IN. A random simple survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin America Bull World Health Organ 1994;84; 603-610.
15. García García ML, Valdespino Gomez JL, Palacios Martinez M et al Tuberculosis and AIDS in Mexico Salud Pública Mex 1995;37:539-548.
16. Centers for Disease Control Population based survey for drug resistance of tuberculosis-Mexico, 1997 MMWR 1998,47;18: 371-5.
17. Population based Survey for drug resistance of tuberculosis Mexico 1997 JAMA 1998,280;1:14-5.
18. Garcia, Garcia ML, Ponce de Leon A, Jimenez Corona ME, Jimenez Corona A, Palacios Martinez M et al. Clinical consequences and transmissibility of drug resistant tuberculosis in Southern Mexico. Arch Intern Med 2000;160:630-636.
19. Garcia, Garcia ML, Ponce de Leon A, Jimenez Corona ME, Jimenez Corona A, Palacios Martinez M et al. Mycobacterium tuberculosis drug resistance in a suburban community in southern Mexico. Int J Tuberc Lung Dis- 2000, 4;(12Suppl 2):S168-70.
20. Sifuentes Osornio J, Camacho Mezquita F:E, Bobadilla del Valle J:M, Infante Suarez ML, Ramírez Fernández N, Hernández Gómez L, Nelson AM. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos, características clínicas y factores de riesgo Rev Invest Clin 1995; 47: 273-81.

21. Williamson Z Bradford MD, Daley Ch L. Multiple drug resistance tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am* 1998;12:157-173.
22. David HL:Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected population of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol* 1970;20: 810-814.
23. Riska PF, Jacobs WR Jr, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000,4: S4-S10.
24. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidhemi T, Bodmer T Direct automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents chemother* 1993;37:2054-2058.
25. Morris S, Bai G, Suffys P, Portillo Gómez L, Fairchock M, Rouse D. Molecular mechanism of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1995;171:954-960.
26. Kapur V. L.i.l.Iordanescu S, Hanrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN et al. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York city and Texas. *J Clin Microbiol* 1994;32:1095-1098.
27. Hui J, Gordon N, Kahoika R. Permeability barrier to rifampin in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;1:773.
28. Rouse DA, Morris SL, Molecular mechanism of isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis*. *Infect Immunol* 1995;63: 1427-1433.
29. Zhang Y, Heym B., Allen B., Young D. Cole S. The catalasa peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992; 38: 591-593.

30. Kelley CL, Rouse DA, Morris SL Analysis of *aphC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2057-2058.
31. Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D et al. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science* 1998;280:1607-1610.
32. Jackett PS, Aber VR, Mitchison DA: The relationship between nicotinamide-adenine-dinucleotide concentration and antibacterial activity of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Resp Dis* 1977;115:601.
33. Deretic V, Philipp W, Dhandayuthapani S et al *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene implications for sensitivity for isoniazid. *Mol Microbiol* 1995;17:889.
34. World Health Organization Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUATLD global project on antituberculosis drug resistance surveillance 1994-1997. WHO/Tb/97.229 Geneva. World Health Organization. 1997.
35. Weis SE, Slocum PC, Blai FX et al. The effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. *N Engl J Med* 1994;330:1179-1184.
36. Blower SM, Small PM, Hopewell PC, Control strategies for tuberculosis epidemics: new models for old problems. *Science* 1996;273:497-500.
37. Mahmoudi A, Iseman MD Pitfalls in the care of patients with tuberculosis common efforts and their associations with acquisition of drug resistance. *JAMA* 1993;270:65-68.

38. The American College of Chest Physicians Preventing multidrug resistant tuberculosis and errors in tuberculosis treatment around the globe. *Chest* 2000;117.
39. World Bank: World Development Report 1993: Investing in Health. New York, Oxford University Press, 1993.
40. Metchock B.G. F.S. Nolte, and R.J. Wallace *Mycobacterium* In P.R. Murray, E. J. Baron M.A. Pfaller, C.F. Tenover, and R.H. Tenover. (ed.) Manual of clinical microbiology. American Society of Microbiology Washington D.C. 199 p 399-4337.
41. Drancourt M, Carrieri P, Gévaudan M.J. and Raoult D. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: The end of a dogma. *J Clin Microbiol* 2003;1710-1711.
42. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques W:B: Saunders Co. *Infect Dis Clin North Am* 2002;16.
43. Sreevatsan S et al Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9869-9874.
44. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE and Kreiswirth BN Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trend in Microbiol* 2002;10:45-52.
45. Kremer K, van Soolingen R. Frothingham W. H. Haas P.W.M. Hermans, C.Martin P. Palittapongarnpim, B.B. Plycaytis L. W. Riley, M.A. Yahrus J. M. Musser, and J.D.A. van Embden Comparission of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607-2618.

46. Kato-Maeda M, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla del Valle M et al. Drug resistance among negative acid-fast bacilli (Letter). *Lancet* 1999; 352: 1709.
47. Kato-Maeda M, Small PM How molecular epidemiology has changed that we know about tuberculosis. *Est J Med* 2000;172:256-259.
48. Small P Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross contamination in the mycobacteriology laboratory and modifications of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol* 1993;31:1677-1682.
49. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R et al Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2807-2618.
50. Heersma HF, Kremer K, van Embden JD. Computer analysis of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* 1998: 101: 395-422.
51. Prod'hom G, Guilhot C, Gutierrez MC et al. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J Clin Microbiol* 1997: 35: 3331-34.
52. Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998: 36: 486-92.
53. Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, Millar MR. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1994: 32: 2169-74.

54. Butler WR. Haas WH. Crawford JT. Automated DNA fingerprinting analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. J Clin Microbiol 1996; 34: 1801-803.
55. Kearns AM. Barret A. Marshall C et al. Epidemiology and molecular typing of an outbreak of tuberculosis in a hostel for homeless men. J Clin Pathol 2000; 53: 122-24.
56. Patel S. Wall S. Saunders NA. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1996; 34: 1686-90.
57. Sola C. Horgen L. Maisetti J et al. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 1122-24.
58. Goguet-de-la-Salmoniere Y(). Li HM. Torrea G et al. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997; 35: 2210-14.
59. Wilson SM. Goss S. Drobniowski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a Mycobacterium reference unit. J Clin Microbiol 1998; 36: 3385-88.
60. Aranaz A. Liebana E. Mateos A. Dominguez L. Cousins D. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. Rev Microbiol 1998; 61: 311-24.
61. Diaz R. Kremer K. De Haas PE et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana. July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 743-50.

62. Kamerbeek J. Shouls L. Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-14.
63. Van Embden JD. Van Gorkom T. Kremer K et al. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. J Bacteriol 2000; 182: 2393-401.
64. Bonora S. Gutierrez MC. Di Perri G et al. Comparative evaluation of ligation-mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 3118-23.
65. Driscoll JR. McGarry MA. Taber HW. DNA typing of a nonviable culture of *Mycobacterium tuberculosis* in a homeless shelter outbreak (letter). J Clin Microbiol 1999; 37: 274-75.
66. Van der Zanden AG. Hoentjen AH. Heilmann FG et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. Mol Pathol 1998; 51: 209-14.
67. Friedman CR. Stoeckle MY. Kreiswirth BN et al. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a large urban setting. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 355-59.
68. Sola C., Horgan J, Maisetti A, Devalois K.S. Gohn and N Rastogi. Spoligotyping followed by double-repetitive elements PCR as a rapid alternative to IS110 fingerprint for epidemiological studies of tuberculosis J Clin Microbiol 1998;38:1122-1124.
69. Peter CR, Schultz E, Moser K et al Drug-resistant pulmonary tuberculosis in the Baja California San Diego County border population. West J Med. 1998; 169:208-213

70. García-García Ma. L, Jiménez Corona Ma. E, Ponce de León A, Jiménez-Corona M, Martínez-Palacios M et al Mycobacterium tuberculosis drug resistance in a suburban community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:S168-S170
71. García García Ma de L, Sifuentes –Osornio J, Jiménez Corona M E y cols Resistencia de Mycobacterium tuberculosis a los antimicrobianos en Orizaba, Veracruz. Implicaciones para el programa de prevención y control de la tuberculosis. *Rev Invest Clin* 2001;53:315-323
72. Bifani PJ Identification of a W variant outbreak of M. tuberculosis via population based molecular epidemiology. *J. Am. Med. Assoc.* 199; 282: 2321-2327
73. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE. and Kreiswirth N Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijin family strains. *Microbiol*; 2002; 1:45-52

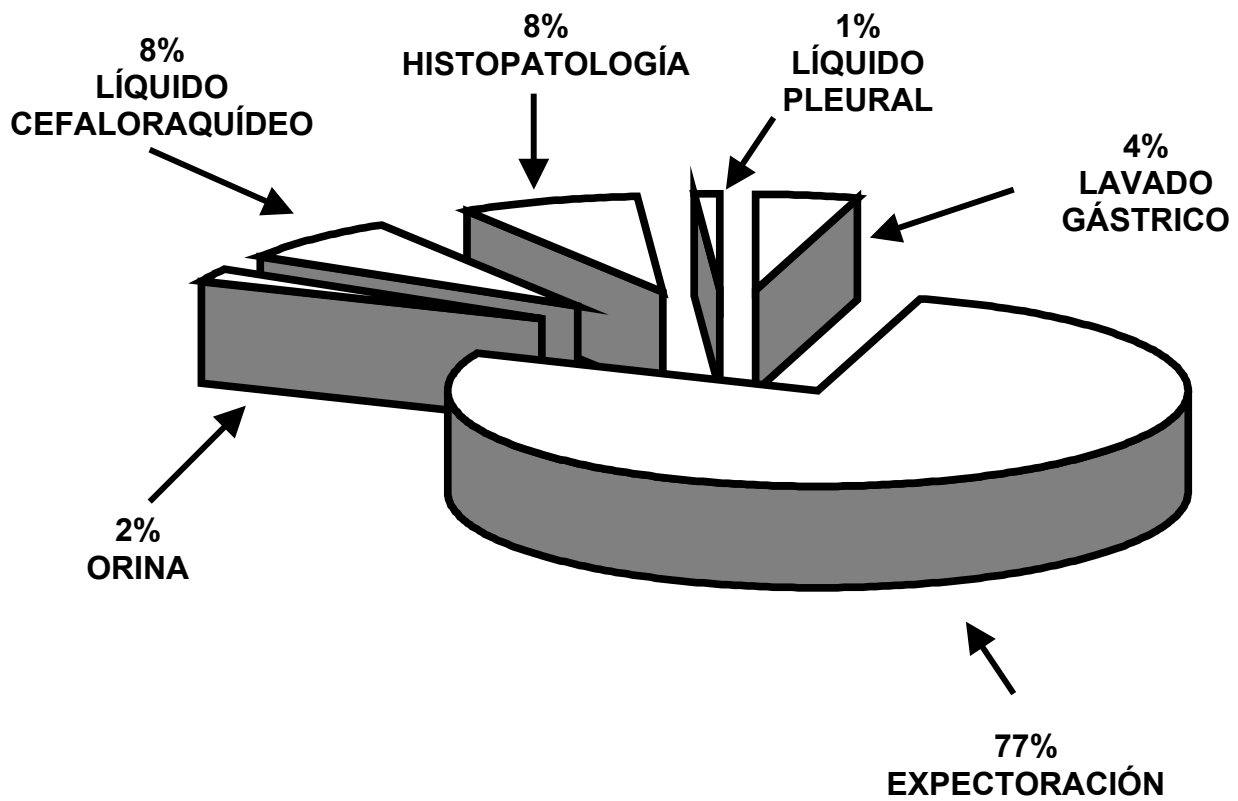
Cuadro 1. Número de casos de Tuberculosis en las diferentes Entidades Federativas de la República Mexicana, en menores de 19 años en relación al número de cepas de *M. tuberculosis* enviadas al INDRE

ENTIDAD FEDERATIVA	2002					2003				
	CASOS	CEPAS	%	R	MDR	CASOS	CEPAS	%	R	MDR
BAJA CALIFORNIA	274	9	3.2	2	1	202	2	0.9	0	0
CHIAPAS	208	1	0.4	1	0	215	1	0.4	0	0
COLIMA	7	0	0	0	0	12	1	8.3	0	1
DURANGO	20	1	5.0	0	1	22	0	0	0	0
D.F	67	2	2.9	1	0	48	1	2.0	0	0
EDO. DE MÉX.	136	4	2.9	0	0	47	2	4.2	0	0
GUANAJUATO	45	7	15.5	1	2	48	2	4.1	0	0
GUERRERO	98	2	2.0	1	0	118	4	3.4	0	2
HIDALGO	33	2	6.0	0	0	28	1	3.6	0	0
JALISCO	113	13	11.5	1	2	114	7	6.1	1	0
NAYARIT	47	2	4.2	1	0	24	0	0	0	0
OAXACA	80	4	5.0	0	0	94	0	0	0	0
PUEBLA	38	1	2.6	0	1	46	0	0	0	0
QUERÉTARO	0	0	0	0	0	22	1	4.5	0	0
SINALOA	73	5	6.8	2	0	74	5	6.7	0	0
TABASCO	45	1	2.2	0	0	50	1	2.0	0	0
TAMAULIPAS	101	5	4.9	2	0	84	2	2.3	0	0
YUCATÁN	15	1	6.6	0	0	14	1	7.1	0	0

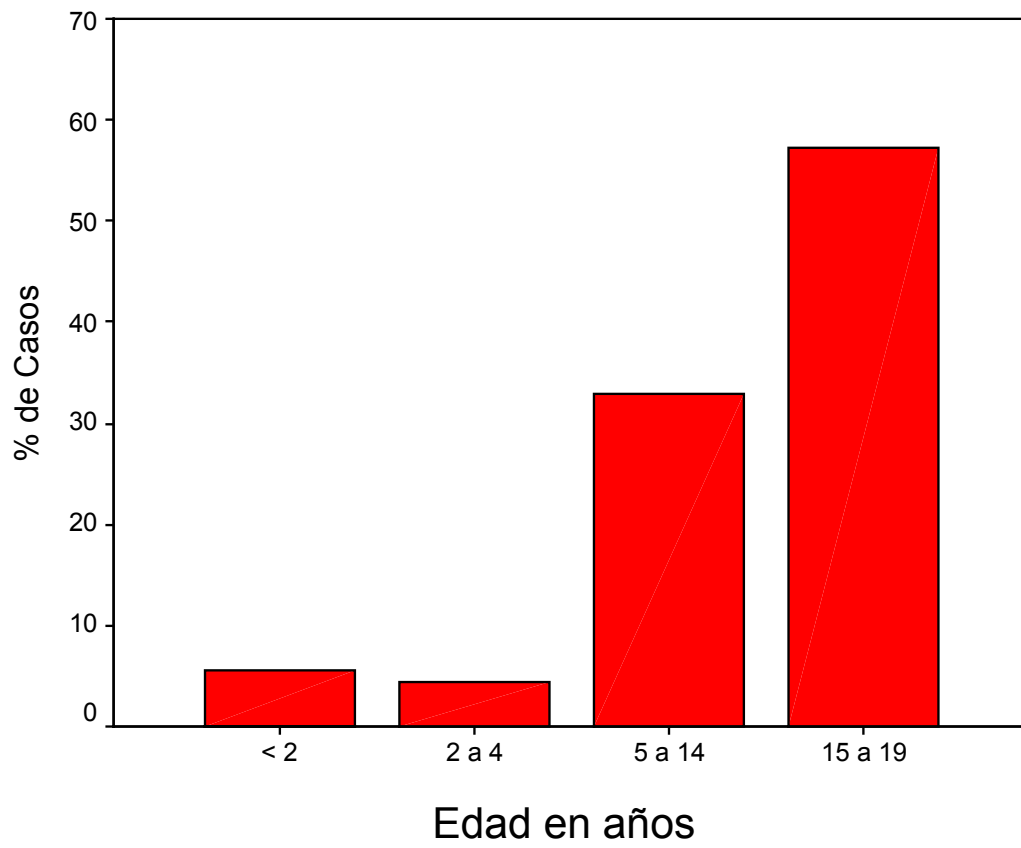
DGE/SSA

Cuadro 2. Resistencia a los antituberculosos primarios *							
NUMERO DE FÁRMACOS	TOTAL	H	S	R	Z	E	
UNO	8 (9)	5(23.8)	3(21.2)				
DOS	6 (6)	6(28.5)	2(18.1)	2(20)	1(12.5)	1(11.1)	
TRES	5 (5)	5(23.8)	2(18.1)	3(30)	2(25)	3(33.3)	
CUATRO	1 (1)	1(4.7)		1(10)	1(12.5)	1(11.1)	
CINCO	4 (4)	4(19)	4(36.3)	4(40)	4(50)	4(44.1)	
TOTAL	24(26)	21(23)	11(12)	10(11)	8(8)	9(10)	

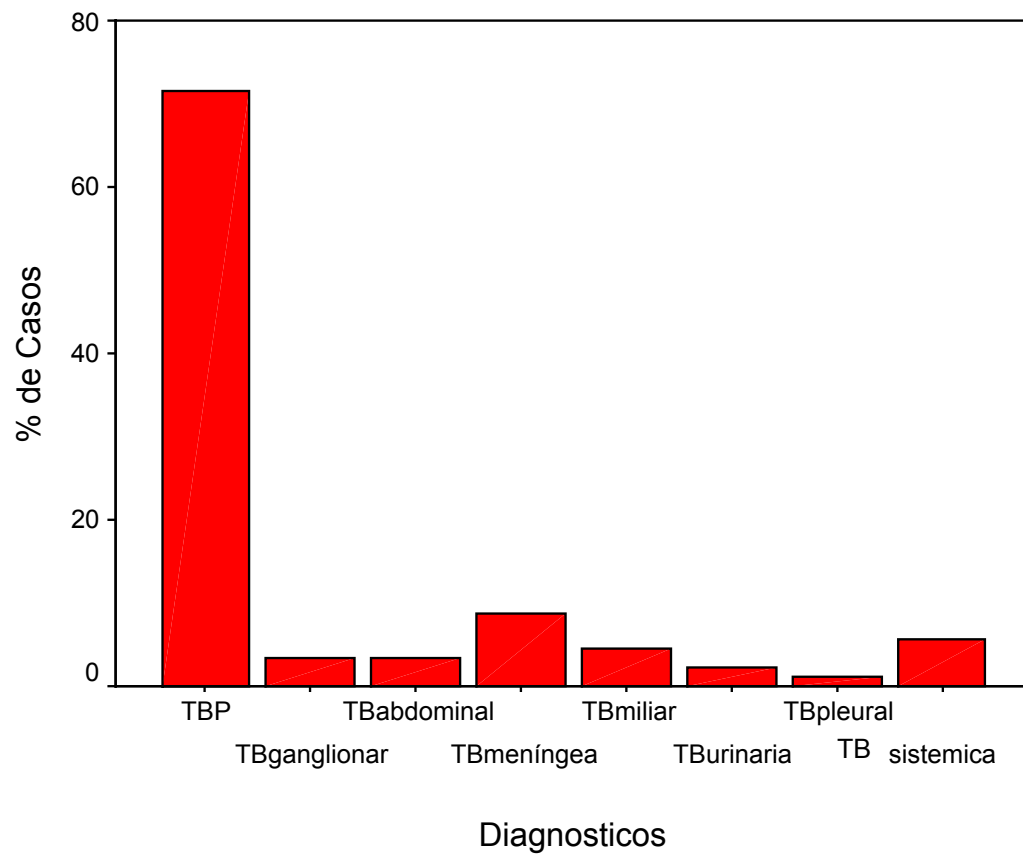
* El número en paréntesis señala %.



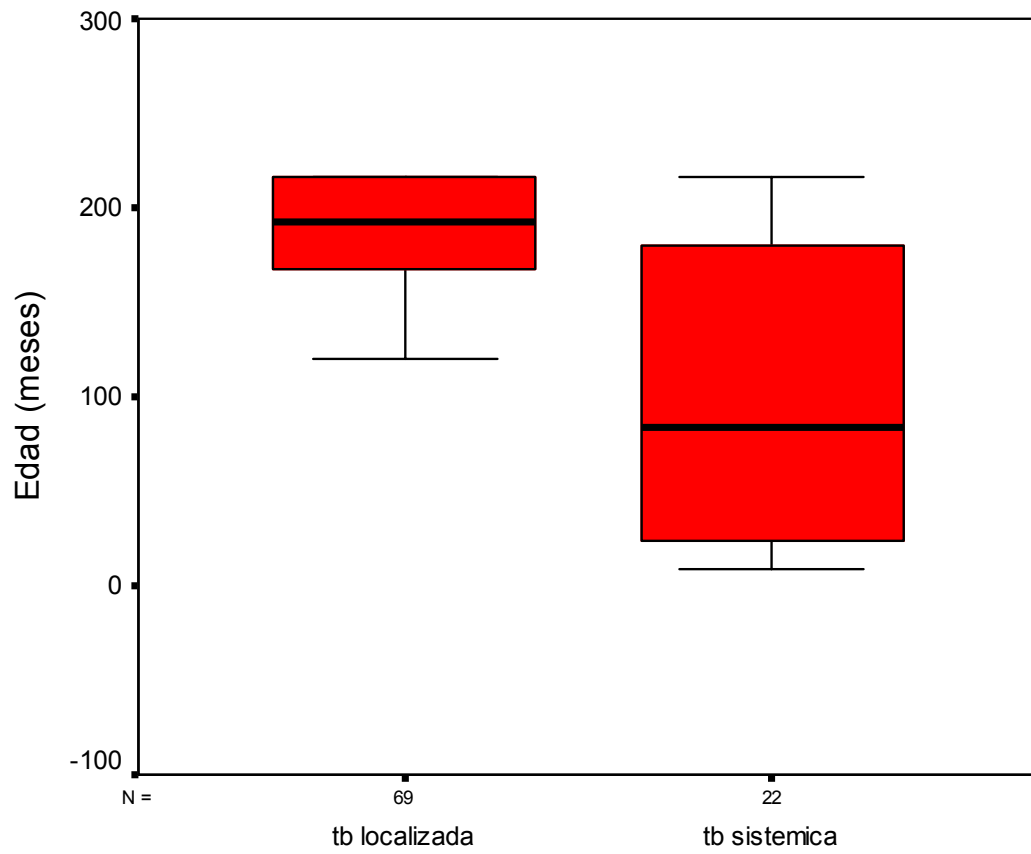
Gráfica 1. Sitio de aislamiento en porcentaje



Gráfica 2. Distribución por grupos de edad



Gráfica 3. Formas clínicas de Tb



Gráfica 4. Edad en relación a formas clínicas de Tb

Cuadro 3. Patrones de resistencia en cepas de *M. Tuberculosis* en las diferentes Entidades Federativas

ENTIDAD FEDERATIVA	FÁRMACOS							
	N	S	H	R	E	Z	MDR	R GLOBAL
					%			%
JALISCO	20	2(10)	3(15)	2(10)	0	1(5)	2(10)	25
BAJA CALIFORNIA	11	2(18)	2(18)	1(9)	1(9)	2(18)	1(9)	36
SINALOA	10	0	2(20)	0	0	0	0	20
GUANAJUATO	9	3(33)	3(33)	2(22)	3(33)	2(22)	2(22)	33
GUERRERO	6	2(28)	3(43)	2(28)	2(28)	2(28)	2(28)	50
TAMAULIPAS	7	1(14)	2(28)	0	0	0	0	28
D.F.	3	0	1(33)	0	1(33)	0	0	33
CHIAPAS	2	0	1(50)	0	0	0	0	50
NAYARIT	2	1(50)	1(50)	0	0	0	0	50
PUEBLA	1	0	1(100)	1(100)	1(100)	0	1(100)	100
DURANGO	1	0	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	100
COLIMA	1	0	1(100)	1(100)	0	0	1(100)	100
EDO. DE MÉX.	6	0	0	0	0	0	0	0
OAXACA	4	0	0	0	0	0	0	0
HIDALGO	3	0	0	0	0	0	0	0
YUCATÁN	2	0	0	0	0	0	0	0
TABASCO	2	0	0	0	0	0	0	0
QUERÉTARO	1	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	91	11(12)	21(23)	10(11)	9(10)	8(9)	10(11)	26

* El número en paréntesis señala %.

Cuadro 4. Patrones de sensibilidad en relación a sectorización geográfica

REGIÓN	SENSIBILIDAD			TOTAL	p=
	SENSIBLE	RESISTENTE	MDR		
1.NORTE	22	7	3	32	
2.CENTRO	37	7	7	51	
3.SUR	8	0	0	8	
TOTAL	67	14	10	91	.3

Cuadro 5. Factores de riesgo para falla al tratamiento o mortalidad

EGRESO	SENSIBILIDAD			TOTAL	p=
	SENSIBLE	RESISTENTE	MDR		
ALTA	41	11	4	56	
DEFUNCIÓN	4	1	1	6	(9)
ABANDONO	1	0	1	2	(3)
FRACASO	0	0	1	1	(1)
TOTAL	46	12	7	65	.049

* El número en paréntesis señala %.