

Artículo invitado

Caracterización molecular y susceptibilidad antibiótica de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes que acuden a un hospital urbano en Guatemala

*Samayoa, B., Xet Mull, A., Velásquez T., Lau, D., Paz, L.

Escuela de Química Biológica, Escuela de Experiencias Docentes con la Comunidad –EDC-, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC)

RESUMEN

Los objetivos de esta investigación fueron la caracterización de patrones genéticos, susceptibilidad antibiótica y factores epidemiológicos asociados a infecciones producidas por cepas de *M. tuberculosis*. Para este estudio se obtuvieron cepas provenientes de pacientes que acudieron del año 2000 al 2002 al Hospital General San Juan de Dios por medio de revisión de expedientes médicos.

Para la caracterización molecular se utilizó el método de subtipificación denominado Dobles Elementos Repetidos-Reacción en Cadena de la Polimerasa (DRE-PCR); la susceptibilidad antibiótica fue realizada a través del método modificado de las proporciones. La información epidemiológica se obtuvo a través de la revisión de expedientes médicos. Los datos se ingresaron en bases de datos y se analizaron por medio del programa estadístico SPSS versión 10.

En el análisis molecular se encontró que el 74% de 246 cepas de micobacterias evaluadas presentaron patrones genéticos agrupados y el 26% patrones únicos, lo que indica la ocurrencia simultánea de infecciones recientes y reactivaciones. En la evaluación de susceptibilidad antibiótica, 81% de 95 cepas fueron susceptibles a las cuatro drogas antituberculosas (rifampicina, isoniacida, etambutol y estreptomycin); 5.3% presentaron resistencia a al menos una droga y 6.7% fueron catalogadas como multiresistentes, éstas últimas cepas se aislaron de muestras pulmonares. La resistencia a drogas se observó en 7 cepas con patrones genéticos agrupados, provenientes de personas infectadas o no con VIH, residentes de zonas endémicas y algunos que estuvieron privados de libertad.

En conclusión, en esta muestra de pacientes, la infección por micobacterias puede ser reciente, reactivada o bien pueden estar ocurriendo simultáneamente, la resistencia antibiótica a las drogas antituberculosas y la infección por VIH, esta señalando que deben efectuarse cambios drásticos inmediatos en el manejo, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la tuberculosis en pacientes que acuden a centros hospitalarios.

INTRODUCCIÓN

En 1995, la tuberculosis (TB) causó más de 75,000 muertes en Latino América y el Caribe. Esto significa que cerca de 1,100 personas enfermaron y más de 200 murieron por TB cada día. Para Guatemala en el año 2000 la OMS reportó una tasa de incidencia de 80 por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, el incremento de los casos de TB se asocia a factores como: el desmantelamiento y la debilidad de los programas de control de la TB, la crisis económica y el crecimiento de las poblaciones marginales urbanas y rurales, la expansión de la epidemia del virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) y el incremento en la migración.

La epidemia de VIH/SIDA está creando nuevos retos para el control de la TB en la región. OPS estima que más de 330,000 personas están co-infectadas con *M. tuberculosis* y el VIH en Latino América y el Caribe. Guatemala tiene una de las tasas acumuladas más altas de VIH/SIDA en la región (76 X 10⁶), solo después de Belize, Honduras, Estados Unidos de América, Brasil y Panamá. Para 1996, la prevalencia de VIH en pacientes guatemaltecos con TB fue de 5.4%.

* Aquí la correspondencia debe dirigirse:
Tel.: 476-9868 E-mail: mosamayoa@guate.net

La co-morbilidad con VIH/SIDA altera la dinámica de la tuberculosis, ya que favorece la reactivación de la enfermedad, favorece la progresión de la infección primaria o de la re-infección hacia la enfermedad, promueve la transmisión a otras personas susceptibles (incluyendo personas VIH negativo) y además promueve la circulación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas.

La situación de la TB a nivel mundial se ha agravado con el apareamiento de cepas multiresistentes a las drogas antituberculosas, que incrementan las tasas de mortalidad y representan un serio problema para el control de esta enfermedad.

Por lo anterior es importante comprender la dinámica de la TB en Guatemala, lo que significa determinar la proporción de la enfermedad debido a infección primaria o a reactivación y sus factores asociados, la patogenicidad de cepas circulantes de *M. tuberculosis* (resistencia a drogas, potencial de transmisibilidad, curso de la enfermedad, grupos de patrones genéticos iguales o similares), la resistencia a drogas debida al incumplimiento del tratamiento (resistencia adquirida) y/o la diseminación de cepas resistentes (resistencia primaria), los grupos más afectados con la enfermedad (grupo étnico, edad, sexo, residencia, estatus socioeconómico, etc) y finalmente el riesgo de infección nosocomial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

Aproximadamente 400 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios en la ciudad de Guatemala, durante el período del 01/02/2000 al 15/10/2002.

Lugar de estudio: Hospital General San Juan de Dios en la ciudad de Guatemala.

Técnicas de DRE-PCR para la caracterización epidemiológica de *M. tuberculosis*

La metodología descrita puede ser usada para identificar cepas individuales de *Mycobacterium tuberculosis* por generación de un único patrón de fragmentos amplificados, definido como una "huella genética". Este se alcanza usando dos pares de primers. Un par se dirige hacia la secuencia de inserción repetitiva IS6110, mientras que el otro es

dirigido a las secuencias repetidas polimórficas ricas en GC (PGRS). Cada par de primers está orientado de tal forma que los primers amplifican la región entre los elementos repetitivos. Debido a que esos elementos están distribuidos diferentemente a través del genoma bacterial de las diferentes cepas de *M. tuberculosis*, cada cepa genera un patrón diferente.

Técnica para susceptibilidad antibiótica de micobacterias

El método de las proporciones fue seleccionado por las condiciones de laboratorio con las que se cuenta actualmente, se considera reproducible y exacto. El mismo consiste en utilizar los antibióticos seleccionados a diferentes concentraciones. El antibiótico se incorpora al agar Middlebrook 7H10 y se prepara en cajas de Petri de cuatro cuadrantes. Diluciones estandarizadas de las micobacterias son inoculadas en el agar con antibiótico. Las cajas de Petri se colocan en una incubadora a 37°C y se observan durante 2 a 3 semanas para detectar crecimiento. Si en un cuadrante se observa crecimiento de micobacterias en una proporción de más del 1% del crecimiento que se observa en el cuadrante libre de antibiótico, se considera resistente al antibiótico analizado. El método de las proporciones (indirecto) fue probado sobre cepas ATCC de micobacterias para el control de calidad.

Obtención de muestras

Todas las micobacterias utilizadas en este estudio provienen del cepario de micobacterias obtenido durante los proyectos DIGI-2000 y 2001. También fueron incluidas todas aquellas cepas aisladas en el transcurso de este proyecto.

Capacitación docente

En este estudio se continuó con la capacitación a todos los estudiantes de EDC que ingresen al área de Microbiología. En el mismo se incluyeron tópicos como procesamiento de muestras, observación directa, cultivo, aislamiento, identificación y susceptibilidad antibiótica de especies de micobacterias. Se pretendió que los estudiantes recibieran esta capacitación como parte de su formación profesional en este hospital. La capacitación estuvo a cargo de un profesional investigador y la coordinadora.

Determinación de factores asociados a la infección por micobacterias

Para esta actividad, se revisaron las historias clínicas de pacientes que tuvieran cepas de micobacterias incluidas en este estudio. En el mismo se consideraron factores como edad, género, ocupación, escolaridad, aspectos acerca de la vivienda, estado civil, características del trabajo, etc.

Otros eventos clínicos y factores de riesgo asociados a la infección como presencia o ausencia de infección por VIH.

Resultados microbiológicos se colectó la información acerca de los cultivos, aislamiento, identificación, características moleculares y susceptibilidad antibiótica.

Análisis de datos

El muestreo fue no probabilístico y por conveniencia de alrededor de 400 muestras correspondientes a aproximadamente 300 pacientes. Este número se considera suficiente para hacer inferencias estadísticas, pues corresponde a prácticamente todas las cepas aisladas durante tres años de investigación en esta población. Todos los datos resultantes de las revisiones y resultados de laboratorio fueron transferidos a una base de datos (Epi-Info 2000) por un asistente de investigación. Para ello se contó con el acceso a la computadora de la clínica Familiar "Luis Angel Garcia" durante el estudio. El control de calidad de estas formas fue realizado por evaluaciones periódicas.

RESULTADOS

Caracterización molecular de *Mycobacterium tuberculosis*

En el presente estudio se incluyeron 246 cepas de *M. tuberculosis* provenientes de igual número de pacientes, a las cuales se les extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Tabla 1). De estas muestras, 182 (74%) fueron amplificadas por medio del método de Dobles Elementos Repetidos-Reacción en Cadena de la Polimerasa (DRE-PCR) mientras que el resto (26%) no logró amplificarse.

Tabla 1. Resultados de DRE-PCR por año y amplificación (N = 246)

	Año			Total	(%)
	2000	2001	2002		
	n	n	n		
	%	%	%		
Amplificado					
Si	65	54	63	182	73.98
	35.7	29.7	34.6		
No	20	14	30	64	26.02
	31.3	21.9	46.9		

Los patrones genéticos que se presentaron en 2 o más cepas de *M. tuberculosis* se denominaron patrones agrupados y constituyeron un 78.6% (143) de las cepas estudiadas (Tabla 2). Por otro lado, los patrones que se presentaron en una sola cepa se denominaron patrones únicos o patrones no agrupados y representaron el 21.4% (39) de las muestras.

Tabla 2. Patrones genéticos agrupados y únicos por año (N = 246)

	Año			Total	(%)
	2000	2001	2002		
	n	n	n		
	%	%	%		
Patrones genéticos					
Agrupados	53	38	52	143	78.6
	37.1	26.6	36.4		
Unicos	12	16	11	39	21.4
	30.8	41.0	28.2		

Dentro de los patrones agrupados se encontraron 24 grupos, los cuales se presentan esquematizados en la Figura 1 y 2. Debido a que algunos patrones genéticos difirieron en una sola banda, los patrones agrupados se subdividieron en subgrupos, así dentro del Grupo 6, se encuentran los subgrupos 6, 6a y 6b. Los grupos más frecuentes fueron: el patrón 13 encontrado en 21 cepas de *M. tuberculosis* (14.7%), el patrón 9 hallado en 20 cepas (14%), el patrón 6 representado en 17 cepas (11.9%) y el patrón 2 en 14 cepas (9.8%) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las cepas amplificadas por patrones genéticos agrupados y únicos (N = 182)

Grupos	No. cepas	(%)	Subgrupo
1	11	7.7	
2	14	9.8	
3	6	4.2	
4	3	2.1	
5	3	2.1	
6	17	11.9	6 ,6a,6b
7	1	0.7	
8	5	3.5	
9	20	14.0	9
10	3	2.1	10,10a,10b
11	11	7.7	11,11a,11b
12	2	1.4	
13	21	14.7	13,13a,13b,13c
14	2	1.4	
15	2	1.4	
16	2	1.4	
17	2	1.4	
18	3	2.1	
19	2	1.4	
20	2	1.4	
21	2	1.4	
22	3	2.1	
23	3	2.1	
24	3	2.1	
Total	143	100	

Identificación de especies de micobacterias

En la Tabla 4 se observa que de las 95 cepas de micobacterias aisladas durante el año 2002, 80 (84.2%) correspondieron a *Mycobacterium tuberculosis*; 11 (11.6%) a otras especies de micobacterias y 4 (4.2%) cepas no fueron identificadas.

Tabla 4. Identificación de cepas de micobacterias aisladas durante el año 2002.

Identificación	N=95	(%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	80	84.21
Otras micobacterias	11	11.58
ND*	4	4.21

*ND: No determinada, debido a contaminación de la cepa o crecimiento insuficiente.

Susceptibilidad antibiótica

Los resultados de susceptibilidad antibiótica presentados en la Tabla 5, correspondieron a 75 cepas de *M. tuberculosis*. Estos demuestran que 61 (81.3%) cepas fueron susceptibles a las cuatro drogas evaluadas por el método modificado de las proporciones. Catorce cepas (18.7%) presentaron resistencia a una o más drogas, de éstas 4 (5.3%) fueron mono-resistentes; 5 (6.7%) fueron resistentes a dos drogas; 2 cepas (2.7%) presentaron resistencia a tres drogas y 3 cepas (4.0%) presentaron resistencia a las cuatro drogas evaluadas.

Tabla 5. Susceptibilidad antibiótica de cepas de *M. tuberculosis* aisladas durante el año 2002

Tipo de resistencia antibiótica	N = 75n	(%)
	n (%)	
Susceptible a las cuatro drogas	61 (81.3)	
Resistencia una droga	4 (5.3)	
INH ¹		3 (4.0)
SM ²		1 (1.3)
EMB ³		-
RIF ⁴		-
Resistencia a dos drogas	5 (6.7)	
INH + SM		4 (5.3)
SM + EMB		1 (1.3)
Resistencia a tres drogas	2 (2.7)	
INH + RIF + SM		2 (2.7)
Resistencia a cuatro drogas	3 (4.0)	
INH + RIF + SM + EMB		3 (4.0)

¹INH : Isoniazida; ²SM : Streptomina; ³EMB: Etambutol; ⁴RIF: Rifampicina.

Los resultados de susceptibilidad antibiótica estratificada por el estado de VIH del paciente se presentan en la Tabla 6. En esta se observa que de 61 cepas susceptibles a las 4 drogas, 35 (57.4%) correspondieron a pacientes seropositivos y 26 cepas (42.6%) a pacientes VIH negativo. De 14 cepas con resistencia a una o más drogas, 10 (71.4%) se aislaron de pacientes VIH positivo.

Tabla 6. Resistencia a drogas de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en el año 2002 y estado de VIH de los pacientes

Resultado de VIH	Susceptibles a las cuatro drogas N=61 n (%)	Resistentes a una o más drogas N= 14 n (%)
Positivo	35 (57.4)	10 (71.4)
Negativo	26 (42.6)	4 (28.6)

Características demográficas

De 182 cepas con patrones moleculares disponibles se pudo obtener información epidemiológica de 135 (Tabla 7). Las mismas provenían de igual número de pacientes tanto hospitalizados como ambulatorios, un 71% de estos pacientes eran hombres mientras que la distribución por edad no presentó alguna tendencia. En cuanto al lugar de nacimiento, un tercio de los pacientes procedían de la ciudad de Guatemala, un 10% de la ciudad de Escuintla, y el resto procedía de algún departamento. Es de hacer notar que un 4% de estos pacientes provenían de la República de El Salvador.

Un 13.3% de estos pacientes estuvieron privados de libertad y un 38.5% estuvo hospitalizado. La infección por VIH fue observada en un 56% de los pacientes de esta muestra. La cuarta parte de los pacientes tenían hijos. Por último, se observó que el 56.3% de estos pacientes habían recibido tratamiento con drogas antituberculosas.

Tabla 7. Características demográficas de los pacientes proveedores de las cepas (N =135)

Característica	Frecuencia	(%)
Tipo de usuario		
Ambulatorio	68	50.4
Hospitalizado	67	49.6
Género		
Masculino	96	71.1
Femenino	39	28.9
Edad (años)		
1-24	34	25.2
25-31	30	22.2
32-41	35	25.9
> 42	36	26.7
Lugar de nacimiento		
Guatemala	49	36.3
Totonicapán	5	3.7
Alta Verapaz	6	4.4
Suchitepéquez	6	4.4
Escuintla	14	10.4
El Salvador	5	3.7
Otro	50	37.0
Privado de libertad		
Sí	18	13.3
No	17	12.6
Desconocido	98	72.6
Hospitalizado		
Sí	52	38.5
No	21	15.6
Desconocido	61	45.2
Infección VIH		
Sí	75	55.6
No	60	44.4
Tiene hijos		
Sí	34	25.2
No	54	40.0
Desconocido	47	34.8
Tratamiento anti-tuberculosis		
Si	76	56.3
No	40	29.6
Desconocido	19	14.1

En la Tabla 8 se observan los resultados de las 135 cepas agrupadas según su patrón genético e información epidemiológica. En esta serie de datos se compararon las características epidemiológicas ya descritas anteriormente contra la presencia o no de patrones genéticos agrupados. La presencia o ausencia de las características epidemiológicas no influyeron en la formación de estos patrones. Los análisis epidemiológicos mostraron que ninguna de estas variables resultaron ser un factor estadísticamente asociado a la formación de patrones genéticos agrupados ($p > 0.05$).

Tabla 8. Información epidemiológica de las cepas analizadas (N = 135)

Característica	Patrones		Valor p	OR	IC _{95%}	
	Total	Agrupados Únicos (%) (%)				
Tipo de usuario						
Ambulatorio	68	49 (72.1) 19 (27.9)	0.17	0.56	0.25	1.28
Hospitalizado	67	55 (82.1) 12 (17.9)				
Género						
Masculino	96	71 (74.0) 25 (26.0)	0.19	0.52	0.19	1.38
Femenino	39	33 (84.6) 6 (15.4)				
Edad (años)						
< 32	70	52 (74.3) 18 (25.7)	0.43	0.72	0.32	1.62
> 32	65	52 (80.0) 13 (20.0)				
Privado de libertad						
Sí	18	14 (77.8) 4 (22.2)	0.42	0.47	0.07	2.96
No	17	15 (88.2) 2 (11.8)				
Hospitalizado						
Sí	52	39 (75.0) 13 (25.0)	0.15	0.32	0.06	1.54
No	21	19 (90.5) 2 (9.5)				

Infección VIH

Sí	75	56 (74.7) 19 (25.3)	0.47	0.74	0.32	1.67
No	60	48 (80.0) 12 (20.0)				

Tiene hijos

Sí	34	28 (82.4) 6 (17.6)	0.11	2.33	0.82	6.65
No	54	36 (66.7) 18 (33.3)				

Tratamiento tuberculosis

Sí	76	58 (76.3) 18 (23.7)	0.87	0.94	0.38	2.33
No	40	31 (77.5) 9 (22.5)				

Lugar de nacimiento

Depto. de Guatemala	51.00	36 (70.6) 15 (29.4)	0.17	0.56	0.25	1.27
Otro	84.00	68 (81.0) 16 (19.0)				

Relación entre las características demográficas y susceptibilidad antibiótica

De las cepas provenientes de 42 pacientes con información epidemiológica, resultados de patrones genéticos y susceptibilidad antibiótica, 35 (83%) de ellas fueron caracterizadas como *M. tuberculosis* y 7 (17%) se definieron como *Mycobacterium* spp. De las cepas de *M. tuberculosis*, 29 (83%) presentaron patrones agrupados mientras que el resto presentaron patrones únicos o no agrupados (Tabla 9).

Tres (10%) cepas de *M. tuberculosis* fueron resistentes a múltiples drogas, dos (7%) fueron resistentes a 1 o dos drogas y el resto (83%) fueron susceptibles a las cuatro drogas empleadas en el tratamiento anti-tuberculoso (INH, RIF, EMB y SM). Dentro del grupo de *Mycobacterium* spp. se presentaron 2 cepas (33%) resistentes a una o dos drogas y el resto fueron susceptibles (Tabla 9).

Veintiun pacientes (50%) recibieron previamente tratamiento anti-tuberculoso, 18 pacientes (43%) no habían recibido tratamiento y del resto (7%) se desconoce esta información. De los pacientes con tratamiento previo, 16 (76%) presentaron patrones agrupados y 5 (24%) presentaron patrones únicos. De

las cepas con patrones agrupados y tratamiento previo, una cepa (6%) resultó tener resistencia múltiple a los medicamentos, otra (6%) fue resistente a 1 ó 2 drogas y el resto (88%) fue susceptible.

Dieciseis (89%) pacientes sin tratamiento previo presentaron cepas con patrones agrupados y 2 (11%) con patrones únicos. Dentro de los patrones agrupados, se presentaron una cepa (6%) con resistencia múltiple a las drogas anti-tuberculosas, 3 cepas (19%) con resistencia a una o dos drogas diferentes a la pareja INH + RIF, y el resto de cepas fueron susceptibles. Las 2 cepas con patrones únicos fueron susceptibles a las drogas anti-tuberculosas (Tabla 9).

De estas cepas con criterio de inclusión, 23 (55%) fueron aisladas a partir de muestras de esputo, 6 (14%) a partir de sangre y 4 (9.5%) de lavado bronquial. De las 23 cepas aisladas de esputo, 21 cepas (91%) presentaron patrones agrupados y 2 cepas (9%) tuvieron patrones únicos. Cinco cepas (83%) provenientes de sangre tuvieron patrones agrupados

y una cepa (17%) presentó patrón único.

Los 3 pacientes con cepas resistentes a múltiples drogas, los tres (100%) fueron seropositivos al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH +) y dos de ellos recibieron previamente tratamiento anti-tuberculoso. Las 3 cepas fueron caracterizadas como *M. tuberculosis* y provinieron de muestras pulmonares (2 de esputo y 1 de lavado bronquial).

De los 4 pacientes con cepas resistentes a 1 ó 2 drogas diferentes a INH y RIF, 3 de ellos (75%) fueron seronegativos y no recibieron tratamiento previo. Dos cepas (50%) fueron caracterizadas como *M. tuberculosis* y otras 2 como *Mycobacterium* spp. Las 4 cepas se aislaron de muestras pulmonares (3 de esputo y 1 de lavado bronquial).

Los patrones frecuentemente encontrados entre las cepas susceptibles fueron: 7 (20%) patrones únicos, 7 (20%) se incluyeron en el Grupo 13, 5 (14%) en el Grupo 2, 5 (14%) al grupo 9, 5 (14%) pertenecieron al grupo 9 y el resto (18%) se incluyeron en otros patrones (datos no mostrados).

Tabla 9. Resultados de susceptibilidad antibiótica y tipo de muestra por agrupación genética.

Susceptibilidad a drogas Antituberculosas	Total	Patrones genéticos			Únicos	
		Agrupados	Resistente a 1 o 2 drogas	MDR*	Total	Susceptible
Especie de micobacteria						
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	29	24	2	3	6	6
<i>Mycobacterium</i> spp.	6	83	7	10		100
		4	2			
		67	33			
Tratamiento previo						
Si	16	14	1	1	5	5
		88	6	6		100
No	16	12	3	1	2	2
		75	19	6		100
Desconocido	1			1		
				100		
Tipo de muestra						
Esputo	21	16	3	2	2	2
		76	14	10		100
LCR	1	1				
		100				

llega al centro de salud hasta que es referido a este hospital va desde cuatro semanas hasta tres meses, es preocupante la progresión de la enfermedad que se agrava con la coinfección con VIH. Por lo tanto, es imperativo reforzar los sistemas de diagnóstico en los hospitales regionales como parte del PNT, a fin de reducir el tiempo de diagnóstico y aplicar el tratamiento anti-TB antes del deterioro de los pacientes.

De las cepas, 75 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas, 61 (81.33%) resultaron susceptibles a las cuatro drogas evaluadas, isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomycin (SM) y etambutol (EMB); 14 cepas (18.67%) presentaron algún tipo de resistencia, 4 (5.32%) fueron monorresistentes, 3 (3.99%) a INH y 1 (1.33) a SM. Entre las cepas que presentaron resistencia a dos drogas, la asociación más frecuente fue INH+SM en 4 cepas (5.32%), seguida de SM+EMB con 1 cepa (1.33%). Dos cepas (2.66%) presentaron resistencia a INH+RIF+EMB y 3 (3.99%) fueron resistentes a las cuatro drogas evaluadas. En otros estudios la resistencia a INH+SM fue de 2.8% y representó la principal asociación de resistencia a drogas distinta a RIF+INH (12).

El porcentaje de cepas resistentes a al menos una droga fue de 18.67% correspondiente a 14 cepas. De acuerdo a la definición de cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes (MDR-TB) que establece que una cepa es MDR-TB cuando es resistente al menos a INH+RIF con o sin resistencia a otras drogas anti-TB, en el presente estudio se detectaron 5 cepas de MDR-TB correspondientes a 6.65% del total de cepas estudiadas (11, 13 - 17).

En estudio conducido en el sur de México entre 1995 y 1998 se encontró que en 238 cepas evaluadas, la tasa de resistencia fue de 28.4% (primaria 20.78% y secundaria 54.7%), y la tasa de multiresistencia 10.8% (primaria 3.3% y secundaria 35.8%), resultados similares a los encontrados en la presente investigación a pesar de que el número de cepas incluido en el mismo fue de únicamente 75. Esta similitud es interesante si se considera que las condiciones demográficas y socioecológicas de esta región mexicana son muy parecidas a las de Guatemala. En otro estudio realizado en Ecuador, se encontró un 24% de resistencia primaria a, al menos una droga y 16.7% de multiresistencia. Así mismo, en Nicaragua, en un estudio publicado en 1997 se

determinó que la resistencia, a al menos una droga, fue de 40.5% y 13.5% de las cepas evaluadas demostraron multiresistencia (14, 18, 19).

En todo el mundo aumenta la preocupación por el problema de la tuberculosis resistente a drogas, particularmente porque no han sido desarrolladas nuevas drogas para el tratamiento de esta enfermedad desde la década de los sesenta. Aunque la resistencia a drogas es bastante común en muchos países y rara en otros, la situación actual de este problema no se conoce con exactitud (20).

En un estudio dirigido por la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedad Pulmonar entre 1996 y 1999 se determinó que entre los nuevos casos de tuberculosis a nivel mundial la resistencia a, al menos una droga antituberculosa, va de 1.7% a 36.9% y la prevalencia de cepas multiresistentes va desde 0% hasta 14.1%, además clasifica como alta prevalencia de MDR-TB a porcentajes desde 4.5 hasta 10.8, de acuerdo a lo cual, los resultados de este estudio ubicarían a Guatemala con 6.65%, entre los países con alta prevalencia de MDR-TB, dato que contrasta con lo reportado para la región de las Américas que afirma que la prevalencia de cepas MDR-TB es baja y no representan un problema serio (21).

La población que asiste al Hospital San Juan de Dios es referida de centros de salud y otros hospitales, por lo que podría no ser una muestra representativa de la población general en el país, sin embargo los resultados de este estudio evidencian que en Guatemala circulan cepas MDR-TB que si no se manejan adecuadamente pueden llegar a propagarse en toda la región.

La tuberculosis multiresistente a drogas esta asociada a altas tasas de fallo y muerte que la tuberculosis susceptible y es más difícil y costosa para tratar, por lo que representa un grave problema para los sistemas de salud de cualquier país, por lo que deben adoptarse o expandirse programas de control de tuberculosis que utilicen herramientas de intervención adaptadas a la realidad nacional para disminuir la tasa de transmisión de las cepas susceptibles y principalmente de las MDR-TB (21).

De las 61 cepas susceptibles a las cuatro drogas evaluadas, 35 (57.38%) provenían de pacientes VIH positivo y 26 (42.62%) de pacientes VIH negativo, sin embargo, estos porcentajes variaron

considerablemente respecto a las 14 cepas que presentaron resistencia al menos a una droga, en las que 10 (71.42%) fueron aisladas de pacientes VIH positivo y solamente 4 (28.57%) de pacientes VIH negativo. Este hecho es de suma importancia si se considera que el progreso a la enfermedad en pacientes VIH positivo es mucho más rápido que en pacientes VIH negativo, por lo tanto, si la terapia anti-TB no es efectiva, existe el riesgo de que la salud del paciente se deteriore en niveles alarmantes antes de lograr implementar un tratamiento efectivo. En Argentina en 1998, se encontró una sorprendente correlación entre tuberculosis MDR, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y asistir a hospitales urbanos de referencia para enfermedades infecciosas, coincidentemente con este estudio, ocurrieron dos brotes nosocomiales de MDR entre pacientes VIH positivo y se encontró un alarmante apareamiento de MDR en pacientes VIH negativo con historia de tratamiento previo de TB. Aun en países industrializados, existe un incremento en la aparición de cepas multirresistentes, particularmente en pacientes VIH positivo, por lo que es indispensable que el PNT esté estrechamente relacionado con el programa de control de VIH y SIDA (11, 17, 23).

El control de la tuberculosis en Guatemala debe ser parte de un programa integral de desarrollo económico y social del país, ya que la recrudescencia de esta enfermedad está relacionada con el crecimiento de la población y el aumento de la pobreza (22, 24).

Las pruebas de susceptibilidad antibiótica de las cepas correspondientes a los años 2000 y 2001 no se incluyeron en estos resultados, ya que su procesamiento requirió la recuperación de las cepas a partir de los cultivos del cepario por lo que los datos no estuvieron disponibles al momento del análisis.

Descripción demográfica

Las cepas estudiadas provinieron tanto de pacientes ambulatorios como hospitalizados, con predominio del género masculino y de personas infectadas con VIH. Esto puede reflejar que en los pacientes con VIH es más frecuente la coinfección con TB. Además, que parte de los pacientes con TB no son detectados en los centros de salud sino en los centros hospitalarios donde además se les diagnostica la

infección de VIH. Datos de la CFLAG han reportado que la infección marcadora de SIDA en estos pacientes es la TB, que además constituye la principal causa de muerte en estos pacientes, ya que un tercio de las muertes relacionadas con SIDA son debidas a TB (25, 26).

En lo que se refiere al predominio de pacientes masculinos, la epidemiología de la TB (al igual que otras enfermedades) está influenciada por factores socioeconómicos y culturales importantes en las tasas de infección, detección y progresión de la enfermedad, así como la administración exitosa del tratamiento (41).

En cuanto al lugar de procedencia de los pacientes, Guatemala y Escuintla fueron las ciudades encontradas con más frecuencia. Esto puede explicarse porque el Hospital General San Juan de Dios sirve como referencia para ambos departamentos. Además, los reportes del PNT señalan un aumento en los casos de tuberculosis pulmonar en Escuintla en los últimos años. Los pacientes incluidos en este análisis estuvieron privados de libertad y hospitalizados (13.3 y 38.5% respectivamente). Ambas características pueden aclarar la aparición de patrones agrupados debido a que las condiciones de hacinamiento y la falta de un programa de vigilancia epidemiológica en los centros de detección, favorecen la dinámica de transmisión de esta enfermedad (5, 6, 28, 29).

Comparación de características demográficas y agrupación genética de las cepas

Al comparar el perfil epidemiológico de los pacientes con la formación de patrones genéticos agrupados o únicos de las cepas de *M. tuberculosis* (Tabla 7) ninguna de las variables incluidas estuvieron estadísticamente asociadas a la formación de patrones agrupados o únicos ($N=135$; $p > 0.05$). A pesar de estos resultados, es importante recalcar que en otros reportes, la formación de patrones agrupados está asociada a personas privadas de libertad, hospitalizadas o infectadas con VIH, baja condición socioeconómica, edad, sexo, procedencia y actividad laboral (2, 3).

La falta de asociación epidemiológica con la formación de grupos de patrones genéticos en este estudio, puede explicarse porque Guatemala es un

país endémico para TB, donde la reactivación y transmisión reciente de la infección ocurren simultáneamente, haciendo que los factores asociados no se evidencien, y porque el tamaño de muestra probablemente fue insuficiente para hacer inferencias estadísticas. De estos factores, el primero tiene implicaciones importantes para la salud pública ya que podría estar señalando el pobre control de la transmisión de la infección por las autoridades responsables (2, 3).

Es de hacer notar que al comparar los resultados de los patrones genéticos de las cepas de *M. tuberculosis* por grupos de edad e infección VIH, se encontró que los pacientes VIH positivo tienden a presentar más cepas con patrones genéticos agrupados que los pacientes VIH negativo (24.3 versus 19%, respectivamente), lo cual indica que, los primeros están más propensos a infectarse con cepas circulantes y a reactivar infecciones pasadas condicionados por su compromiso inmunológico. Así mismo, en todos los grupos de edad se presentaron tanto patrones genéticos agrupados como únicos, lo que comprueba una vez más la ocurrencia simultánea de infecciones recientes y reactivaciones de la enfermedad (9).

Relación entre las características demográficas y susceptibilidad antibiótica

Al relacionar la información epidemiológica, los patrones genéticos y los perfiles de susceptibilidad antibiótica de 42 cepas (Tabla 8) se demostró que 3 cepas de *M. tuberculosis* de 3 pacientes (2 de esputo y 1 de lavado bronquial) fueron resistentes a múltiples drogas y pertenecían a patrones genéticos agrupados (Grupos 6, 9 y 10). Estos pacientes presentaron coinfección con VIH, dos de ellos recibieron tratamiento anti-tuberculoso. Esta información revela características importantes en cuanto al perfil y manejo de la tuberculosis en pacientes VIH positivo. Actualmente Guatemala no cuenta con protocolos de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la coinfección VIH/TB por lo que estos resultados señalan la necesidad inmediata del desarrollo de los mismos. Por otro lado el aislamiento de las cepas en muestras de esputo y lavados bronquiales indican el peligro potencial en cuanto al aumento en el riesgo de transmisión de TB, debido a la liberación de gran cantidad de aerosoles que generan los pacientes con

TB pulmonar al toser.

Las inferencias hechas en estos pacientes también son aplicables a los 4 pacientes con cepas resistentes a 1 ó 2 drogas diferentes a INH y RIF. En ellos es importante recalcar la aparición de resistencia primaria en cepas no caracterizadas como *M. tuberculosis*. Los patrones agrupados para estas cepas fueron: 1, 9, 12 y 13.

En cuanto a otras características epidemiológicas, es importante mencionar que los 7 pacientes que presentaron resistencia o multiresistencia, provienen y han residido por más de 15 años en los departamentos de: Guatemala (4), Chiquimula (1), San Marcos (1) y Escuintla (1). Todos estos departamentos han sido notificados por el PNT como endémicos. Tres pacientes con resistencia antibiótica estuvieron privados de libertad, uno de ellos con multiresistencia en el Centro de Detención de Malacatán, San Marcos, otro en el Centro Preventivo de la zona 18 y el tercero en el Centro Preventivo Pavoncito. Como ya se mencionó estos centros no solo facilitan la transmisión de *M. tuberculosis* sino que se convierten en focos potenciales de desarrollo de cepas resistentes y multiresistentes, principalmente por la incapacidad para administrar adecuadamente el tratamiento, ya sea por falta de medicamentos, problemas de distribución y administración del mismo, así como la movilización constante de la población privada de libertad (5, 6, 28).

Los resultados de radiografías de tórax de 6 pacientes con cepas de micobacterias resistentes fueron: derrames pleurales, fibrosis, neumotórax, granuloma cuerpo extraño y placa normal. A la fecha del informe, uno de los pacientes de quién se aisló una cepa resistente había fallecido.

Por último entre las cepas susceptibles al tratamiento anti-tuberculoso, 35 cepas (83%) tuvieron patrones genéticos agrupados, los grupos más comunes fueron: 13, 9, 6 y 2. En el grupo de cepas susceptibles, aunque también se encontraron 7 patrones únicos. Estos resultados indican que solo el 20% (7 de 35) de los pacientes presentaron reactivación de la enfermedad mientras que el resto son pacientes que se infectaron recientemente.

Capacitación de estudiantes

Uno de los objetivos de este proyecto fue ofrecer capacitación a estudiantes del Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad (EDC) de Química Biológica, que realizan prácticas en el Hospital General San Juan de Dios.

El número máximo de personas capacitadas por mes fue de 3 y el mínimo de 1, lo cual permitió dar atención personalizada. El tiempo de capacitación fue de 4 horas diarias por 5 días, para un total de 20 horas. Las actividades incluyeron 1 clase teórica de 1 hora, 2 evaluaciones escritas y el procesamiento de muestras por medio de baciloscopías, manejo de cultivos, preparación de medios de cultivo y observación e interpretación de pruebas de susceptibilidad antibiótica para micobacterias; al finalizar la semana, cada estudiante fue evaluado individualmente.

Durante el adiestramiento, los estudiantes tuvieron la oportunidad de procesar todo tipo de muestras para el diagnóstico de tuberculosis, algunas de las cuales, como sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, biopsias etc., requieren procedimientos especiales para lograr la detección de *Mycobacterium* sp., esta diversidad de muestras se logró gracias a que el Hospital General San Juan de Dios centraliza la atención a pacientes provenientes de la ciudad capital y del nororiente del país, por lo que la afluencia de muestras al laboratorio de tuberculosis es mayor que en cualquier otro centro asistencial.

Como parte del entrenamiento se resaltó el uso de medidas de bioseguridad que minimicen el riesgo de infección de tuberculosis, para lo cual, a cada estudiante se le proporcionó equipo de seguridad apropiado que incluyó: bata, lentes, mascarilla, guantes y el uso correcto de la campana de flujo laminar.

Los estudiantes capacitados presentaron las siguientes características: el 73% eran mujeres, más del 75% de ellos cursaban del 8° al 10° ciclo de la carrera, por lo que habían aprobado al menos 40 cursos, 54% de los estudiantes habían completado más de 5 cursos de microbiología y un 77% reportó haber recibido capacitación previa, únicamente cinco personas reportaron no tener ningún entrenamiento previo en tuberculosis.

Algunas inferencias en el análisis de los resultados

de la capacitación de estudiantes fueron: ningún estudiante obtuvo menos puntaje en el examen post-capacitación del que había obtenido en el examen pre, ningún estudiante obtuvo igual puntaje en los exámenes pre y post, todos obtuvieron más puntaje en el examen post. Por lo tanto, se obtuvo diferencia significativa entre los resultados pre y post capacitación, lo cual demuestra que el entrenamiento brindado en el laboratorio de tuberculosis, permite que los estudiantes amplíen los conocimientos que reciben en los cursos de microbiología y apliquen las técnicas adecuadas para la detección de especies del género *Mycobacterium* a partir de cualquier tipo de muestra. También se determinó, del análisis estadístico que la capacitación es la única explicación para el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico de tuberculosis, sin importar otros factores como número de cursos aprobados o entrenamientos previos, por lo que esta capacitación debe ser incluida obligatoriamente durante las prácticas de los estudiantes de Química Biológica en el hospital. Debe señalarse que resultados similares se han obtenido en los proyectos de tuberculosis de los años 2000 y 2001, en los cuales, la capacitación de estudiantes fue un objetivo importante (30, 34). Para continuar el entrenamiento de estudiantes en esta área es necesario asegurar la presencia de un profesional especializado que supervise el laboratorio, a fin de garantizar que tanto las actividades de servicio como de docencia mantengan el nivel de calidad por el que se han caracterizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD, and Riley LW. Double-Repetitive-Element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1383-1384
2. Small PM, van Embden JDA. 1994. Molecular epidemiology of tuberculosis, p.569-582. In: B.R. Bloom (ed.). *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. American Society for Microbiology. Washington D.C.

3. Small PM, Hopewell PC, Singh SP et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: A population-based study using conventional and molecular methods. *N. Engl. J. Med.* 1994;330:1703-1709.
4. Montoro E, Valdivia J, Cardoso-Leao S. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism analysis and by the Double-Repetitive-Element PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:3099-3102
5. Pan American Health Organization/World Health Organization. Regional Evaluation Meeting of National TB Control Programs, México, September 2000.
6. *Memoria de Labores, Programa Nacional de Tuberculosis*. Guatemala, Septiembre 2000 (Memoirs, National Program of Tuberculosis, Guatemala, September, 2002).
7. Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, et al. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet* 1993;342:841-844
8. Daley CL, Small PM, Schecter GF et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N. Engl. J. Med.* 1992;326:231-235
9. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley LW, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(2):180-199
10. Caminero Luna J.A. Resistencia primaria a fármacos antituberculosos. *Medicina clínica* 1989, Vol 93 (1):52-56
11. Schutt-Gerowitt H. On development of mycobacterial infections. I. A review concerning the common situation. *Zentralbl Bakteriol* 1995 Nov; 283(1):5-13
12. Thomsen V.O. et al. Results from 8 yrs of susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Denmark. *Eur. Respir. J.* 2000 Aug;16(2):203-8
13. Narita M. et al. Treatment Experience of Multidrug-Resistant Tuberculosis in Florida, 1994-1997. *Chest* 2001; (120): 343-348.
14. García-García M.L. et al. Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch. Intern. Med.* 2000 Mar 13;160(5):630-6
15. Becerra M.C. et al. Using treatment failure under effective directly observed short-course chemotherapy programs to identify patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2000 Feb;4(2):108-14
16. Bastian I; Colebunders R. Treatment and prevention of multidrug-resistant tuberculosis. *Drugs* 1999 Oct; 58 (4): 633-61
17. De Kantor I.N.; Latini O; Barrera L. La resistencia y multiresistencia a los medicamentos antituberculosos en la Argentina y en otros países de América Latina. *Medicina (B Aires)* 1998;58 (2) : 202-8
18. Mertz B.L.; Douce R.W.; Brito N. Anti-tuberculosis drug resistance in two clinics in Ecuador. *Int J tuberc Lung Dis* 2000 Feb; 4 (2) : 115-7
19. de la Hoz R.E. et al. Initial screening for antituberculous drug resistance at inpatient facility in Leon, Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997 Jan;56 (1) : 24-6
20. Willcox P.A. Drug-resistant tuberculosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2000 May;6 (3): 198-202
21. Espinal M.A. et al. Global trends in resistance to tuberculosis drugs. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344 (17) : 1294-1303
22. Loiez-Durocher C; Vachee A; Lemaitre N. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: diagnostic methods. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 2000 May-Jun; 58 (3) : 291-7
23. Johnson JL; Ellner JJ. Adult tuberculosis overview: African versus Western perspectives. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2000 May; 6 (3) : 180 - 6
24. Ait Khaled N; Enarson D; Billo N. The epidemiology of tuberculosis and of the resistance to antitubercular agents. *Rev. Mal. Respir.* 1997 Dec; 14 Suppl 5: S8-18
25. Arathoon E., et al. Trends and patterns in HIV/AIDS epidemic in Guatemala City during 1994-95. In: International Conference of AIDS. 1996
26. World Health Organization. Report on the Tuberculosis Epidemic. Geneva:1996

27. Hudelson P. Gender differentials in tuberculosis: the role of socio-economic and cultural factors. *Tuber. Lung. Dis.* 1996;77(5):391-400.
28. Holden C. Stalking a killer in Russian's Prisons. *Science* 1999;286:1670
29. Harrow EM, Rangel J, Arriaga M, et al. Epidemiology and Clinical Consequences of Drug-Resistant Tuberculosis in a Guatemalan Hospital. *Chest* 1998;113:1452-58
30. Velásquez, TI, Samayoa, B. Determinación de la susceptibilidad antibiótica de cepas de micobacterias aisladas de pacientes que acuden al Hospital General San Juan de Dios. Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación -DIGI-. En prensa.
31. Haas, DW, and Des Prez, RM. (1995) *Mycobacterium tuberculosis*. In Principles and practice of Infectious Diseases, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds., New York, Churchill Livingstone.
32. Sep Kowitz, KA, Raffalli J, Riley LJ, Kiehn, TE, Armstrong, D. (1995) Tuberculosis in the AIDS era. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:180-199.
33. Harris E. A low cost approach to PCR. (1998) Oxford University Press, INC. (118-132).
34. Velásquez, TI, Samayoa, B. Diagnóstico de la infección por micobacterias e identificación de sus factores de riesgo en personas viviendo con VIH/SIDA, a través de un programa de entrenamiento docente. Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación -DIGI-. En prensa.
35. D. Lau, A.M. Xet, B. Samayoa, T. Velasquez-Porta, E. Arathoon. Determination of genetic variability in strains of *Mycobacterium tuberculosis* using DRE-PCR. XIV International AIDS Conference, Barcelona. 2002. Abstract ThPeB7272
36. Hopewell, PC, Small P. Applications of Molecular Epidemiology to the prevention, control and study of Tuberculosis en Taller -PCR. INCAP, 1999
37. Taller: Transferencia de tecnología para el diagnóstico y epidemiología molecular de dengue, tuberculosis y enfermedades diarreicas. INCAP, 1999.
38. Hance, AJ, Crandchamp, B, Levy-Frebault, V, Lecossier, D, Raugier, J, Bocart, D, Gicquel, B. 1989. Detection and identification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* 3:843-849.
39. Hermans, PWM, Scuitema, ARJ, Soolingen, DV, Verstynen, CPHJ, Bilk, EM, Thole JER, Kolk AHJ, van Embden JDA. 1990. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28:1204-1213.
40. Samayoa B, et al. Impacto Socioeconomico de la epidemia VIH/SIDA en Guatemala. *Rev Med No1 Vol5* 1995 (p4-10)
41. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al: A multi-institutional outbreak of highly drug resistant tuberculosis. *JAMA* 1996;276:1229.
42. Kenyon TA, Ridzon R, Luski-Hawk R, et al: a nosocomial outbreak of multidrug resistant tuberculosis. *Ann. Intern. Med.* 1997;127:32.
43. Friedman, CR, Stoeckle, MY, Johnson Jr, WD; Riley, LW. Double-Repetitive-Element PCR Method for subtyping *M. tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(5):1382-1384
44. American Society Microbiology (ASM).- *Clinical Microbiology Procedures Handbook*.- USA: 1998

ANEXOS

Figura 1.
 Patrones Agrupados de *Mycobacterium tuberculosis*

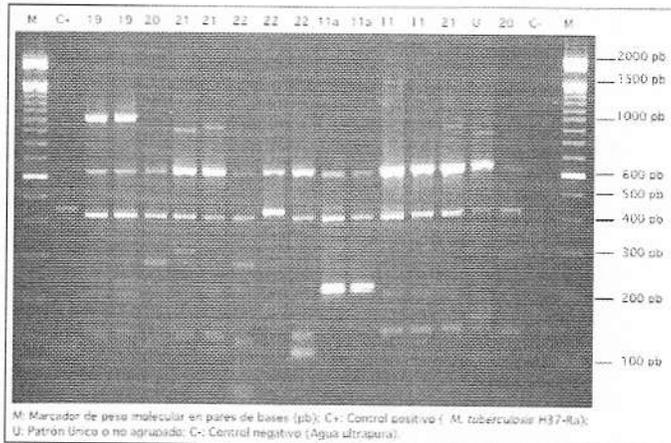


Figura 2
 Patrones genéticos agrupados de *M. tuberculosis*

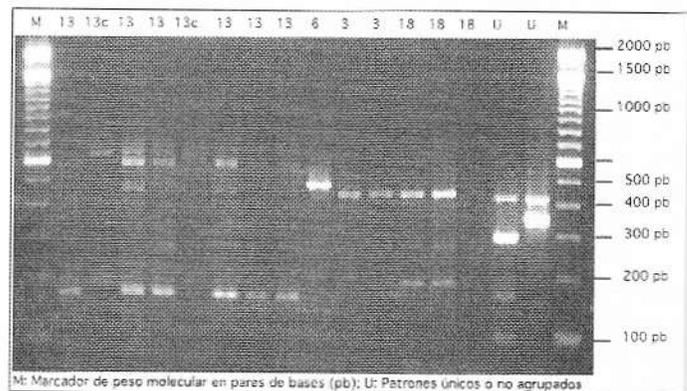


Figura 3.
 Patrones genéticos únicos o no agrupados de *M. tuberculosis*

