



# **UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA** **ZONA XALAPA**  
**SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO DE VERACRUZ**

**“DROGORRESISTENCIA PRIMARIA EN  
PACIENTES CON TUBERCULOSIS  
PULMONAR EN 8 JURISDICCIONES  
SANITARIAS DE LOS SERVICIOS DE  
SALUD DE VERACRUZ”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN INVESTIGACION CLINICA**

**PRESENTA  
Dulce María Espejo Guevara.**

**TUTOR  
DR. CARLOS M. CONTRERAS**

**Xalapa-Enríquez, Ver., 2002.**

# CONTENIDO

	PAG.
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	1
3.- ANTECEDENTES	3
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
5.- OBJETIVO GENERAL	7
6.- HIPÓTESIS	7
7.- DISEÑO	7
8.- MATERIAL Y METODO	8
9.- RESULTADOS	11
10.- DISCUSIÓN	18
11.- CONCLUSIONES	22
12.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	23
13.- BIBLIOGRAFÍA	24
14.- APÉNDICE	25

Agradezco a mis compañeros y autoridades de los Servicios de Salud de Veracruz que me apoyaron en la realización del estudio:

ESCOBAR MESA ALEJANDRO, GARCIA LOPEZ MARCELINA, SÁNCHEZ SIMMEDINGER ALEJANDRO, HERNÁNDEZ CRUZ JOSÉ, MARTINEZ GARCIA JOSE MANUEL, LARA JOSE LUIS, PARISSI CRIVELLI AURORA, MARTINEZ TERESA, RIVERA RAMON JOSE EMILIO, FUENTES DOMÍNGUEZ JAVIER, MUÑOZ FLORES PATRICIA, VIVEROS TORRES ILEANA, COL. DE LAS JURISDICCIONES SANITARIAS DE PANUCO, POZA RICA, MARTINEZ DE LA TORRE, XALAPA, CORDOBA, VERACRUZ, SAN ANDRES Y COATZACOALCOS.

A MI ESPOSO DANIEL GRACIAS POR TU APOYO

A MIS GRANDES AMORES, MARCO ANTONIO Y DANIEL FRANCISCO, POR ESTAR SIEMPRE CON CONMIGO

GRACIAS DIOS MIO POR PERMITIRME VIVIR

# DROGORRESISTENCIA PRIMARIA EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR EN 8 JURISDICCIONES SANITARIAS DE LOS SERVICIOS DE SALUD DE VERACRUZ

## RESUMEN

Mientras que la tuberculosis es considerada como una emergencia mundial, ya que se estima que un tercio de la población se encuentra infectada y amenaza la vida de una parte importante de la población, la drogorresistencia es uno de los factores considerados como causa de la incidencia en los adultos. En México los estudios sobre drogorresistencia no reflejan la situación real pese a que tener un elevado número de casos resistentes eleva el costo de la atención médica y representa un problema para el manejo del paciente. **Objetivo.** Conocer la prevalencia de la drogorresistencia primaria del *M. tuberculosis*. **Metodología.** Estudio observacional transversal descriptivo, que incluye casos nuevos de tuberculosis pulmonar de 8 jurisdicciones sanitarias del estado, a los que por método radiométrico se determinó drogosensibilidad a los medicamentos antituberculosos de primera línea. Se realizó un análisis exploratorio de datos a través de frecuencias relativas. **Resultados.** De 157 pacientes estudiados, se aisló *M. tuberculosis* en 116 (74.53%), 27 (17.2%) dieron resultados negativos y 14 (8.9%) muestras contaminadas. 22 (59.5%) de los pacientes que mostró algún tipo de resistencia son hombres. La mediana de edad de estos pacientes fue de 34 años. En el 35.8% de los pacientes resistentes las lesiones pulmonares fueron excavadas, el 40.0% nodulares y en el 50% combinadas. El 31.9% fue por lo menos resistente a una droga, el 23.2% a una sola; 14.7% a Estreptomicina, 18.1% a Isoniacida, el 10.3 a etambutol y 1.7% a Rifampicina; el 6.9% a dos drogas y el 2.6% multidrogorresistente. **Conclusiones.** La frecuencia de la resistencia primaria a por lo menos un fármaco es del 31.9%, uno de los valores más altos registrados en los estudios en otros países y en México.

## INTRODUCCION

La tuberculosis constituye un problema de salud pública importante. La Organización Mundial de la Salud estima que un tercio de la población a nivel mundial está infectada por el *M. tuberculosis*, ocurren cada año 8 millones de casos nuevos de tuberculosis activa y fallecen alrededor de 3 millones de personas por esta causa (1).

En México, se estima que la cuarta parte de la población (más de 25 millones de habitantes) se encuentra infectada y desde hace más de 20 años la incidencia permanece estable. Anualmente la tuberculosis contribuye con el 1 % al total de las defunciones.

Veracruz registra una tasa promedio anual de 28.1 casos nuevos (2000), por 100,000 habitantes y ocupa el 4 lugar de mortalidad por este padecimiento en el país.

Así, los Servicios de Salud de Veracruz aportan anualmente el 90 % de los casos nuevos que se registran en la entidad.

El problema de la drogorresistencia en casos de tuberculosis tiene una distribución desigual en los diferentes estudios realizados, en los distintos países. En México los estudios no reflejan la situación real del país debido a que la selección de la muestra no se considera representativa (10.) y el tener un elevado número de casos resistentes representa además de la elevación en el costo de la atención médica, un problema en el manejo del paciente, pues cuando se detecta la drogorresistencia se tiene que optar por esquemas de tratamiento que son más costosos, difíciles de conseguir, ocasionan efectos secundarios serios y por la propia condición del paciente, son de menor efectividad

La tuberculosis es una enfermedad ocasionada por el *M. tuberculosis* variedad *hominis*, microorganismo aerobio estricto que vive mejor en medios con tensiones fisiológicas altas de O<sub>2</sub> y pH de 6.5 a 7, se multiplica lentamente, cada 14 a 16 hrs y no produce toxinas o sustancias químicas nocivas al organismo. El contagio ocurre generalmente en el ambiente intradomiciliario y lo favorece el hacinamiento. Se transmite por vía aerógena del enfermo bacilífero al hombre sano; el bacilo se aloja en el pulmón, dando lugar a un chancro de inoculación, una linfangitis y una adenitis, lo que se traduce en clínica como un cuadro gripal que dura aproximadamente una semana, éste fenómeno tiene dos opciones: la diseminación precoz progresiva que evoluciona a tuberculosis enfermedad, que incluye la localización en el Sistema Nervioso Central produciendo la meningitis tuberculosa, una forma grave que deja secuelas irreversibles. La segunda opción se conoce como primoinfección tuberculosa, es una diseminación precoz abortiva que en el 99 % de los casos entra en la circulación venosa por vía linfática y deja una siembra de bacilos vivos, virulentos en casi todos los órganos de la economía; estos casos pueden vivir hasta 50 años. Estos bacilos pueden reactivarse y provocar la enfermedad, a la que se conoce como reactivación endógena, que puede ser ocasionada por varias condiciones: desnutrición, alcoholismo, embarazo, lactancia, enfermedad concomitante como diabetes, alteraciones de la colágena, administración de inmunosupresores o corticoides y otros eventos orgánicos importantes. (1). La continuidad de la cadena de transmisión que mantiene la endemia

en la población, depende de factores como la prevalencia de fuentes de infección, representada por los casos pulmonares bacilíferos, el número de personas infectadas por caso y la probabilidad de los infectados de desarrollar la enfermedad; esta probabilidad de enfermar se relaciona con el agente, las condiciones del huésped y el ambiente(1).

## ANTECEDENTES

La tuberculosis es una enfermedad curable. La quimioterapia se estableció hace casi 60 años, cuando se descubrió la estreptomina en 1943, éste hecho marcó una etapa nueva en el manejo de la enfermedad, porque fue el primer antimicrobiano que demostró eficacia contra el bacilo tuberculoso (2), sin embargo, fue evidente que el monoterapia con este medicamento solía ser ya entonces un fracaso terapéutico que se relacionaba con resistencia in vitro al medicamento. Fue entonces que se combinaron el ácido aminosalicílico e isoniacida con estreptomina en tratamiento que curaba en aquel tiempo, casi todos los casos de tuberculosis.

El tratamiento era altamente exitoso porque se aplicaba en los hospitales, donde el cumplimiento se aseguraba y por lo tanto la resistencia adquirida al fármaco era infrecuente. Sin embargo, a finales de la década 1960-1970 el tratamiento se cambió al ámbito de la consulta externa y este cambio redujo el cumplimiento con índices crecientes de fracaso terapéutico, recidivas y adquisición de resistencia farmacológica (3).

Existen diferentes maneras en que los microorganismos escapan a la acción de los fármacos:

Por alteraciones estructurales en los componentes microbianos que interfieren en la penetración del fármaco. El bacilo tuberculoso tiene índices espontáneos de mutaciones cromosómicas que confieren resistencia a antimicrobianos. Bajo esta consideración el surgimiento de drogaresistencia representa la sobrevivencia de mutaciones preexistentes aleatorias. Cuanto más numerosa es la población bacilar, hay más probabilidad de encontrar bacilos resistentes a cualquiera de las drogas, de ahí

que se considere que los pacientes con lesiones cavitadas pudieran tener una frecuencia elevada de drogorresistencia (2).

Factor metabólico. Los medicamentos sólo pueden ejercer su acción bacteriológica en bacilos con metabolismo activo y que se multiplican activamente, por lo tanto los bacilos con metabolismo bajo no son afectados y pueden sobrevivir en presencia de medicamentos (3).

Factores farmacológicos. Por quimioterapia inadecuada, en la dosis, en el número de medicamentos en la ingesta, una cepa sensible de *Micobacterium tuberculosis* puede volverse resistente a múltiples fármacos en cuestión de meses( 4).

Se conoce como drogorresistencia primaria antituberculosa, la que se observa en pacientes que nunca han sido tratados y que fueron infectados con bacilos que se hicieron resistentes en otro individuo debido a una quimioterapia inadecuada o por falta de cumplimiento en la regularidad de un buen esquema terapéutico (resistencia secundaria).

Cuando un bacilo tuberculoso desarrolla resistencia a dos o más drogas usadas para tratamiento de la tuberculosis se le conoce como multidrogorresistencia (MDR) y generalmente se asocia con isoniacida (INH) y rifampicina (R), aunque pueden estar involucradas más drogas(5).

En años recientes en algunos países se ha reportado un incremento de la resistencia a los medicamentos utilizados contra la tuberculosis; sin embargo, los diferentes estudios realizados muestran diferencias en cuanto a drogorresistencia primaria y secundaria a los diferentes fármacos, así entre 1988 y 1994 en España (Castilla-La Mancha) se estudiaron 276 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar basado en su historia clínica, encontrándose una resistencia primaria en 2.9 % y secundaria en el 46%. El 6 % fue resistente a una sola droga (6).

En Japón en 1952 se realizó un estudio multicéntrico en pacientes de 38 hospitales, se encontró una resistencia primaria del 5% y secundaria del 27.8%. La multidrogorresistencia fue de 14% (7).

En el lustro comprendido entre los años 1985 y 1990 la Organización Mundial de la Salud, realizó una encuesta por muestreo aleatorio de drogorresistencia primaria en la

Región de Las Américas, con la participación de 10 países dentro de los cuales se encontró México. Se incluyeron en el estudio 948 muestras que se identificaron como *M. tuberculosis* y que habían sido aisladas de pacientes que presuntamente nunca habían sido tratados. Se encontró que uno de cada seis casos había desarrollado algún tipo de resistencia primaria. Se detectaron pacientes con resistencia a una o más drogas en un 16.8 %, la resistencia global a estreptomycin fue de 11.5%, isoniacida 6.5%, tiacetazona 2.6%, rifampicina 1% y etambutol 0.4%. En el 12.2 % de los casos se encontró resistencia a una sola droga, el 3.3 % simultáneamente a dos medicamentos y el 1% a tres medicamentos. El rango de resistencia primaria entre diferentes países fluctuó de 7.0 a 42.7%, lo que para México representó el 19.1% (9).

En una revisión realizada por La Organización Mundial de la Salud, analizaron 63 regiones entre 1985 y 1994, encontraron drogorresistencia primaria a isoniacida con rangos de 0 a 16.9%(mediana de 4.1%), a estreptomycin de 0.1 % a 23.5%(mediana de 3.8%), rifampicina de 0% a 3.0 (mediana de 2%) y etambutol de 0 a 4.2% (mediana de 0.1 %). Con relación a la drogorresistencia secundaria, los reportes fueron para isoniacida de 4% a 53%(mediana de 10.6%) y etambutol de 0% a 13.7%(con mediana de 1.8%). Los resultados para multidrogorresistencia fueron para Nepal 48 %, India 33%, Nueva York 30.1 %, Bolivia 15% y Korea 14 %. En un estudio realizado en Chile en el periodo de 1963 a 1964, la frecuencia observada de resistencia primaria fue de 20 % (4).

En México los primeros estudios realizados en la Secretaría de Salud en 1985 en un total de 571 pacientes, encontraron una drogorresistencia primaria de 10.3 %, con 8.6% a estreptomycin y 3.7 % a isoniacida. Del total de los casos, la resistencia fue mayor a un solo fármaco 62.7% que a dos, con el 33.9% (3).

En otro estudio realizado en México, en el área central, de 1991 a 1995, se incluyeron un total de 262 pacientes con aislamientos de *M. tuberculosis*, se les practicó prueba de sensibilidad por el método radiométrico con isoniacida, rifampicina, estreptomycin y etambutol. El 28% fue resistente a una o más drogas, el 18 % a isoniacida, 12% a rifampicina, 6 % a estreptomycin, 2 % a etambutol y un 13%, había desarrollado multidrogorresistencia (10).



En Veracruz en un estudio realizado de 1995 a 1998 en 6 municipios de la jurisdicción sanitaria de Orizaba, en una muestra de 284 pacientes BAAR+, se aislaron 232 cepas de *M. tuberculosis*. Se encontraron 66 (28%) con algún tipo de resistencia y una multidrogorresistencia de 10.8%, con una resistencia primaria de 20% y adquirida de 54.7% (11).

El esquema de tratamiento utilizado para los pacientes con tuberculosis pulmonar que nunca han recibido tratamiento fue el primario supervisado, con una fase intensiva diaria de lunes a sábado, hasta completar 60 dosis a base de una combinación fija en una sola toma de isoniacida (75 mg), rifampicina (150 mg) y pirazinamida (400 mg), seguida de una fase de sostén intermitente tres veces por semana, en una sola toma, una combinación fija de isoniacida (200 mg) y rifampicina (150 mg), hasta completar 30 dosis.

Los pacientes con patología agregada, como diabetes, desnutrición, VIH, recibieron el tratamiento primario reforzado que incluye además del descrito anteriormente etambutol (1.2 gr) o estreptomina (1 gr ) diarios hasta completar 72 dosis en la fase intensiva y 56 dosis en la fase de sostén.

### Planteamiento del problema

Esta enfermedad había sido aparentemente conquistada hace algunos años; sin embargo nuevamente constituye un riesgo de enormes proporciones para la salud; en 1993 la Organización Mundial para la Salud declaró que la tuberculosis debe ser considerada, como una emergencia mundial ya que en muchos países está fuera de control y amenaza la vida de una parte importante de la población. La drogorresistencia, la asociación con VIH, el acelerado crecimiento demográfico y la existencia de programas de control inadecuados, son causa del incremento de la incidencia en la población de adultos jóvenes que hacen de la tuberculosis un problema de salud pública dramático en la década de 1990, por lo que se hace necesaria una acción urgente prioritaria en todo el mundo (1).

## OBJETIVO GENERAL

Conocer la proporción de pacientes con drogorresistencia primaria a los fármacos utilizados en el tratamiento primario para tuberculosis pulmonar.

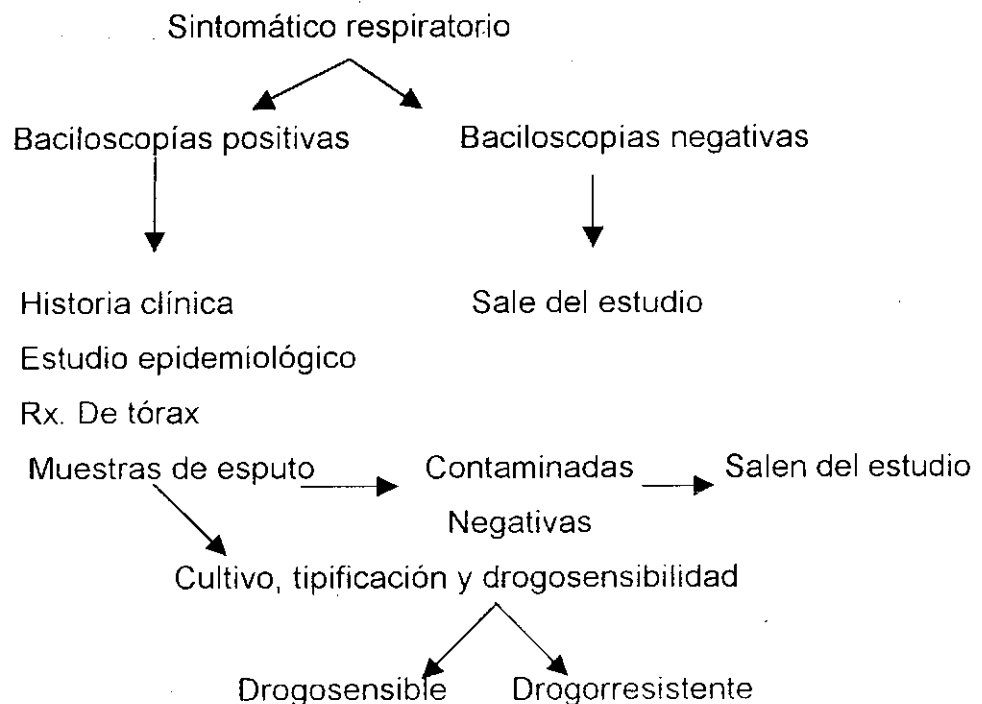
## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar cultivo y tipificación del *M tuberculosis*
- Determinar la proporción de pacientes con drogorresistencia a isoniacida, estreptomina, rifampicina, etambutol y pirazinamida
- Describir el género y la edad de los pacientes drogorresistentes
- Conocer las características de las lesiones pulmonares de los pacientes drogorresistentes

## HIPOTESIS

En Los Servicios de Salud de Veracruz la proporción de pacientes con tuberculosis pulmonar que presentan drogorresistencia primaria, es más elevada que alguno de los valores más altos reportados en la literatura (20.0%).

## DISEÑO



## MATERIAL Y METODO

Se realizó un estudio observacional transversal descriptivo que contempló 157 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar de 8 jurisdicciones sanitarias del estado seleccionadas por conveniencia. Incluyó pacientes mayores de 12 años que acudieron a las diferentes unidades de salud de las jurisdicciones sanitarias de Pánuco, Poza Rica, Martínez de la Torre, Xalapa, Córdoba, Veracruz, San Andrés Tuxtla y Coatzacoalcos, que presentaban tos productiva, a los que se les realizaron baciloscopías, estudio de esputo que constituye la técnica de elección para diagnóstico de tuberculosis pulmonar, en serie de tres, mismas que se procesaron en el Laboratorio de la jurisdicción correspondiente para examen microscópico con técnica de Ziehl-Neelsen. Los pacientes con muestras negativas se eliminaron del estudio. A los pacientes con resultados positivos se les requisitaron los formularios de estudio epidemiológico y el de caso para determinar drogorresistencia, se les tomó una radiografía de tórax y una muestra de esputo misma que se envió al Laboratorio Estatal de Diagnóstico y Referencia de Tuberculosis. Las muestras que llegaron contaminadas se eliminaron, las demás se cultivaron en medio de Lowenstein-Jensen (para recuperación de cepas en caso necesario) para efectos del protocolo por método radiométrico cultivo y tipificación de micobacterias, eliminación de cultivos negativos y selección de cultivos positivos a *M. tuberculosis* para determinación de drogosensibilidad. El estudio se realizó de marzo de 1999 a marzo del 2002

## MUESTRA

### RECOLECCION, CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Se instruyó a los pacientes para la obtención de la muestra, que consistió en toma de la primera expectoración de la mañana, obtenida haciendo una inspiración profunda seguida de golpes de tos, a fin de recolectarse en un frasco limpio de boca ancha y tapa de rosca.

Los frascos se recibieron tapados debidamente rotulados con el nombre del paciente en las unidades de salud, en donde se requisitó el formato de solicitud de laboratorio y se envió al laboratorio correspondiente.

## EXAMEN DIRECTO DEL ESPUTO (BACILOSCOPIA)

Se seleccionó una porción purulenta de la muestra, con un aplicador de madera dividido en dos partes, se extendió en un rectángulo de 1 x 2 cm en el centro de un porta objetos, realizando movimientos circulares, con lo que se logró un material homogéneamente distribuido. Se procuró que el frotis quedara lo suficientemente fino para permitir observar el bacilo. Uno de los extremos del porta objeto se utilizó para la identificación con las iniciales y número del paciente, escrito con lápiz de punta diamante. Se secó a temperatura ambiente, se fijó y se pasó dos o tres veces por la flama por la cara opuesta del porta objetos.

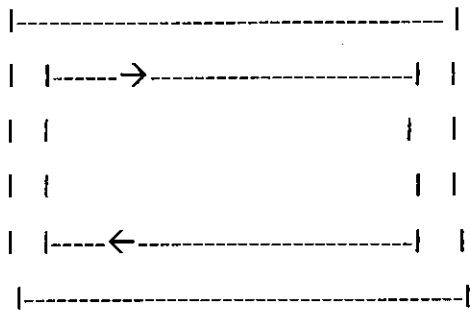
## COLORACION

Se cubrió el frotis con la solución de fucsina básica fenicada y se calentó por la cara opuesta hasta emisión de vapores, evitando que hirviera. Se dejó actuar por 5 minutos, posteriores a los cuales se lavó con agua destilada y decoloró con ácido – alcohol al 3% durante 1 minuto. Posteriormente se lavó con agua destilada y agregó azul de metileno al 0.1% durante 1 minuto, se lavó nuevamente con agua destilada y se secó a temperatura ambiente.

## OBSERVACION MICROSCOPICA

Se utilizó objetivo de inmersión.

Se observó campo a campo 2 líneas horizontales 2 líneas verticales comenzando por una línea horizontal.



## INTERPRETACION

Se consideró negativo cuando no se encontraron bacilos ácido – alcohol resistentes en 100 campos observados, positivos (+) cuando el número de bacilos fue de 1 a 9, en 100 campos observados, positivo (++) si se identificaban de 1 a 10 bacilos por campo, en promedio en 50 campos observados y positivo (+++) con más de 10 bacilos por campo, en 20 campos observados.

Cuando se encontró sólo de 1 a 9 bacilos en 100 campos microscópicos observados, se amplió la lectura a otros 100 campos utilizando una nueva línea en la misma preparación

Para el presente estudio se realizó el cultivo en método tradicional a fin de poder recuperar las cepas si fuera necesario y para el protocolo, el método radiométrico para cultivo y tipificación, se eliminaron los cultivos negativos

La radiometría semi-automatizada BACTEC para la determinación del crecimiento de micobacterias se lleva en menos tiempo que con el método convencional de Lowestein- Jensen y ha mostrado gran utilidad. Sin embargo estas técnicas son

altamente costosas y complejas, el personal debe ser altamente calificado en el manejo de este equipo. El método utilizó un medio líquido al que se incorporó un sustrato marcado con carbono radioactivo ( $^{14}\text{C}$ ). Las micobacterias al tomar el  $^{14}\text{C}$  del sustrato, lo metabolizan desprendiendo  $^{14}\text{CO}_2$  a la atmósfera del frasco, el cual se determinó cuantitativamente en una escala o índice de crecimiento (GI).

El método radiométrico BACTEC tiene las siguientes aplicaciones:

- Detección rápida de micobacterias para diagnóstico.
- Prueba de diferenciación (NAP) del complejo *M. Tuberculosis* de las otras micobacterias.
- Pruebas de susceptibilidad a los medicamentos antituberculosos: Estreptomina, Isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad con el método radiométrico han mostrado correlación del 95% al 97% con los métodos estándar (12).

## RESULTADOS

-De 157 pacientes se aisló *M. tuberculosis* en 116 (73.9%), 27 (17.2%) dieron resultados negativos y 14 (8.9%) muestras estaban contaminadas, por lo tanto se eliminaron.

- 37 (31.9 %) de los pacientes en los que se tuvieron aislamiento mostró resistencia a por lo menos un medicamento

-22 (59.5%) de los pacientes que mostró algún tipo de resistencia son hombres y 15 (40.5%) mujeres ( Fig. 1). La mediana de edad de estos pacientes fue de 34 años.

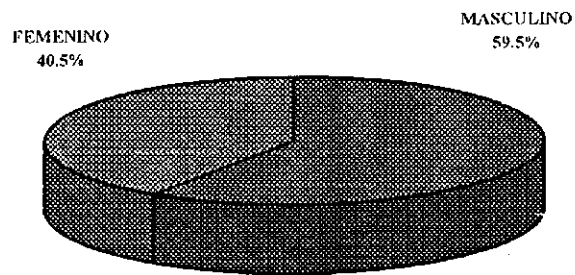


Figura 1. Casos de tuberculosis, distribución por género, el mayor porcentaje de los pacientes que mostró resistencia a por lo menos un medicamento fueron hombres.

-Por lo que respecta a las lesiones pulmonares de los 116 pacientes en los que se tuvieron aislamiento sólo en 70 (60.3%) se obtuvo el reporte radiológico. De ellos 25 (64.0%) de los pacientes sensibles y 14 (35.8%) de los pacientes resistentes presentaron lesiones excavadas, 3 (60.0%) sensibles y 2 (40%) de los resistentes tuvieron lesiones nodulares, 13 (50.0%) de los pacientes sensibles y 13 (50%) resistentes mostraron lesiones combinadas.

TIPO DE LESION	SENSIBLES	%	RESISTENTES	%
EXCAVADAS	25	64.1	14	35.8
NODULAR	3	60.0	2	40.0
COMBINADA	13	50.0	13	50.0
TOTAL	41	58.6	29	41.4

Cuadro 3. Tipo de lesión pulmonar en los pacientes con tuberculosis. Tanto en los casos en los que se aislaron cepas sensibles como en los resistentes el tipo de lesiones predominantes fueron las excavadas y combinadas.



- Por tipo de medicamento 17 (14.65%) de los pacientes fueron resistentes a Estreptomicina, 21(18.1%) a Isoniacida, 2 (1.7%) a Rifampicina, 12 (10.3%) a Etambutol y 0 a Pirazinamida. ( Cuadro No. 1)

MEDICAMENTO	NUMERO DE CASOS	%
	( N=116)	
ESTREPTOMICINA	17	14.7
ISONIACIDA	21	18.1
RIFAMPICINA	2	1.7
ETAMBUTOL	12	10.3
PIRAZINAMIDA	0	0

Cuadro No 1. Resistencia primaria del *M. tuberculosis* por tipo de medicamento. El fármaco que registró mayor resistencia fue la isoniacida, seguida de estreptomicina y etambutol. Ninguna de las cepas presentó resistencia a la pirazinamida.

Por jurisdicción sanitaria, como se muestra en el Cuadro No 2, los pacientes de Martínez de la Torre fueron los que observaron la mayor frecuencia de drogorresistencia a por lo menos una droga, con un 60%, seguidos de los de San Andrés Tuxtla con 40 %,Veracruz con 37.5%, Coatzacoalcos 34.8% y Xalapa con 33.3%. Los que menor resistencia reportaron fueron los de las jurisdicciones sanitarias de Poza Rica y Pánuco con 18.8% y 7.7% respectivamente.

De los 116 pacientes en los que se aisló *M tuberculosis* 37 (31.9%) mostraron resistencia a por lo menos una droga.

JURISDICCIÓN SANITARIA	NUMERO DE CEPAS SENSIBLES	NUMERO DE CEPAS RESISTENTES	TOTAL DE CEPAS	CEPAS RESISTENTES %
PANUCO	12	1	13	7.7
POZA RICA	12	3	16	18.8
MARTINEZ DE LA TORRE	4	6	10	60.0
XALAPA	10	5	15	33.3
CORDOBA	11	5	16	31.3
VERACRUZ	5	3	8	37.5
SAN ANDRES TUXTLA	9	6	15	40.0
COATZACOALCOS	15	8	23	34.8
TOTAL	78	37	116	31.8

Cuadro No 2. Resistencia del *M. tuberculosis* a por lo menos una droga, por jurisdicción sanitaria. La mayor proporción de drogorresistentes correspondieron a pacientes de las jurisdicciones sanitarias de Martínez de la Torre, San Andrés, Veracruz y Coatzacoalcos. La resistencia primaria total a por lo menos un droga fue de 31.9 %.

Jurisdicción sanitaria	Total de pacientes resistentes	Estreptomicina %	Isoniacida %	Rifampicina %	Etambutol %	Pirazinamida -
Pánuco	1	1 100	-	-	-	-
Poza Rica	3	3 100	1 66.7	1 33.3	1 3.33	-
Martínez de la Torre	6	4 66.7	4 83.3	-	2 33.3	-
Xalapa	5	1 20.0	3 40.0	-	1 20.0	-
Córdoba	5	1 20.0	4 80.0	-	3 60.0	-
Veracruz	3	2 66.7	-	-	3 100	-
San Andrés Tuxtla	6	4 66.7	2 33.3	1 16.7	1 16.7	-
Coatzacoalcos	8	1 12.5	7 87.5	-	1 12.5	-
Total	37	17 45.9	21 59.5	2 5.4	12 32.4	-

Cuadro No. 3.- Resistencia primaria por jurisdicción sanitaria, por tipo de medicamento. Los pacientes con resistencia primaria procedentes de las diferentes jurisdicciones sanitarias fueron resistentes en mayor proporción a isoniacida , rifampicina y etambutol, en ese orden de frecuencia, pudiéndose observar que un mismo paciente pudo mostrar resistencia a más de un fármaco. Llama la atención que sólo dos de los pacientes, unode Poza Rica y uno de San Andrés Tuxtla fue resistente a rifampicina y ninguno a pirazinamida.

Finalmente como se puede observar en la Figura 2, el 67.2 % (78 ) de los pacientes fueron sensibles a los fármacos de primera línea ya mencionados, el 23.2 % (27 ) mostró resistencia a una sola droga, el 6.9% (8) a dos y 2.3% (3) multidrogorresistente.

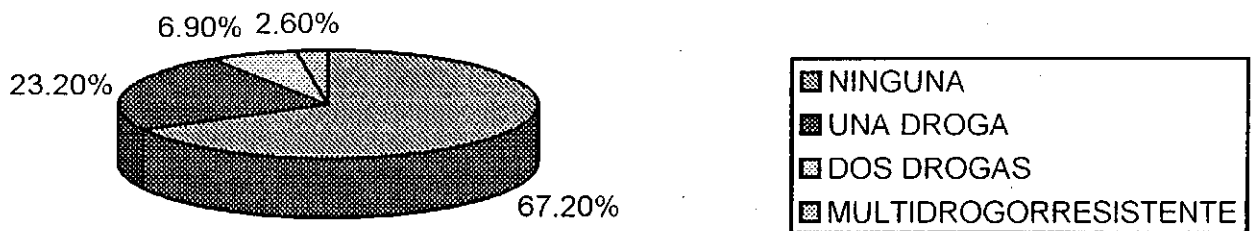


Figura 2 . Resistencia primaria de los pacientes a una, dos o más drogas (estreptomycin, isoniacida, rifampicina y etambutol y ) .La mayor resistencia encontrada fue a una sola droga, isoniacida.

## DISCUSIÓN

La quimioterapia de la tuberculosis se inició cuando se descubrió la estreptomicina en 1943, este medicamento tiene acción bactericida potente y actúa interfiriendo con la síntesis de proteína del *Micobacterium tuberculosis*. sin embargo fue evidente que el monoterapiamiento con este medicamento solía ser ya entonces un fracaso terapéutico que se relacionaba con la resistencia in vitro al medicamento. A partir de entonces el descubrimiento y uso de otras drogas se fue incorporando en la terapia antituberculosa.

A principios de 1960 a través de estudios clínicos controlados en la India, se demuestra que la tuberculosis es cien por ciento curable y se establecen además como principios básicos del tratamiento el usar cuando menos tres medicamentos para evitar que se desarrollen bacilos resistentes y administrar los medicamentos durante tiempo prolongado para evitar recaídas. Combinándose entonces el ácido paraaminosalicílico con acción bacteriostática e isoniacida, -cuya acción bactericida sobre el bacilo la realiza interfiriendo la síntesis de ácido y el metabolismo intermedio, bloqueando la formación de la membrana- con la estreptomicina, en tratamiento que curaba casi a todos los casos de tuberculosis. Este tratamiento era altamente exitoso porque se aplicaba en hospitales, donde se aseguraba el cumplimiento del mismo y por lo tanto la resistencia adquirida al fármaco era infrecuente, sin embargo a finales de la década de 1960-1970 el tratamiento se cambió al ámbito de la consulta externa, lo que redujo el cumplimiento con recidivas e índices crecientes de fracaso terapéutico.

En 1982 se introdujo el esquema de tratamiento primario de corta duración con administración de tres fármacos isoniacida, rifampicina -con acción bactericida que interfiere los procesos enzimáticos de la polimerasa del ácido e impide la duplicidad celular- y la pirazinamida con acción bactericida sobre el bacilo tuberculoso intracelular, responsable de las recaídas. Este esquema de tratamiento se redujo en relación al período de aplicación de 12 a 6 meses. A partir de 1986 se inició tratamiento con fármacos combinados en una sola tableta, isoniacida, rifampicina y pirazinamida, con una eficacia mayor al 90 % de curación, sin embargo la falta de

adherencia al tratamiento ha constituido uno de los principales problemas de fracaso terapéutico. A finales de 1996 se establece la estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado que contempla cuatro drogas combinadas (Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol) en algunos estados de la república, incluyendo algunos municipios de Veracruz.

Existen varias maneras en que los microorganismos escapan a la acción de los fármacos. Mediante alteraciones estructurales en los componentes microbianos que interfieren la penetración del fármaco. El bacilo tuberculoso tiene índices espontáneos de mutaciones cromosómicas que confieren resistencia a antimicrobianos. Dichas mutaciones no están asociadas. Bajo esta consideración el surgimiento de farmacorresistencia representa la sobrevida de mutaciones preexistentes aleatorias. Cuanto más numerosa es la población celular, hay mayor probabilidad de encontrar bacilos resistentes a cualquiera de las drogas, por lo que se considera que los pacientes con lesiones cavitadas pudieran tener una frecuencia elevada de resistencia (2); en nuestro estudio de los 116 pacientes en los que se tuvieron aislamientos, sólo en 70 ( 60.3%) se contó con estudio radiográfico, de ellos en los que se aislaron cepas sensibles 25 ( 64.1%) presentaron lesiones excavadas, 3 (60.0%) nodulares y 13 (50.0) combinadas. De los que mostraron drogorresistencia 14 ( 35.8%) presentaron lesiones pulmonares excavadas, 2 ( 40% ) nodulares y 13 ( 50.0%) combinadas.

Factor metabólico. Los medicamentos sólo pueden ejercer su acción bacteriológica en los bacilos con metabolismo activo y que se multiplican continuamente; por lo tanto los bacilos de metabolismo bajo, debido a las condiciones del medio en que se encuentra no los afecta la mayoría de los medicamentos y pueden sobrevivir en presencia de medicamentos potentes(3).

Por otro lado no todos los medicamentos penetran en los tejidos y células en donde se encuentran los bacilos, por lo que en ocasiones esas barreras anatómicas impiden la acción terapéutica de los medicamentos, situaciones que condicionan presencia de bacilos resistentes.

Factores farmacológicos. Si la quimioterapia es inadecuada (monotratamiento), ingesta errática a los medicamentos prescritos, número insuficiente de medicamentos

activos en el tratamiento un paciente sensible puede volverse resistente a múltiples fármacos en cuestión de meses (4).

De tal manera que se conoce como resistencia primaria a la farmacoterapia antituberculosa, la cual se observa en pacientes que nunca han sido tratados y se asocia más a individuos que pudieron haber sido infectados con bacilos que desarrollaron resistencia en otros pacientes, debido a una quimioterapia inadecuada o por falta de cumplimiento en la regularidad de un buen esquema terapéutico (resistencia secundaria)

En las evaluaciones de las cohortes de casos sometidos a tratamiento primario supervisado en las áreas de estudio se ha reportado una eficacia al tratamiento del 95.0 al 100 % pero una eficiencia entre el 77.4 % y el 94.1%. Por jurisdicción sanitaria la de Veracruz registró el mayor número de abandonos de tratamiento con una eficiencia del 77.4 % y es de las que nuestro estudio presentó mayor proporción de pacientes drogorresistentes, otras como Martínez de la Torre y San Andrés Tuxtla que tuvieron alta proporción de pacientes drogorresistentes, en la cohorte mostraron una eficiencia del tratamiento del 87.2% y 85.1% respectivamente y recordemos que la drogorresistencia primaria se asocia con frecuencia con drogorresistencia secundaria (fracaso terapéutico). Sin embargo este comportamiento es diferente en los pacientes de Coatzacoalcos en el estudio mostraron una drogorresistencia primaria del 34.8% y la cohorte una eficacia de las más altas, del 94.1%.

En el presente estudio la frecuencia de la drogorresistencia primaria de los pacientes a por lo menos un fármaco fue del 31.8 %, considerado dentro de los valores mas altos registrados en los estudios en otros países y en México. Así en los estudios realizados entre 1988 y 1994 en España se encontró una drogorresistencia primaria del 2.9% (6) y en el realizado por la Organización Mundial de la Salud en la Región de las Américas entre la década de 1980 y 1990 con participación de 10 países dentro de los cuales se encontró México, el rango de drogorresistencia primaria entre los diferentes países fluctuó de 7% a 42.7%. México presentó 19.1% (9). En otro estudio realizado en México por la Secretaría de Salud, en 1985 la drogorresistencia primaria fue de 10.3% (3).

Por tipo de fármaco aún cuando los resultados varían en los diferentes estudios, en cuanto a isoniacida en el presente estudio la drogorresistencia primaria fue del 18.1 % semejante a lo reportado en un estudio del área central de México con resultados del 18% (10), no así para estreptomycin y etambutol, en los que nuestros resultados son más altos, del 14.7% y 10.6 % respectivamente en relación a 6% y 2% para los mencionados fármacos, en el estudio señalado, situación que se torna preocupante ya que éste último fármaco recientemente se reintrodujo como parte del esquema primario y la isoniacida ha sido por muchos años y sigue siendo un medicamento base del tratamiento primario.

La rifampicina, uno de los fármacos mayormente utilizados dentro de los esquemas primarios en los últimos años, muestra la menor proporción de drogorresistencia con un 1.7 % y la pirazinamida no desarrolló resistencia.

En relación al comportamiento general de la resistencia con el número de drogas, los resultados obtenidos a una droga fueron del 23.2 %, a dos del 6.9 % y del 3.4 % a tres o más, son más altos que los reportados en el estudio de las Américas del 12.2 % 3.3% y 1% respectivamente (9), en tanto son más bajos que los obtenidos en el estudio del área Central de México con 28% de resistencia a una o más drogas y 13% multidrogorresistente (10).

Aun cuando estos resultados son producto de estudios in-vitro, y se ha estudiado poco al respecto, es innegable la estrecha relación que existe entre la clase de resistencia y el riesgo de fracaso terapéutico, por lo que es necesario intensificar los esfuerzos de asegurar la cura radical de los pacientes tuberculosos y quizás revisar la conveniencia o no de tener dentro de los medicamentos de primera línea al etambutol, mismo que además de tener sólo acción bacteriostática, en el presente estudio muestra resultados de resistencia altos, en relación a otros estudios.

Por otro lado, estudios de resistencia primaria y secundaria en algunos países, como Chile (4), han sido utilizados como pronóstico para determinar la incidencia de tuberculosis en una comunidad determinada, posiblemente asociada a fracaso terapéutico atribuible a resistencia medicamentosa, a fin de reorientar las acciones del programa de prevención y control del padecimiento.



## CONCLUSIONES

1.-Hasta el momento la proporción de pacientes que mostró drogorresistencia primaria a por lo menos una droga fue del 31.8 %, de ellos, 17 (14.6%) a estreptomina, 21 (18.1%) a isoniacida, 2 (1.7%) a rifampicina, 12 (10.3%) a etambutol y 2 (1.7%) a pirazinamida. Cifras de drogorresistencia superiores a las encontradas en la literatura mundial.

2.- El 67.2 % de las cepas aisladas de *M. tuberculosis* fueron sensibles a los fármacos de primera línea ya mencionados, el 23.2 % mostró resistencia a una droga, el 6.9% a dos y un 2.6 % fue multidrogorresistente.

3.-La pirazinamida no se asoció a drogorresistencia por lo que es conveniente reflexionar en su uso como fármaco en el tratamiento de primera línea.

4.- Es cuestionable la incorporación del etambutol en el tratamiento primario, ya que además de tener solo acción bacteriostática, en el presente estudio mostró alta proporción de pacientes con drogorresistencia primaria.

5.- La isoniacida que es un medicamento utilizado sistemáticamente en el tratamiento primario mostró en este estudio alta proporción de casos drogorresistentes

5.- Las jurisdicciones sanitarias con mayor proporción de pacientes con drogorresistencia primaria fueron : Martínez de la Torre (60%), San Andrés Tuxtla (40.0%) y Veracruz (37.5%), tuvieron un nivel intermedio (30%) Xalapa, Córdoba y Coahuila. Se consideran cifras elevadas y se requieren estudios adicionales de tipo explicativo.

## Referencias bibliográficas

1. - Secretaría de Salud. Manual de Normas y Procedimientos para la Prevención y Control de la Tuberculosis. 1996.p.2-4.
2. - Santaella Solis A, Balandrano Campos S, Anzaldo Flores G. La Farmacorresistencia de la Tuberculosis en México- Bo. Epidem. Sem. 2. Enero 1997 p. 1-3.
- 3.- Michel D. Iseman. Tratamiento de la Tuberculosis Multidrogorresistente. Infectología, año 14 NÚM. 10 octubre 1994. P. 497- 511.
- 4.- Pedro Valenzuela H. Utilidad de los Estudios de Resistencia a Medicamentos Antituberculosos. Pan Am/Public Health (1).1997.
- 5.- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-006-SSA 2. 1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. Publicada en el Diario Oficial de la Federación 26 enero de 1995.
- 6.- Arévalo M, Solera J, Cebrian D, Bartolomé J, Robles P. Risk factors associated with drug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Castilla-la-Mancha. Eur. Respir. J.1996.feb;9 (2):274-278.
- 7.- Hirano K; Kazumi y, Abe C, Muri T, Aoyagi T. Resistance to antituberculosis drugs in Japan. tUber Lung Dis.1996 Apr;77 (2) 130-135.
- 8.- Cohr DL, Bustreo F, Raviglione MC: Drug-resistant T: Review of Wordwide Situation y the WHO/IVATLD Global Surveillance Proyect. International Union Againt Tuberculosis and Lung Disease Clin. Infect Dis 1997 Jan ;24 Supp/1 :S 121-130.
- 9.- Lazlo A, Kantor IN. A Random Sample Survey of drug resistance among tuberculosis cases in Latin America. Bol. Oficina Sanit Panam. 119 (·) 1995; 226-235.
- 10.- J. Sifuentes-Osornio, Ponce-de-Leon, M. Bobadilla-del-Valle, N Ramírez Fernández, L Infante-Suárez, M, Kato- Maeda, A.M.Nelson. Drug Resistance in Mycobacterial tuberculosis (MTB): A Survey in the Central Area of México. Institute National of Nutricion, México City, México y Armed Forces Institute of Patology, Washington D:C:USA.
- 11.- García M.L. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en el Centro de Veracruz.Méx.ISP.mayo.1997.

12.- Koreman/Allen/Dowell/Janda/Somers/Winn. Diagnóstico Microbiológico.3a. Edición. Edit. Panamericana. Capítulo 13. Micobacterias Veracruz.Mex.INSP.mayo.1997

## Bibliografía

- Blanch,A; Canthen G: M; Onorato ; Dansbury K; Kelly G. Driver C ; Snider D. National Survey of Drug-resistant Tuberculosis in the United States.Jama.march.2.1994-vol 271 n.9.p.666-671.

- BatesJ, MD,FCCP, Institutional Control Measure for tuberculosis in the Era of Multidrug Resistance ACCP CONSENSUS STATEMENT, CHEST/108/6/ December.1995.pp.1691-1710

- Crofton J; Chavlet P ; Mather D; Guidelines on the Management of Drug-Resistant tuberculosis. World Health Organization. TB/96.21013.- Small P.M ;Shafer R.W;Hopewell, P.C.Singh S.Pmurphy M.J.Desmond E;Sierra M; Schoolnik G.K. Exogenous reinfection with multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis in patients with advanced HIV infection. Journal of Medicine. The New England. Vol. 328; number 16.April 22 1993.pp. 1137-1144.

-Globe M. Drug-resistant Tuberculosis. Respiratory Infections Vol. 1 no.4 (december)1986.pp 220-229.

-Jost, K, C.Dumber D, F. Barth S.S.Headley V, L. Elliot L. B. Identification of Mycobacterium tuberculosis and M. Avium complex directly from Smear- Positive Sputium Specimens and Bactec 12 B cultures BY High-Performance Liquid Chromatography with fluorescence Detection and computer-driven Pattern Recognition Models. Journal of clinical Microbiology.may 1995 p.1270-1277.

-Michael D. Iseman. Treatment of Multidrug-resistant Tuberculosis. New England Journal Medicine. Vol. 329.no.11.sep.9.1993.p.784-791.

-OMS-OPS. La tuberculosis en América Latina y el Caribe. Hechos y cifras. Marzo 1996.pp.2-7.89.

-Stephen E. Weis, Philip C. Slocum. Francis X. Barbara King. The effect of directly observed therapy on the rates of Drug-resistance and relapse in tuberculosis. New England Journal of Medicine. Vol.330 no.17.april 28 1994.p. 1179-1184.

## APENDICE

### CULTIVO

La Muestra de esputo se trató mediante métodos de descontaminación para eliminar la flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras. El método que se utilizó fue el de PETROFF.

### METODO DE PRETRATAMIENTO

#### PETROFF

Muestra de esputo.

- 1.-Se trabajó en una campana de bioseguridad Tipo II . Se numeraron las muestras, sin exceder 12 por serie.
- 2.-En una gradilla se numeraron una cantidad igual de tubos estériles en la misma secuencia de los frascos de muestras. Los tubos con tapa de rosca.
- 3.- Los tubos conteniendo 2-4 ml de hidróxido de sodio al 4 % estéril con una gota de indicador de pH (rojo de fenol). Se añadió igual cantidad de esputo (2-4 ml). El esputo se aspiró con una pipeta de abertura ancha y se humedeció en la propia sosa al 4%.
- 4.- Se agitaron los tubos en un agitador tipo vortex durante 15 segundos.
- 5.- A continuación se colocaron los tubos en la incubadora a 37°C durante 15 minutos, se checaron y agitaron de nuevo aquellos que no se hubieran homogenizado.
- 6.- Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por 15 minutos.
- 7.- Se eliminó el sobrenadante en un dispositivo a prueba de salpicadura con fenol al 5%.
- 8.-Se neutralizó el sedimento con ácido clorhídrico 1N, antes de sembrar el pH final debe ser menor de 6.5 ni mayor de 7.2.
- 9.-Se agitó el sedimento y procedió a sembrar 0.2 ml en 2 tubo de medio de cultivo Lowestein – Jensen.

10.-Los medios se incubarán a 37 °C durante 8 semanas (a fin de recuperar las cepas)

#### Muestra y material

##### Reactivos:

Hidróxido de Sodio al 4% (NaOH)

Acido Clorhídrico 1N (HCl)

Medios de cultivo de Lowentein –Jensen

##### Material:

Tubo de ensaye de 50 ml. Estériles graduados

Pipetas pasteur estériles

Gradillas

Propipeta de caucho de 3 vías

##### Equipo

Campana de bioseguridad Tipo II

Vórtex

Centrifuga

Incubadora a 37°C

BACTEC 460TB.

##### Método radiométrico

##### Aplicación Prevista

El medio cualitativo BACTEC 12B para micobacterias se recomienda para el cultivo y la recuperación de micobacterias a partir de muestras clínicas o de muestras procesadas para aislamiento por métodos convencionales.

##### Denominación

##### Resumen y explicación de la prueba

La muestra se inoculó en frascos de medio 12B para micobacterias con una jeringa a través de la membrana de goma y se incubó. Los frascos de cultivo se analizaron periódicamente en un instrumento BACTEC 460TB, dicha prueba consiste en la extracción del gas que está contenido en el espacio vacío encima del medio y la

subsecuente determinación de su contenido radioactivo. Una lectura positiva indica la presencia de microorganismos viables del frasco.

#### Principio y procedimiento

El medio para micobacterias BACTEC 12B es una base enriquecida de caldo Middlebrook 7H12. Si hay microorganismos presentes en la muestra que se inocula dentro del frasco BACTEC, ellos utilizarán un substrato mezclado con  $^{14}\text{C}$  (ácido graso) presente en el medio y desprenderán  $^{14}\text{CO}_2$  a la atmósfera situada encima del medio. Cuando los frascos se analizaron en el instrumento BACTEC 460TB, se aspiró el gas del frasco y se determinó cuantitativamente la radiactividad de  $^{14}\text{CO}_2$  en términos numéricos en una escala que va de 0 a 999 radiactividad. Estos números constituyen lo que se denomina el índice de crecimiento (GI). Los números del GI se visualizaron en el instrumento BACTEC 460TB y se imprimió junto con los números de identificación de la gradilla y de cada frasco (100 unidades de GI son aproximadamente igual a 0.025  $\mu\text{Ci}$ ). El incremento diario del GI fue directamente proporcional al índice y la cantidad de crecimiento en el medio.

Si agregó un agente inhibidor al medio, la inhibición del metabolismo es evidente debido a que la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  es menor comparada con la de un medio control sin el agente inhibidor. Este principio básico se aplica a los análisis de sensibilidad a antibióticos y para diferenciar el complejo M. Tuberculosis de otras micobacterias.

El instrumento BACTEC 460TB debe utilizarse dentro de un área especial para tuberculosis cuando se use para micobacteriología. El área para tuberculosis proporciona aire de escape filtrado HEPA y una presión negativa en la zona de análisis. El Bactec está diseñado para realizar los análisis de los frascos automáticamente. La inoculación y los subcultivos se efectúan en un gabinete de bioseguridad tipo II ubicado en la misma área del Bactec 460 TB.

#### SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS ANTI-TB

El equipo farmacológico BACTEC S.I.R.E.P. contiene agentes antimicrobianos para uso con el medio BACTEC 12B en el análisis de *Mycobacterium tuberculosis*. Se utiliza principalmente con el instrumento BACTEC 460TB.

## Aplicación prevista

Los antibióticos BACTEC S.I.R.EP. (estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) se recomienda como aditivo para el medio de cultivo BACTEC 12B para pruebas de sensibilidad cualitativa de *M. tuberculosis* a partir de cultivos.

## Resumen y explicación de la prueba

El procedimiento BACTEC para prueba de sensibilidad de las micobacterias a los antibióticos se basa en el mismo principio básico utilizado en el método convencional, con la excepción de que se utiliza un medio líquido, y en lugar de contar las colonias después de 3 semanas aproximadamente, el crecimiento se controla radiométricamente y los resultados se pueden notificar de 4 a 12 días. La prueba BACTEC de sensibilidad a antibióticos se determina siguiendo una versión modificada del método convencional de las proporciones.<sup>1</sup> La proporción crítica para la resistencia se considera el 1% para todos los antibióticos contra la tuberculosis. Esto significa que si el 1% o más de la población micobacteriana da prueba resistente, el cultivo es considerado resistente para propósitos de informes del laboratorio. La resistencia se determina comparando el índice de crecimiento del frasco de control con el de los frascos de medio 12B con antibiótico de prueba.

## Principio del procedimiento

El principio del ensayo radiométrico BACTEC sensibilidad para micobacterias es similar al que se utiliza en el procedimiento de aislamiento primario. Cuando las micobacterias crecen en un medio 7H12 con un sustrato marcado con  $^{14}\text{C}$ , éstas utilizan el sustrato y se produce  $^{14}\text{CO}_2$ . La cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  detectada refleja la velocidad de crecimiento producida en el frasco, y se expresa como el valor del Índice de crecimiento (GI - <Growth Index>). Cuando se añade al medio antibiótico contra la tuberculosis, se produce la supresión del crecimiento si los organismos de prueba son sensibles. Esta supresión puede detectarse por una disminución o un aumento leve del GI diario en comparación con el control en el cual el inóculo bacteriano original era sólo en el 1/100 del que contenía el frasco con antibiótico.

## Reactivos

Los frascos con antibióticos BACTEC S.I.R.E.P. contienen los siguientes reactivos

Agente antimicrobiano liofilizado, cada frasco:

Estreptomina	-----	1,2 mg
Isoniacida	-----	0,02 mg
Rifampicina	-----	0,4 mg
Etambutol	-----	1,5 mg

## Extracción de la muestra

Los cultivos aislados puros con crecimiento activo se utilizan para las pruebas de sensibilidad. Medio 12B

## Procedimiento

Los antibióticos BACTEC S.I.R.E.P. (estreptomina, isoniacida, rifampicina y etambutol) se proporcionan en forma liofilizada, Deben seguirse el procedimiento de norma y las concentraciones de antibióticos después de ser reconstituido con 5 ml de agua estéril destilada/desionizada y después de ser diluidos (cuando sea necesario) es la siguiente:

ANTIBIOTICO	Reconstituido	factor de dilución	concentración	Cantidad añadida al medio 12B	Concentración final en el 12B/ml
Estreptomina	5 ml -----	250 $\mu$ g		0,1 mL	6.0 $\mu$ g
Estreptomina	5 ml	dil.a 1:3	80 $\mu$ g	0.1 ml	2, .0 $\mu$ g *
Isoniacida	5 ml -----		4 $\mu$ g	0,1 ml	0,1 $\mu$ g *
Rifampicina	5 ml -----		80 $\mu$ g	0,1 ml	2,0 $\mu$ g *
Etambutol	5 ml -----		300 $\mu$ g	0,1 ml	7,5 $\mu$ g
Etambutol	5 ml	dil.a 1:3	100 $\mu$ g	0,1 ml	2,5 $\mu$ g *

El equivalente a las concentraciones críticas recomendadas por el CDC.

## Preparación del medio con antibiótico

Utilice una solución con antibiótico preparada recientemente o descongele un tubo de solución madre congelada. Con una Jeringa desechable de 1 ml, añada exactamente 0.1 ml a un frasco BACTEC de medio 12B de 4 ml. Utilice una jeringa distinta para cada antibiótico. Tenga cuidado de no dejar entrar burbujas de aire en la jeringa, y de no usar los últimos 0,1 ml en la jeringa. Todo los frascos de medio 12B



utilizados en la prueba deben ser analizados previamente en un instrumento BACTEC 460TB para establecer una atmósfera de CO<sub>2</sub> en el frasco y para seleccionar todos los frascos con un GI de 200 ó más.

#### Preparación del inóculo bacteriano

Los cultivos de *M. tuberculosis* que crecen activamente en el medio 12 B o en los medios son utilizados para preparar la prueba de sensibilidad.

Lectura diaria	Acción
GI 300 – 499	Incuba un día más y luego prepare la prueba.
GI 500 – 799	Prepare la prueba el mismo día.
GI $\geq$ 800	Diluya a 1:2 con 1 ml de fluido diluyente; Prepare la prueba.

Si la prueba de sensibilidad se va a realizar más tarde, refrigere el frasco 12B. A este punto, la prueba de sensibilidad debe prepararse dentro de una semana. Con jeringa desechable de aguja fija, prepare un inóculo bacteriano uniforme aspirando y vaciando en forma alternativa el medio en el frasco varias veces sin retirar la aguja de la membrana del frasco. Este inóculo se utiliza directamente para la prueba de sensibilidad a antibiótico.

#### Cultivo medio sólido

Prepare una suspensión homogénea de varias colonias en un medio sólido. El cultivo no debe tener más de 4 a 5 semanas. Ajuste la suspensión hasta alcanzar un 0,5 mal McFarland si opta por el horario diario. Si no sabe con certeza la viabilidad o antigüedad del cultivo, realice un subcultivo en medio 12B para obtener un crecimiento fresco.

#### Inoculación

Ponga los frascos los frascos de medio 12B en orden en una gradilla y etiquételos como corresponde (generalmente, control, estreptomycin, isoniacida, rifampicina, etambutol). Necesitará un frasco para cada concentración de antibiótico y un frasco

para el control. (Las bandejas de cartón usadas para el envío pueden utilizarse como gradilla).

Use guantes de goma y trabaje en un gabinete de bioseguridad tipo II al inocular 0,1 ml de la suspensión bacteriana en cada uno de los frascos de medio BACTEC 12B con antibiótico. Utilice una jeringa desechable de tuberculina de aguja fija para esta inoculación.

Para el frasco de control, no inocule la suspensión directamente, sino que primero diluya a 1:100 transfiriendo 0,1 ml de la suspensión a 9,9 ml del fluido diluyente especial. Después de mezclar muy bien, invirtiendo 10 veces por lo menos, inocule 0,1 ml de esta dilución en el frasco de control con medio 12B (sin antibiótico).

Limpie con una torunda la superficie de cada frasco inoculado utilizando una compresa de gasa empapada con un desinfectante adecuado (formol al 5%), y luego limpie con una torunda con alcohol al 70%. Incube a 37°C + ó - 1° C.

#### Horario de lectura

Horario de análisis diario: Analice los frascos a diario (incluyendo los fines de semana y feriados) aproximadamente a la misma hora de cada día (más o menos 2 horas) en un instrumento BACTEC 460TB hasta que el frasco de control alcance un GI de 30 o más. Analice durante un mínimo de 4 días o un máximo de 12 días. Si opta por este horario de análisis, la prueba de sensibilidad a antibióticos se puede preparar cualquier día de la semana.

#### Interpretación de los resultados

Cuando los frascos de control alcanzan un GI de 30 ó más, los resultados deben interpretarse de la siguiente forma: si el AGI es menor en el frasco con antibiótico que en el frasco de control, la población es sensible, si es mayor, es resistente.

AGI (control) > AGI (antibiótico) – sensible.

AGI (control) < AGI (antibiótico) - resistente

AGI (control) = AGI (antibiótico) - dudoso

## LECTURA DIARIA DEL GI

Día	Control	Estreptomicona	Isoniacida	Rifampicina	Etambutol
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	100
4	65	14	500	12	91
5	+41	+2	+250	+2	-9
Resultado	--	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible

Muestra, reactivo y material necesarios

Muestra.- Esputo

Material.- Porta objeto y aplicador de madera (palillo)

Reactivos (Técnica de Ziehl- Neelsen

Fucsina básica.....3 gr.

Alcohol etílico de 95°.....100 ml.

Fenol acuoso:

Fenol cristales.....100ml.

Agua destilada.....10 ml.

Calentar en baño maría hasta la disolución completa del fenol y enfriar

Agitar y agregar agua destilada hasta completar un litro

Dejar reposar 24 hrs. y filtrar. Filtrar una vez por semana.

Azul de metileno:

Azul de metileno.....1 gr.

Alcohol etílico de 95°.....100 ml.

Disolver por agitación y agregar agua destilada hasta completar 1000 ml. Filtrar

Solución decolorante ( alcohol- ácido):

Acido clorhídrico.....30 ml.

Alcohol etílico 95°.....970 ml.

Dejar escurrir lentamente el ácido clorhídrico por las paredes del matraz que contiene el alcohol. Agitar suavemente.