



**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, CONCYT
SECRETARIA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, SENACYT
FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA – FONACYT
HOSPITAL ROOSEVELT**

INFORME FINAL

**Caracterización, Evaluación y Determinación de la Prevalencia de Mutaciones
asociadas con Resistencia a Rifampicina e Isoniacida en aislamientos clínicos de las
especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes del Hospital Roosevelt,
Guatemala**

PROYECTO FODECYT No. 062-2012

**Dr. Carlos Rodolfo Mejía Villatoro
Investigador principal**

Guatemala, 2014

HOSPITAL ROOSEVELT



AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología –FONACYT-, otorgado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología –SENACYT- y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYT-.

OTROS AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos A:

Por su apoyo y asesorías continuas para llevar a buen término el presente proyecto.

Licda. Mercedes Orozco Velásquez	Asesora Líneas de Financiamiento
Ing. Lesly Paola Rosales Meda	Profesional de Investigación y Desarrollo Tecnológico
Lic. Francisco Hernández	Analista Financiero de Proyectos
Lic. Nehemias Marroquín Merlos	Jefe de Administración Financiera de Proyectos
Personal de CONCYT	

Agradecemos A:

Dirección Ejecutiva del Hospital Roosevelt	Director en funciones y personal administrativo
Dra. Johanna Melendez	Encargada de Tuberculosis en Medicina Interna, Hospital Roosevelt
Personal Administrativo	Jefatura de la Clínica de Enfermedades Infecciosas
Enfermera graduada Cristina Porón	Encargada de Tuberculosis, Medicina Interna Hospital Roosevelt
Personal Administrativo	Jefatura de Medicina Interna, Hospital Roosevelt
Personal Profesional Area de Micobacterias y hongos	Area de Micobacterias y Hongos, Microbiología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Roosevelt. Licda. Rosie Alvarez, Licda. Vera Maria Alvarado, Licda. Analucía Lemus
Personal Técnico Area de Micobacterias y hongos	Area de Micobacterias y Hongos, Microbiología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Roosevelt

INDICE

Resumen	
Summary	
PARTE I	
I.1 Introducción	1
I.2 Planteamiento del problema	
I.2.1 Antecedentes en Guatemala	2
I.2.2 Justificación del trabajo de Investigación	3
I.3 Objetivos e Hipótesis	
I.3.1 Objetivos	
I.3.1.1 Generales	4
I.3.1.2 Específicos	4
I.4 Metodología	
I.4.1 Universo de Trabajo	5
I.4.2 Muestra	5
I.4.3 Recursos	
I.4.3.1 Recursos Humanos	5
I.4.3.2 Recursos Institucionales	5
I.4.3.3 Recursos Físicos	6
I.4.4 Metodología	7
I.4.5 Diseño del Estudio	11
PARTE II	
II.1 Marco Teórico	12
PARTE III	
III. Resultados	
III.1 Discusión de Resultados	29
PARTE IV	
IV.1 Conclusiones	37
IV.2 Recomendaciones	39
IV.3 Referencias bibliográficas	41
IV.4 Publicaciones y Patentes	43
IV.5 Anexos	44
PARTE V	
V.1 Informe Financiero	47

RESUMEN

Introducción: El aumento de tuberculosis y la multidrogo resistencia de cepas de micobacterias es un problema de los sistemas de salud, en 2009, en el Hospital Roosevelt Gordillo y cols, determinaron la TB-MDR en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente, la tasa de resistencia fue de 4.3%. **Objetivo:** Determinar los patrones de resistencia y perfiles genéticos de cepas con monoresistencia y cepas TB-MDR del Complejo *M. tuberculosis*. **Métodos:** Se utilizaron dos métodos para evaluar las cepas de *M. tuberculosis*, un método fenotípico, MGIT, y un método Genotípico, Genotype HAIN LifeScience para determinar el perfil genético de las cepas. **Resultados:** Se evaluaron 846 cepas de micobacterias de los años 2008 al 2013, encontrándose un 2.2% de TB-MDR. Las cepas evaluadas genotípicamente fueron 761, a las cuales se determinó los genes de resistencia, encontrándose monoresistencia a Isoniacida en 58 cepas, 7.6%, monoresistencia a Rifampicina en 18 cepas, 2.4% y 15 cepas MDR, 2.0%. Las mutaciones más frecuentes en monoresistencia fueron *inhA* MUT1 y *katG* MUT1 y la combinación de ambos genes 3.2%, 3.0% y 1.3%, para cepas TB-MDR la combinación *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1. Se encontró que en pacientes con cepas MDR el 3.1% son HIV+ y el 1.5% son HIV-. **Conclusiones:** El porcentaje de cepas TB-MDR fue del 2.3%, siendo los genes más comunes *rpoB* Mutación silenciosa, *inhA* MUT1 y *katG* MUT1. Se encontró mayor porcentaje de monoresistencia a Isoniacida que Rifampicina, siendo la población de pacientes HIV+ la que presenta mayores porcentajes tanto en monoresistencia a RIF e INH como cepas TB-MDR.

Palabras clave: *Tuberculosis, TB-MDR, genes resistencia*

SUMMARY

Introduction: The increase of tuberculosis and multidrug resistance in mycobacteria strains is a problem for health systems, in 2009, in Hospital Roosevelt, Gordillo and cols, determined the TB-MDR in patients diagnosed with tuberculosis microbiologically, the resistance rate was 4.3%. **Objective:** To determine the resistance patterns and genetic profiles of monoresistant strains and MDR-TB strains of *M. tuberculosis* complex. **Methods:** Two methods for evaluating *M. tuberculosis* strains were used, a phenotypic method, MGIT, and a genotypic method, Genotype HAIN LifeScience to determine the genetic profile of the strains. **Results:** 846 strains of mycobacteria of the years 2008 to 2013 were evaluated, finding 2.2% of MDR-TB. The strains genotypically evaluated were 761, of which, resistance genes were determined, finding isoniazid monoresistance in 58 strains, 7.6%, Rifampicin monoresistance in 18 strains, 2.4% and 15 MDR strains, 2.0%. The most frequent mutations for monoresistant strains were *inhA* MUT1 and *katG* MUT1 and the combination of both genes 3.2%, 3.0% and 1.3%, respectively, and the most frequent mutations for TB-MDR strains was the combination *rpoB* silent mutation + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1. There was found that in patients with MDR strains 3.1% are HIV+ and 1.5% are HIV-. **Conclusions:** The percentage of TB-MDR strains was 2.3%, and the most common genes were *rpoB* silent mutation, *inhA* MUT1 y *katG* MUT1. There was found a higher percentage of monoresistance in isoniazid than rifampicin, being the HIV+ patient population the one that presented higher percentages in both monoresistance to RIF and INH and TB-MDR strains.

Key words: *Tuberculosis, TB-MDR, resistance genes*

PARTE I

I.1 INTRODUCCIÓN

La detección de las micobacterias MDR es de trascendencia en un país que es considerado como de alta carga de tuberculosis, se hace necesario la implementación de tecnologías y métodos de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad que puedan brindar información relevante en el tratamiento y la evolución de la enfermedad de un paciente, independiente de la sintomatología del mismo y la condición de inmunocompetencia (VIH+ o VIH-). Las pruebas moleculares de caracterización genética brindan información confiable y en menor tiempo que los cultivos de micobacterias, permitiendo obtener resultados precisos sobre los genes particulares que causan la resistencia y la especie que la conforma. Esta información tanto de las pruebas realizadas, la historia clínica, los resultados, tratamientos, entre otros debe de estar contenida de manera ordenada y eficaz dentro de una base de datos para que pueda ser consultada en el momento que se requiera y que sea solicitado por el personal de salud a cargo de los pacientes.

En el Hospital Roosevelt Gordillo y cols (2009), investigaron la multidrogo resistencia en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente obteniendo una tasa de resistencia de 4.3% para TB-MDR. La resistencia a drogas de primera línea INH, RIF, SM y EMB compromete la curación de los pacientes disminuyendo sus expectativas de vida, representando un mayor gasto económico para la red hospitalaria del país. Por lo anterior es imprescindible disponer de métodos genotípicos específicos los cuales permiten la detección temprana (horas) de la resistencia lo que favorece el inicio de una terapia efectiva para el paciente, ya que los métodos fenotípicos disponibles actualmente son lentos y pueden enmascarar falsos sensibles lo que repercutirá en fallo terapéutico.

La genotipificación a nivel molecular se realizará utilizando Genotype MTBDR_{plus} para la detección de mutaciones a nivel de los marcadores de resistencia *rpoB*, *inhA* y *katG* para RIF e INH. Las cepas MDR se evaluarán para las drogas de segunda línea (fluoroquinolonas, aminoglicósidos y etambutol) utilizando Genotype MTBDR_{sl} (genes *gyrA*, *rrs* y *embB*). Esta caracterización molecular se realizará de las especies que conforman el Complejo *M. tuberculosis*, aisladas a partir de muestras pulmonares y

extrapulmonares de pacientes VIH+ y VIH-. Esto para conocer e identificar la prevalencia de los genes de resistencia circulantes y establecer los perfiles genéticos.

Por medio de esta investigación se obtendrá una base de datos con información completa para dar seguimiento a los pacientes y sus contactos, favoreciendo su expectativa de vida al poder brindarle tratamiento oportuno y contribuir a la prevención de la diseminación intrahospitalaria y comunitaria (VER ANEXO), se realizará la correlación, sensibilidad y especificidad de los métodos moleculares y convencionales, así como la socialización de la información por medio de artículos científicos respecto a los perfiles genéticos de resistencia a INH y RIF dentro de la población del Hospital Roosevelt.

I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

I.2.1 Antecedentes en Guatemala

La tuberculosis es la enfermedad causada por micobacterias pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Dicho complejo está formado por especies relacionadas filogenéticamente, siendo éstas: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii* (Mathema, Kurepina, Bifani & Kreiswirth, 2006).

La tuberculosis constituye un paradigma de la interacción de un agente exógeno y la respuesta inmunitaria del huésped. La Organización Mundial de la Salud estima 2.000 millones de infectados por *M. tuberculosis* y 8 millones de nuevos infectados cada año, venciendo la batalla en la mayoría de las ocasiones. Sin embargo, mueren casi 2 millones de personas al año por causa de esta enfermedad. A esta situación ha contribuido la pandemia por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la reducción de la financiación de los programas de control de la enfermedad, los movimientos migratorios a partir de países con gran incidencia de tuberculosis y el incremento de la incidencia de cepas multiresistentes (Pablos-Méndez et al., 1998).

Para el tratamiento de la tuberculosis se utilizan varios medicamentos, hay drogas de primera línea; todas tienen cierto grado de toxicidad pero son relativamente seguras y producen pocos efectos secundarios. También están las drogas de segunda línea pero son poco utilizadas, excepto en las áreas en las que existen grandes rangos de resistencia a drogas, en éste grupo están incluidas la ofloxacina, cicloserina, capreomicina, etionamida,

kanamicina/amikacina y tiacetazona (Gordillo & Palacios, 2006). Existen varias metodologías para realizar una susceptibilidad de micobacterias pero en la mayoría de los casos no se cuenta con los recursos económicos indispensables para cubrir la gran cantidad de muestras de los pacientes que refieren la enfermedad. Entre estas metodologías se pueden mencionar el Método de las Proporciones de Canetti (Gold estándar), Bactec MGIT, INNO-LIPA, Genotype MTBDR_{plus} y MTBDR_{sl} (Gordillo & Palacios, 2006).

I.2.2 Justificación del trabajo de investigación

Actualmente se ha dado un incremento de la resistencia del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos de primera línea a nivel mundial. En el año 2009 Gordillo R y colaboradores, investigaron la multidrogoresistencia en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente en el Hospital Roosevelt. En esta investigación se evaluaron un total de 1239 cepas del complejo *M. tuberculosis* aisladas en el período 2004-2008 encontrando una tasa de resistencia de 4.3% para TB-MDR (Gordillo, Boloix, Mejía & Palacios, 2012). (ANEXO 1)

Según datos de OMS se cataloga a Guatemala entre los países con alta carga de TB MDR, prevalencia >3%, lo que hace imprescindible el análisis inmediato de cepas circulantes y determinar los perfiles genéticos de resistencia. Es necesario establecer la relación entre las cepas circulantes (frecuencia de genes presentes) y el tratamiento del paciente ya sea este un paciente con infección por VIH o no. Así como también evaluar si en pacientes con una MDR existe una resistencia a drogas de segunda línea como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y etambutol por medio de la detección de los genes *gyrA*, *rrs* y *embB*.

La resistencia a las drogas de primera línea INH, RIF, SM y EMB hace que los pacientes sean difíciles de curar disminuyendo sus expectativas de vida, además representa un mayor gasto económico para la red hospitalaria del país. Como consecuencia se han desarrollado nuevas técnicas para la detección tanto fenotípica como genotípica de cepas multiresistentes, las cuales permiten la detección temprana (horas) de la resistencia lo que favorece la iniciación de una terapia efectiva para el paciente y evitar la diseminación de casos de TB-MDR intrahospitalaria y en la comunidad.

I.3 OBJETIVOS E HIPOTESIS

I.3.1 Objetivos

I.3.1.1 General

Establecer el perfil genético de resistencia de las especies que conforman el complejo de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del Hospital Roosevelt.

I.3.1.2 Específicos

1. Establecer y evaluar el perfil genético de resistencia de las especies que conforman el complejo *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes del Hospital Roosevelt
2. Determinar y evaluar las mutaciones más frecuentes en los genes *rpoB*, *inhA* y *katG* causantes de la resistencia a Rifampicina e Isoniacida.
3. Establecer y evaluar la prevalencia de los genes circulantes en las especies del complejo *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del Hospital Roosevelt.
4. Determinar y evaluar la existencia de las diferencias en los perfiles genéticos de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes que presentan infección por VIH.
5. Realizar la base de datos unificada con la información necesaria que permita el seguimiento del paciente.
6. Determinar la sensibilidad, especificidad y correlación entre una prueba convencional para detección de resistencia en *M. tuberculosis* y una prueba genética molecular.
7. Divulgar a las autoridades, actores sociales e instituciones en el campo de su competencia la información obtenida de la investigación.

I.4 METODOLOGIA

I.4.1 Universo De Trabajo

Cepas de Micobacterias aisladas en el área de Micobacterias del Hospital Roosevelt

I.4.2 Muestra

Se tomarán todas las cepas identificadas previamente como pertenecientes al MTBC aisladas en el área de micobacterias del Hospital Roosevelt durante los años 2008 al 2013, a las cuales se les realizará la evaluación de la especie más frecuente del MTBC por medio de la prueba molecular Genotype **MTBC**. También se determinará la susceptibilidad a drogas de primera línea por un método estándar MGIT y una prueba molecular Genotype **MTBDRplus**, en las cepas que sean TB-MDR se les realizará la prueba molecular GenoType **MTBDRsl**, para determinar la resistencia a drogas de segunda línea. Se obtendrá la información de cada paciente por medio de una boleta de recolección de datos (ANEXO 2)

I.4.3 RECURSOS

I.4.3.1 Recursos Humanos

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Investigador Principal | Dr. Carlos Rodolfo Mejía Villatoro |
| 2. Co-Investigador Principal | Licda. Ma. Remei Gordillo Mata |
| 3. Investigador Asociado | Licda. Hilda Ma. Ruiz Chavarría |
| 4. Investigador Asociado | Dra. Ana Johanna Samayoa Bran |
| 5. Asistente de investigación | Licda. Inf. Rosa Lidia Cortés Méndez |

I.4.3.2 Recursos Institucionales

Laboratorio de Micobacterias del área de Microbiología, Hospital Roosevelt

Laboratorio de Biología Molecular, Clínica de Enfermedades Infecciosas

Comité de Docencia e Investigación del Hospital Roosevelt: Aspectos éticos y aprobación de la investigación.

Dirección Ejecutiva del Hospital Roosevelt: Revisión y aprobación de informes.

I.4.3.3 Recursos Físicos

Equipo

- Campana de flujo laminar
- Computadora
- Incubadora
- Heating block
- Termociclador
- Refrigerador (+4⁰C)
- Mini Spin para tubos de 1.5 mL
- Pipetas automáticas de ajuste variable (10, 100, 200 y 1000 μ L)
- Pipetas digitales electrónicas programable (20, 100, 200 y 1000 μ L)
- Incinerador eléctrico
- Autoclave de mesa
- Sonicador
- Centrífuga refrigerada
- TwinCubator
- Congelador (-20⁰C y -80⁰C)
- Agitador vórtex
- Impresora

Materiales

- Tips con filtro (10, 100, 200 y 1000 μ L)
- Pinzas de plástico
- Guantes de látex sin talco
- Tubos de ensayo (vidrio)
- Gradillas para tubos de 4 tamaños
- Gradillas para tubos de 0.2 a 0.5 MI
- Mascarillas N95
- Descartadores de material infectocontagioso
- Tubos de 1.5 mL PCR cleaner
- Papel mayordomo
- Tubos para PCR de 0.2 mL
- Guantes de nitrilo sin talco
- Timers
- Enfriadores de sobremesa para tubos de 0.2 mL
- Gradillas para tubos de 1.5 mL
- Batas desechables
- Tubos falcon de 50 mL
- Crioviales de 1.5 mL con tapón de rosca
- Pipetas estériles de poliestireno de punta fina.

Materiales de limpieza

- Extrán
- Etanol
- Cloro
- Fenol

Útiles de oficina

- Papel bond tamaño carta
- Tinta a color
- Marcadores permanentes
- Tinta para impresora color negro
- Cuadernos de trabajo
- Lapicero en gel

Reactivos

- Set MGIT
- Kit Genotype MTBDR*plus*
- Caldo Middlebrook 7H9
- Agua grado molecular
- Kit Genotype MTBC
- Kit Genotype MTBDR*sl*
- Agua destilada
- Medio de cultivo Lowenstein Jensen

I.4.4 METODOLOGIA

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS CEPAS DEL MTBC

Selección de las cepas

Se tomarán para el estudio todas las cepas previamente identificadas como pertenecientes al MTBC aisladas en el área de Micobacterias del Hospital Roosevelt, durante los años 2008 al 2013.

Identificación de las Sub-especies pertenecientes al MTBC

A todas las cepas pertenecientes al MTBC se les realizará la prueba Genotype MTBC para identificar la sub- especie.

Extracción de ADN

Resuspender de 3 a 5 colonias de medio sólido en 300 µl de agua grado molecular. Incubar durante 20 min a 95°C en baño de agua, posteriormente sonicar los tubos por 15

min, centrifugar los tubos a 13,000g por 5 minutos, por último transferir el sobrenadante a otro tubo limpio del cual se utilizarán 5 µl para la amplificación por PCR.

Amplificación

Las regiones genómicas implicadas en la resistencia fueron amplificadas de acuerdo a recomendaciones del fabricante.

La mezcla para amplificación está constituida por 35 µl de mezcla primer-nucleótido (PNM), 5 µl 10X tampón para incubación, X µl de sol de MgCl₂, 1-2U de Taq DNA polimerasa termoestable, y µl de agua grado molecular para obtener un volumen final de 45 µl. A esto se le añaden 5 µl de la solución de ADN extraído, para obtener un volumen final de 50 µl.

La amplificación será realizada en un termociclador Amplitron I, con los siguientes parámetros de temperatura: 1 ciclo de desnaturalización de 15 min a 95°C, seguido por 10 ciclos de 30s a 95°C y 2 min a 58°C, seguido por 20 ciclos de 25s a 95°C, 40s a 53°C y 40s a 70°C, finalizado con un paso de extensión final de 8 min a 70°C.

Hibridación

Después de la amplificación, se realiza un paso de desnaturalización, posteriormente los amplicones de hebra simple marcados con biotina fueron hibridados a membranas unidas a sondas por 30 min a 45°C en agitador semiautomático. Las tiras son lavadas por 15 minutos a 45°C de acuerdo a las instrucciones del fabricante, las señales de hibridización se detectaron por adición de un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina, seguida de una reacción de sustrato de fosfatasa alcalina.

Interpretación de los resultados

Se evaluarán e interpretarán los resultados en base a un formulario de evaluación proporcionado por el fabricante.

SUSCEPTIBILIDAD POR METODOLOGÍA MGIT

A las cepas aisladas durante los años 2009 y 2010 pertenecientes al MTBC se les hará la susceptibilidad fenotípica con esta metodología.

Preparación de muestras para pruebas de AST en MGIT 960

Adicionar 1 mL de agua destilada al tubo con LJ, con crecimiento micobacteriano ≤ 14 días.

Hacer una suspensión > 1.0 del estándar de turbidez de McFarland (se puede hacer con el medio Middlebrook de un tubo MGIT) usando de 8 a 10 perlas de vidrio. Mezclar con vórtex durante 2 a 3 minutos.

Dejar sedimentar la masa bacteriana durante 20 minutos y transferir el sobrenadante en otro tubo estéril vacío y ajustar la turbidez de 0.5 del McFarland. Diluyendo 1 mL de ésta suspensión en 4 mL de solución salina estéril o agua destilada estéril. Convirtiendo ésta suspensión en un tubo basal para todos los procedimientos posteriores (**TUBO BASAL**)

Inoculación de la muestra para pruebas AST en MGIT 960

Rotular los tubos MGIT, CC y SIRE, posteriormente adicionar 0.8 mL del Suplemento BACTEC MGIT 960 SIRE a cada tubo.

Adicionar 100µl de cada antibiótico a los tubos MGIT previamente identificados, siguiendo el protocolo de trabajo del fabricante. Homogenizar en vórtex por 10s aprox.

Preparar el control de crecimiento, pipeteando 100 µl del **TUBO BASAL**, adicionarlos a un tubo conteniendo 10 mL de agua destilada o solución salina estéril para una dilución 1:100.

Homogenizar en vórtex por 10s aprox.

Adicionar 0.5 mL de la dilución 1:100 del control de crecimiento y 0.5 mL del **TUBO BASAL** a cada uno de los tubos identificados como SIRE. Homogenizar en vórtex por 10s aprox. Por último colocar los tubos en la gradilla AST, en orden de izquierda a derecha colocando en la primera posición el CC y posterior el SIRE. Cargar en el instrumento.

SUSCEPTIBILIDAD POR LA PRUEBA MOLECULAR GENOTYPE MTBDR_{plus} A DROGAS DE PRIMERA LÍNEA

A las cepas identificadas previamente como pertenecientes al MTBC, se les realizará esta prueba molecular para determinar la susceptibilidad a INH y RIF

Extracción de ADN

Resuspender de 3 a 5 colonias de medio sólido en 300 µl de agua grado molecular. Posteriormente centrifugar a 14,000 g por 15 minutos, descartar el sobrenadante y posteriormente al sedimento añadir 100 µl de agua grado molecular.

Incubar durante 30 min a 95°C en baño de agua, posteriormente sonicar los tubos por 15 min, centrifugar los tubos a 13,000g por 5 minutos, por último transferir el sobrenadante a otro tubo limpio del cual se utilizarán 5 µl para la amplificación por PCR.

Amplificación

Las regiones genómicas implicadas en la resistencia fueron amplificadas de acuerdo a recomendaciones del fabricante.

La mezcla para amplificación está constituida por 15 µl de mezcla primer-nucleótido (PNM), provisto en el kit, 5 µl de tampón con 2 mM de MgCl₂, 2U de Taq DNA polimerasa termoestable y 5 µl de la solución de ADN extraído, para obtener un volumen final de 50 µl.

La amplificación será realizada en un termociclador Amplitron I, con los siguientes parámetros de temperatura: 1 ciclo de desnaturalización de 15 min a 95°C, seguido por 10 ciclos de 30s a 95°C y 2 min a 58°C, seguido por 20 ciclos de 25s a 95 °C, 40s a 53 °C y 40s a 70 °C, finalizado con un paso de extensión final de 8 min a 70 °C.

Hibridación

Después de la amplificación, se realiza un paso de desnaturalización, posteriormente los amplicones de hebra simple marcados con biotina fueron hibridados a membranas unidas a sondas por 30 min a 45 °C en agitador semiautomático. Las tiras son lavadas por 15 minutos a 45 °C de acuerdo a las instrucciones del fabricante, las señales de hibridización se detectaron por adición de un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina, seguida de una reacción de substrato de fosfatasa alcalina.

Interpretación de los resultados

Se evaluarán e interpretarán los resultados en base a un formulario de evaluación proporcionado por el fabricante.

SUSCEPTIBILIDAD POR LA PRUEBA MOLECULAR GENOTYPE MTBDR_{sl} A DROGAS DE SEGUNDA LÍNEA

A todas las cepas del MTBC que muestren resistencia a las drogas de primera línea se les realizará la prueba de susceptibilidad para drogas de segunda línea a nivel molecular.

El protocolo de extracción, amplificación, hibridación se hará siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Los resultados se evaluarán e interpretarán los resultados en base a un formulario de evaluación proporcionado por el fabricante.

I.4.5 Diseño Del Estudio

Se evaluarán las cepas previamente aisladas e identificadas como pertenecientes al MTBC durante los años 2008 al 2013.

Se realizará una comparación de métodos en el cual se evaluarán los métodos moleculares Genotype MTBC, MTBDR_{plus} y MTBDR_{sl} contra el método fenotípico MGIT.

	Método de Referencia (+)	Método de Referencia (-)
Método en estudio (+)	Verdaderos Positivos	Falsos Positivos
Método en estudio (-)	Falsos Negativos	Verdaderos Negativos
	Total de positivos	Total de Negativos

Para la interpretación de los resultados, se considera como positivo a una cepa resistente y negativo a una cepa susceptible (Fuente: Lemus D. Métodos rápidos para la detección de resistencia en M. tuberculosis (Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”) Habana, Cuba. 2007)

Análisis estadístico

Se utilizará una tabla dos por dos con los resultados obtenidos y se procederá a calcular la sensibilidad, la especificidad y el índice Kappa de cada metodología molecular a evaluar

PARTE II

II.1 MARCO TEÓRICO

Durante las primeras décadas del siglo XX, se dio una disminución progresiva de la incidencia de la tuberculosis, y alcanzó su menor nivel a comienzos de la década de 1980. Muchos microbiólogos pensaron que la tuberculosis estaba por ser vencida, dado que la enfermedad alcanzó la línea basal de cero en muchas partes del mundo a fines de la década de los 70's. Pero sucedió todo lo contrario.

En la última década, la tuberculosis (TB) ha resurgido como una de las mayores causas de muerte, en el año 2013 el informe anual de OPS/WHO reportó que alrededor de 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis de las cuales 1.5 millones murieron por dicha causa, y entre ellas 360,000 presentaron coinfección con VIH, siendo la principal causa de muerte para este tipo de pacientes. (Informe anual OPS/WHO 2013)

Aunado a esto se encuentra el hecho de la tuberculosis multirresistente, MDR, y la tuberculosis extremadamente resistente XDR, los tratamientos convencionales se encuentran limitados y la disponibilidad de los medicamentos para tratarlas es escaso. El apareamiento de cepas MDR y XDR incrementa las tasas de mortalidad y representa un serio problema para el control de esta enfermedad, por ello la realización de una susceptibilidad antibiótica con un perfil delimitado de antibióticos es de gran ayuda para poder evitar y/o disminuir la multirresistencia y poder brindar tratamientos efectivos.

Existen factores predisponentes que han contribuido al resurgimiento de la enfermedad, entre los que se encuentran:

- Inmigración de personas de zonas de alta endemicidad.
- Condiciones socioeconómicas bajas en ciudades con alta población.
- Aumento de personas infectadas con VIH/SIDA.

Generalidades de la Tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa aguda o crónica que en nuestro medio es la infección humana más importante causada por micobacterias puede afectar a cualquier tejido del organismo pero generalmente se localiza en los pulmones por la inhalación del agente causal que por lo general es *Mycobacterium tuberculosis* (muy rara vez *M. bovis* o

M. africanum). El nombre de Tb deriva de la formación de unas estructuras celulares características denominadas tuberculomas, donde los bacilos quedan encerrados. Este microorganismo, tiene forma bacilar, es aerobio estricto, de crecimiento lento, inmóvil, no poseen cápsula ni producen esporas, se tiñe con dificultad por su contenido alto de grasas en la pared celular por lo que el colorante a utilizar debe poseer fenol y/o realizarse con calor por lo que una vez teñidas con fuchsina carbónica (fenolada) no se decoloran al agregar el alcohol acidificado y de allí el término “Bacilos alcohol ácido resistentes” (BAAR). Es resistente al frío, la congelación y desecación. Es muy sensible al calor, la luz solar y ultravioleta. Se divide lentamente, por lo que su crecimiento es lento.

La TB se transmite de un enfermo con tuberculosis pulmonar a otras personas por medio de pequeñas gotitas que el paciente expulsa, al toser o estornudar. El riesgo a infectarse depende de la concentración de gotitas en el aire y del período de tiempo que se respire; se reduce mediante la renovación del aire, por ventilación del exterior y por la exposición a la luz solar o rayos ultravioleta. Cada enfermo puede contagiar a 10 a 15 personas.

La TB puede ser tanto pulmonar, que es la más común y ocurre en más del 80% de los casos, como extrapulmonar. Es importante mencionar que aproximadamente un 90% de las personas que se infectan nunca desarrollan la enfermedad ya que el bacilo permanece DORMIDO dentro del organismo del huésped y su presencia (infección) puede determinarse por una reacción positiva a la prueba tuberculínica ó PPD (derivado proteico purificado). Además es necesario poder determinar la presencia de la enfermedad para poder minimizar la cantidad de pacientes con cepas resistentes a los medicamentos antituberculosos y poder disminuir con ello la cantidad de enfermos bacilíferos crónicos en las comunidades.

Situación de la tuberculosis a nivel mundial

La TB sigue siendo un importante problema sanitario a escala mundial. La cifra estimada de nuevos casos en 2012 fue de 8.6 millones y 1.3 millones murieron por esta causa (entre ellos 320,000 seropositivos para el VIH). (WHO. 2013, informe mundial sobre la tuberculosis 2013). A esta situación ha contribuido la pandemia por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la reducción de la financiación de los programas de

control de la enfermedad, los movimientos migratorios a partir de países con gran incidencia de tuberculosis y el incremento de la incidencia de cepas multiresistentes (Pablos-Méndez et al., 1998).

La OMS (Organización Mundial de la Salud), estima que en Guatemala la prevalencia de VIH entre pacientes incidentes de TB es del 13%. (Flores, Roberto., *et.al.* 2007-2008)

Transmisión de la tuberculosis

La principal vía de transmisión es respiratoria, los individuos con tuberculosis pulmonar expulsan al aire partículas que contienen bacilos y que pueden permanecer suspendidas en el aire durante horas; el riesgo de infección está relacionado con la duración de la exposición, la concentración de bacilos viables y la susceptibilidad del hospedero (Rodas, Jorge., *et.al.* “Vigilancia de tuberculosis en el Hospital Roosevelt, Guatemala 2007-2012).

Tuberculosis Pulmonar Y Tuberculosis Extrapulmonar

El diagnóstico de la TB extrapulmonar depende de la probabilidad de encontrar los bacilos en los sitios de infección, los cuales se encuentran en cantidades muy pequeñas, excepto si hay caseificación o formación de cavidades, las biopsias del tejido pueden rendir resultados positivos en comparación a los fluidos en donde el número de los bacilos se ve disminuido por la dilución. El diagnóstico de la TB extrapulmonar es difícil a menudo por su localización en sitios del organismo de acceso complicado, además el carácter serio de esta forma de tuberculosis se debe frecuentemente a su diagnóstico tardío.

Previo a la pandemia del VIH, aproximadamente el 15% de los nuevos casos de TB eran extrapulmonares. Estos casos son de difícil diagnóstico, dado que son menos comunes a los médicos y porque los sitios de infección son menos accesibles y visibles. La TB extrapulmonar mas frecuente son la linfática, pleural, genitourinaria, miliar, ósea, meníngea y peritoneal.

Los pacientes con TB pulmonar activa son altamente infecciosos para otros pacientes y para el personal de cuidados de salud, este tipo de transmisión se asocia a desarrollo rápido

de la enfermedad en unas cuatro semanas, con mal pronóstico. De igual manera este tipo de transmisión contribuye en los casos de alta resistencia.

El aumento de casos de Tb extrapulmonar, crea la necesidad de un mejor diagnóstico y nuevas técnicas para el aislamiento y susceptibilidad micobacteriana, estableciendo como punto crítico el menor tiempo posible para el aislamiento y la información sobre la droga resistencia de las micobacterias.

Tratamiento de la tuberculosis

Para el tratamiento de la tuberculosis se utilizan varios medicamentos hay drogas de primera línea (Isoniacida, Rifampicina, etambutol y Estreptomina); todas tienen cierto grado de toxicidad pero son relativamente seguras y producen pocos efectos secundarios. También están las drogas de segunda línea pero son poco utilizadas, excepto en las áreas en las que existen grandes rangos de resistencia a drogas, en éste grupo están incluidas la ofloxacina, cicloserina, capreomicina, etionamida, kanamicina/amikacina y tiacetazona (Gordillo & Palacios, 2006).

El tratamiento está condicionado al comportamiento en el crecimiento del bacilo, a partir de un bacilo se origina una colonia, luego se multiplica dependiendo de las características de cada bacilo el crecimiento puede ser inerte ó con metabolismo inactivo, lento ó intermedio; cuando se alcanza cierto número de bacilos se empiezan a producir mutaciones naturales y espontáneas, ésta mutación da lugar a la aparición de resistencias de tipo cromosómicas y por ello irreversibles las cuáles se encuentran en relación con el número de bacilos presentes y el fármaco utilizado, es por ello que el tratamiento debe ser combinado ya que no todos los elementos de las colonias poseen el mismo comportamiento frente a las drogas.

Drogas de primera línea.

INH, RIF, SM, EMB y Pirazinamida (PZA) son los cinco medicamentos clasificados como drogas de primera línea debido a que poseen baja toxicidad y por la actividad que poseen, la INH es la droga de mayor utilidad y de mayor uso.

Entre las dosis utilizadas de las drogas para el tratamiento del Tb se pueden mencionar:

INH 300mg diarios Posee baja toxicidad para el hígado.

RIF 600mg diarios Posee baja toxicidad.

SM		De uso limitado debido a su forma de administración (vía intramuscular), causa citotoxicidad y disfunción renal.
EMB	15mg/kg/día	Posee baja toxicidad.
PZA	25mg/kg/día	Es hepatotóxica y produce hiperuricemia.

Drogas de segunda línea.

Este grupo de drogas es poco utilizado, excepto en áreas en las que existen rangos grandes de resistencia a las drogas de primera línea, éste grupo incluye ofloxacina, cicloserina, capreomicina, etionamida, tiacetazona, kanamicina/amikacina.

Esquemas de tratamiento.

Si los esquemas de tratamiento se siguen de forma adecuada y con supervisión estricta permiten que las fuentes de infección se detengan. El esquema se divide en dos fases:

- Fase intensiva: durante la cuál se toma el tratamiento todos los días.
- Fase de continuación: durante la cuál los medicamentos se toman dos ó tres veces por semana.

Resistencia de la tuberculosis

La situación de la tuberculosis a nivel mundial se ha agravado con el aparecimiento 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 ello la realización de una susceptibilidad antibiótica con un perfil delimitado de antibióticos es de gran ayuda para evitar y/o disminuir la multiresistencia y poder brindar tratamientos efectivos en el menor tiempo posible.

Las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos antifímicos, por el hecho de poseer una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos por ello, el tratamiento de la tuberculosis se realiza con antifímicos específicos (con actividad antituberculosa) (Bass et al., 1994).

La resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* puede ser primaria o secundaria también llamada adquirida. La primaria se define como aquella en la que se presentan cepas aisladas en pacientes que nunca antes han recibido tratamiento antituberculoso. La secundaria es la

consecutiva a una quimioterapia incorrecta provocada por la utilización de un esquema terapéutico inicial erróneo, una indicación inadecuada de tratamiento de infección tuberculosa (quimioprofilaxis) al no descartar enfermedad activa o incumplimiento del tratamiento por parte del paciente (Asencios et al., 2012)

La tuberculosis tiene un tratamiento eficaz que asegura, en los casos no complicados, una tasa de curación superior al 95%. El éxito de este tratamiento se basa en la asociación de fármacos de primera línea y en su larga duración. El tratamiento de la tuberculosis resistente a los antibióticos es más larga, más tóxica y más cara que una terapia de tuberculosis susceptible (Bass et al., 1994).

Los test de susceptibilidad desempeñan un papel muy importante en epidemiología, debido a que detectan la aparición de resistencia provocada por fallas en la administración o en la supervisión de un tratamiento adecuado. También es importante porque los resultados pueden ser utilizados como una guía para iniciar la terapia, para confirmar la resistencia antibiótica en un paciente que demuestra respuesta insatisfactoria al tratamiento y para la evaluar la tendencia de resistencia primaria y adquirida dentro de una comunidad.

En Guatemala las pruebas de susceptibilidad a fármacos no se llevan a cabo rutinariamente, lo cual hace surgir la posibilidad de esquemas inadecuados de tratamiento para pacientes con cepas multiresistentes.

Existen varias metodologías para realizar una susceptibilidad de micobacterias pero en la mayoría de los casos no se cuenta con los recursos económicos indispensables para cubrir la gran cantidad de muestras de los pacientes que refieren la enfermedad. Entre estas metodologías se pueden mencionar el Método de las Proporciones de Canetti (Gold estándar), Bactec MGIT 960, INNO-LIPA, Genotype MTBDR*plus* y MTBDR*sl* (Gordillo & Palacios, 2006).

Características de las Micobacterias

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, transmisible que es causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* o también conocido como bacilo de Koch (por Roberto Koch, el médico que lo identificó por primera vez en el año de

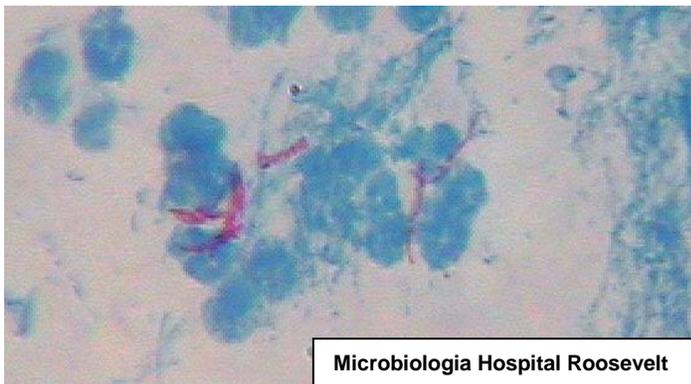
1882) y en menor grado por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum* (OMS. Tuberculosis, 2000).

Las micobacterias forman más de una clase de colonias. Estas pueden ser de color hueso crema y rugosas, elevadas, convexas, de bordes irregulares, con bacilos densos y compactos o pueden ser lisas y transparentes, con bacilos sin agrupaciones discernibles (*M. intracellulare*), o de aspereza intermedia (*M. kansasii*). Las colonias de algunas especies (*M. xenopi* y algunas de crecimiento rápido) forman extensiones filamentosas frágiles ramificadas, otras extensiones pueden penetrar en el medio y hasta proyectarse en el aire.



En dependencia de la producción de pigmento se dividen en: fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmento), escotocromógenas (forman pigmento en presencia o ausencia de luz) y no cromógenas (no producen pigmentos) (Brooks et.al. 2002).

También presentan la característica alcohol ácido resistente (BAAR): lo que significa que tiene la capacidad de incorporar ciertos colorantes y retenerlos aún después de la acción del ácido en solución alcohólica o acuosa, frecuentemente incoloro, aeróbico estricto. Es muy resistente al frío, la congelación y la desecación y por el contrario



muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta. Su multiplicación es muy lenta (se divide cada 16 a 20 horas) y ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. El reservorio

natural del *M. tuberculosis* es el hombre, tanto el asintomático como el enfermo (Brock, 2004).

Puede causar enfermedad en cualquier órgano del cuerpo, siendo la más frecuente la infección en los pulmones, desde donde se disemina a otros órganos por vía sanguínea o linfática. Los síntomas aparecen cuando las lesiones son ya muy extensas, de forma que el diagnóstico se establece cuando la enfermedad está muy avanzada. Los síntomas característicos son: fiebre, sudoración, adelgazamiento, expectoración purulenta y tos. Las micobacterias provocan lesiones tisulares (tubérculos), generando una respuesta inmune en donde participan los linfocitos CD4+ y los linfocitos T citotóxicos, por su parte las células NK (natural killer) se encargan de eliminar macrófagos y linfocitos infectados (Brock, 2004).

Taxonomía de las Micobacterias

El género *Mycobacterium* incluye más de cien especies que se dividen en tres grupos:

1. **Complejo *Mycobacterium tuberculosis***. Dicho complejo está formado por especies relacionadas filogenéticamente, siendo éstas: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii* (Mathema, Kurepina, Bifani & Kreiswirth, 2006).
2. **Complejo Lepra** que incluye *M. leprae* y *M. leprae-murinum*, causantes de lepra en el hombre y en el ratón respectivamente; y
3. un grupo de especies denominadas micobacterias “**no tuberculosas**”, donde se incluyen el resto de las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores, las que pueden ser patógenas verdaderas, patógenas oportunistas o saprófitas.

Además de su capacidad de infectar al hombre, estos microorganismos son también una de las grandes causas de infección de diversos animales domésticos y salvajes. La fuente natural de estos microorganismos es el suelo, agua, los alimentos y algunos animales (Ruiz, Gordillo & Mata, 2010)

Propósito e Importancia del Diagnóstico en el Laboratorio

La finalidad primordial es demostrar por medio de coloraciones, cultivos especiales y pruebas de identificación la presencia de bacterias que pertenecen al género *Mycobacterium*, especialmente *Mycobacterium tuberculosis*. Aproximadamente doce

especies de éste género se asocian a infección humana, pero en nuestro medio *Mycobacterium tuberculosis* es la especie de mayor importancia.

La detección de micobacterias es una gran responsabilidad para el laboratorio de microbiología, ya que un resultado positivo de frote o cultivo implica serias consecuencias para el paciente y afecta su vida con un tratamiento específico por varios meses, o incluso años; por lo que un resultado positivo debe informarse de inmediato al médico responsable. Se debe tener todo el cuidado de no confundir las muestras, especialmente cuando hay en grandes cantidades; se recomienda trabajarlas de cinco en cinco. Esto evitara que se den resultados falsos ya que los mismos traerían serias consecuencias para el paciente.

Cultivo De Micobacterias

Los procedimientos para obtener el crecimiento *in vitro* de las micobacterias son especializados; deben seguirse estrictamente las instrucciones para tener éxito en su recuperación. Por lo general, las muestras para cultivo contienen muchas bacterias de la microbiota, especialmente el esputo que siempre se contamina con microbiota de la boca. Además el esputo es una muestra difícil de manipular por su mucosidad, tenacidad y adherencia. Por estas razones para su cultivo, el esputo debe digerirse para hacerlo líquido y decontaminarse; es decir darle algún tratamiento químico para destruir las bacterias contaminantes que crecen rápido, pero sin destruir a las micobacterias.

El cultivo se realiza en Lowenstein Jensen que es un medio muy nutritivo (Huevos enteros frescos, fécula de papa, glicerol, sales de fosfato y magnesio, L-asparagina, glicerol y verde de malaquita) ó en Middlebrook 7H10 (sales de fosfato y magnesio, vitaminas, cofactores, ácido oléico, albúmina, catalasa, glicerol y dextrosa) cuando es necesario enriquecer las muestras, recuperarlas o para conservación de cepas se utiliza el segundo medio de cultivo que se ha mencionado.



Muestras

Las muestras para realizarles cultivo de micobacterias están clasificadas dentro de dos categorías:

- **De origen pulmonar** esputo, liquido y biopsia pleural, hisopados laríngeos, cepillados y lavados bronquiales.
- **De origen extrapulmonar** orina, heces, piel, sangre, médula ósea, tejidos blandos, aspirados suprapúbicos de vejiga, biopsias, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pericárdico, líquido peritoneal, secreciones varias, fluidos y muestras tisulares en general).

Las muestras normalmente contaminadas ya sea por microbiota normal que es arrastrada al obtenerla ó por su propia naturaleza requieren el paso de digestión-decontaminación, por el contrario las muestras normalmente no contaminadas no lo requieren pero en la mayoría de los casos pueden requerir de concentración.

Tabla No. 1 Tipos de muestras.

Muestras contaminadas	Muestras normalmente no contaminadas
Espuito	Sangre
Piel o tejido blando	Médula ósea
Hisopados laríngeos	Líquidos corporales (LCR, pleural, peritoneal, pericárdico)
Lavados bronquiales y gástricos	Muestras de tejido y biopsias
Orina	Hueso
Heces	
Secreciones	

Métodos para decontaminación de muestras.

Las micobacterias se recuperan óptimamente de muestras clínicas cuando se utilizan métodos para liberarlas de células y fluidos corporales (digestión) y para remover o reducir los organismos competidores (decontaminación). Ningún método es ideal para todas las

muestras clínicas en todas las circunstancias. Algunos métodos utilizan un solo reactivo tanto para digerir como para decontaminar, mientras que otros utilizan reactivos separados para éstas dos funciones. Cualquiera que sea el método elegido, se debe estar prevenido de las limitaciones inherentes al método por lo que deberá seguir el procedimiento de digestión-decontaminación que maximice la recuperación de micobacterias a partir de muestras no estériles.

Es de suma importancia determinar la preparación de la muestra según sea su origen previamente al procedimiento de decontaminación. Tabla No.2

Tabla No. 2 Preparación de Muestras Previo al Procedimiento de Decontaminación

Tipo De Muestra	Preparación
Hisopo	<ul style="list-style-type: none"> • Exprimirlo en 2-5ml caldo 7H9 Middlebrook ó solución salina estéril • Agitar en vortex para obtener una muestra homogénea por 5 min. • Decontaminar (Ver procedimiento)
Orina	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugar la mayor cantidad posible de la muestra por 15min a 3000rpm • Tomar 1-2ml (20-40g) del sedimento y colocar la muestra en un tubo con tapón de rosca • Decontaminar
Heces	<ul style="list-style-type: none"> • Suspender 1gr aproximadamente en 2-5ml de caldo 7H9 Middlebrook ó solución salina estéril • Agitar en vortex para obtener una muestra homogénea por por 5min • Decontaminar
Biopsia pequeña	<ul style="list-style-type: none"> • Suspender en 2-5ml de caldo 7H9 Middlebrook, solución salina o agua destilada estéril (con perlas de vidrio) • Agitar por 5min aproximadamente en vortex para obtener una muestra homogénea • NO decontaminar. • Sembrar directamente en Lowenstein Jensen colocando una parte de biopsia y dos gotas de la solución
Biopsia grande	<ul style="list-style-type: none"> • Transferir la muestra a una caja de Petrí • Agregarle 5gotas de caldo 7H9 Middlebrook, solución salina o agua destilada estéril • Triturarla con un bisturí • Suspender 1gr aproximadamente en 2-5ml de caldo 7H9 Middlebrook (con perlas de vidrio)

	<ul style="list-style-type: none"> • Agitar por 5min aproximadamente en vortex para obtener una muestra homogénea • NO decontaminar. • Sembrar directamente en Lowenstein Jensen colocando una parte de biopsia y dos gotas de la solución
Líquidos corporales	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugar la mayor cantidad de líquido posible por 15min a 3000rpm • Descartar el sobrenadante con cuidado • Del sedimento tomar 2-3 gotas con una pipeta de vidrio y sembrar en Lowenstein Jensen colocando dos gotas de la solución • NO decontaminar

FUENTE: Manual de Micobacterias, Sección de Microbiología, Hospital Roosevelt

Método de Decontaminación

Método de N-Acetil-L-Cisteína-Hidróxido de Sodio (NALC-NaOH)

Principio:

La N-acetil-L-cisteína (NALC) es un agente mucolítico que a concentraciones de 0.5 a 2.0% puede digerir rápidamente aún el esputo más tenaz en sólo 2 minutos. La decontaminación se lleva a cabo por medio de una solución preparada con hidróxido de sodio y citrato de sodio.



Microbiología Hospital Roosevelt



Microbiología Hospital Roosevelt

Ventajas:

Es un método fácil de implementar. Permite utilizar un agente mucolítico que proporciona resultados muy buenos con concentraciones reducidas de decontaminante ya que aumenta la recuperación de micobacterias en cultivo. La cantidad utilizada de digestor es mínima comparada con la cantidad de decontaminante.

Desventajas:

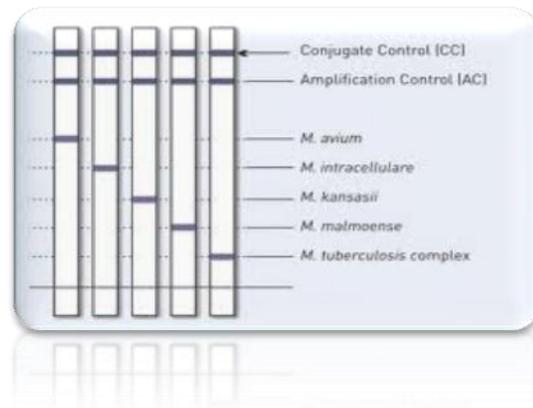
El digestor (NALC) posee un alto costo, debe estar en condiciones de refrigeración y en un recipiente de color ámbar. También tiende a deteriorarse en presencia de oxígeno. La solución de trabajo digestante-decontaminante posee una vida corta que no es mayor de 2 horas.

Detección molecular del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Algunos de los métodos moleculares para la detección de TB se basan en la amplificación de secuencias repetidas de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés) obteniendo un resultado en 24 a 48 horas. La PCR es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacterianos en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis en muestras con resultados negativos a la tinción de Ziehl-Neelsen o en el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas de pacientes con cuadros atípicos asociados a infección por VIH (Castañeda, Sánchez & Morán-Moguel, 2003).

Entre los métodos recomendados por la OMS para la PSD, se encuentran los métodos moleculares de hibridación inversa, los cuales son métodos genotípicos que se usan para detectar las mutaciones más comunes del ADN de *M. tuberculosis* que confieren resistencia a los medicamentos antituberculosos. Las pruebas de hibridación inversa tienen la gran ventaja de que los resultados están listos en un plazo de 24 a 48 horas, lo cual constituye un adelanto revolucionario en la capacidad para confirmar o descartar rápidamente la TB-MDR. Estas pruebas son relativamente sencillas y requieren solo pericia básica en las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los datos de revisiones sistemáticas y metanálisis para evaluar el desempeño de estas pruebas en comparación con los métodos convencionales de la PSD han mostrado que las pruebas de hibridación inversa son altamente sensibles y específicas para la detección de



resistencia a la rifampicina, solo o en combinación con isoniacida en aislamientos de *M. tuberculosis* (Organización Panamericana de la Salud, 2009).

Método Molecular Genotype MTBC

Método basado en la tecnología DNA-STRIP, la cual permite en base a los polimorfismos genéticos entre otras cosas, de la girasa B la diferenciación genética de las siguientes especies/cepas pertenecientes al grupo *M. tuberculosis complex*: *M. tuberculosis*/*M. canetti*, *M. africanum*, *M. bovis BCG*, *M. bovis spp bovis*, *M. bovis spp chapera* y *M. microti*.

Mecanismos moleculares de resistencia

Los mecanismos moleculares de resistencia a fármacos son: inactivación del fármaco, dificultad para acceder al blanco y alteración del blanco por mutaciones. De estos tres solamente el tercero se ha descrito como mecanismo de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. Esta resistencia es el resultado de mutaciones genéticas espontáneas que ocurren con una frecuencia aproximada de 10^{-5} a 10^{-8} .

La isoniacida es un potente fármaco antituberculoso y bactericida que se utiliza contra la TB desde 1952, actúa específicamente contra bacterias que se encuentran en fase de replicación activa. El gen *KatG* codifica la enzima catalasa-peroxidasa. La presencia de mutaciones o deleciones en este gen se ha relacionado con el 60% de las cepas *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida. El *KatG* tiene un tamaño de 1.771 pares de bases (pb); no obstante del 30-65% de las mutaciones se localizan en el codón 315 Ser, el cual cambia a Thr, Asn o Arg. La segunda causa de resistencia a Isoniacida se explica por mutaciones que afectan al gen *inhA* y con mayor frecuencia a su regulador, el cual codifica para la proteína *inhA*, responsable de la producción de ácidos grasos (Cuevas-Córdoba & Zenteno-Cuevas, 2010).

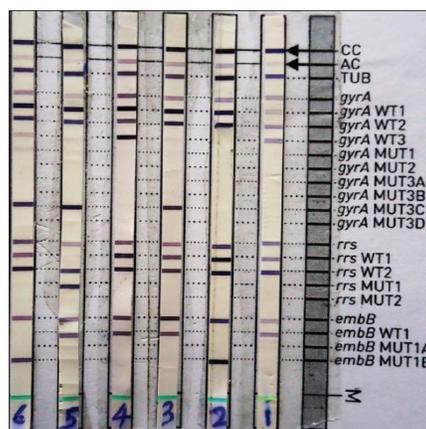
Las mutaciones en los genes *KatG* e *inhA* están asociadas al 70-80% de los aislados resistentes a isoniacida pero alrededor del 15-25% de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a éste fármaco poseen el genotipo silvestre tanto en el gen *KatG* como *inhA*, por lo cual se piensa debe existir otro mecanismo de resistencia (Cuevas-Córdoba & Zenteno-Cuevas, 2010).

La rifampicina es otro fármaco importante que debido a su fuerte actividad bactericida ha sido empleado desde 1970, desafortunadamente, su mala administración ha generado un incremento considerable en cepas resistentes.

Respecto a su mecanismo de acción, la rifampicina se une a la ARN polimerasa de la micobacteria e interfiere durante el proceso de replicación y síntesis de ácido nucleico. Se ha demostrado que mutaciones en el gen *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad β de la ARN polimerasa, disminuyendo la afinidad por rifampicina y otorgando resistencia al fármaco. Pese a que el gen *rpoB* tiene un tamaño de 3.534pb, el 96 o 97% de las mutaciones que causan resistencia a rifampicina están localizadas en una región de 81pb entre los codones 507-533 y consisten por lo general en mutaciones puntuales no sinónimas (Cuevas-Córdoba & Zenteno-Cuevas, 2010).

El diagnóstico de resistencia a rifampicina es especialmente importante debido a su fuerte asociación con la resistencia a isoniacida, considerándose como un marcador importante de TB-MDR.

Actualmente se ha identificado un gen en la resistencia a etambutol (*embB*), uno en la resistencia a fluoroquinolonas (*gyrA*), uno en la resistencia a pirazinamida (*pncA*); dos genes en la resistencia a estreptomycin (*rpsL*, *rrs*) y un gen en la resistencia a rifampicina (*rpoB*) (Castañeda, Sánchez & Morán-Moguel, 2003).



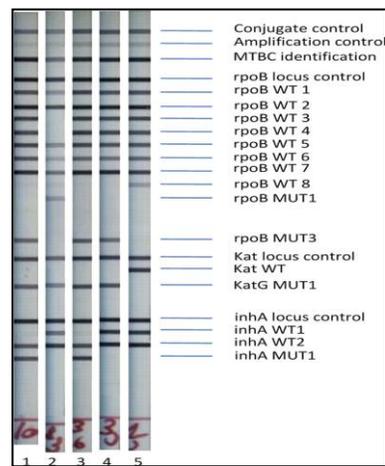
Microbiología Hospital Roosevelt

Métodos moleculares para la detección de resistencias

Prueba Molecular Genotype MTBDRplus

Ensayo está basado en la hibridación de ADN del MTBC con múltiples sondas específicas marcadas con fluorocromos adheridas a una membrana, permitiendo el análisis

de miles de genes en un solo ensayo, identificando una variedad de mutaciones en el fragmento de 81pb del gen *rpoB*, así como la mutación del codón 315 del gen *KatG* y mutaciones en la región promotora del gen *inhA*. La presencia de mutaciones es indicada por la falta de hibridización en las sondas MUT, que se evidencia por ausencia de marca, lo cual indica una resistencia a rifampicina e isoniacida a partir de muestras clínicas o cultivos crecidos.



Microbiología Hospital Roosevelt

Prueba Molecular Genotype MTBDRsI

Ensayo que permite la identificación genética del MTBC y su resistencia a fluoroquinolonas, aminoglicósidos/péptidos cíclicos y etambutol a partir del cultivo o muestras pulmonares con baciloscopía positiva. La identificación de la resistencia a fluoroquinolonas está posibilitada mediante la detección de las mutaciones más significativas del gen *gyrA* (que codifica la subunidad A de la ADN girasa). Para la detección de las resistencias a aminoglicósidos/péptidos cíclicos se examina el gen 16 rRNA (*rrs*) y para la detección de la resistencia a etambutol se examina el gen *embB* (el cual junto al gen *embA* y el *embC* que codifica la arabinosil transferasa) (HAIN. Octubre-2010)

Las ventajas de estas pruebas es que permite brindar un tratamiento adecuado y oportuno, lo que reduce la transmisión y propagación de TB-MDR/XDR. También que se obtienen en 48 horas en comparación con los métodos convencionales que demoran de 1 a 2 meses (Asencios *et al.*, 2012).

A fin de validar el funcionamiento correcto de estos ensayos y la funcionalidad de los reactivos, cada tira incluye 5 zonas de control:

1. Control de conjugado (CC) comprueba la unión del conjugado a la tira y una reacción cromogénica correcta
2. Control de amplificación (AC) verifica la amplificación correcta de la reacción.

3. Control universal (UC) que verifica la presencia de amplicones de bacterias Gram-Positivo con alto contenido genómico de guanina-citocina (G+C)
4. Control *M. tuberculosis* complex (TUB) esta zona hibrida con amplicones generados de todos los miembros conocidos de *M. tuberculosis complex*.
5. Tres zonas de control (*rpoB*, *KatG*, *inhA*) para comprobar la sensibilidad óptima de la reacción de cada loci testeado para el Genotype MTBDR*plus* y para el Genotype MTBDR*sl* se cuentan con tres zonas de control (*gyrA*, *rrs*, *embB*) para comprobar la sensibilidad óptima de la reacción de cada loci testeado.

PARTE III

III. RESULTADOS

III.1 Discusión de Resultados

De un total de 1338 cepas almacenadas de los años 2008-2013 se logró la recuperación de 846 cepas a las cuales se les realizó perfiles de resistencia con un método molecular y un método fenotípico, se recopiló la información clínica del paciente para poder relacionarla con los hallazgos referentes a genes de resistencia. La mayoría de los pacientes son adultos, 94%, el 66% de la población son del género masculino. No hay diferencias significativas entre el status VIH de los pacientes, el 45% son VIH- y el 44% son VIH-. Mas del 90% en los cuales se aisló *M. tuberculosis* son pacientes nuevos, y solamente un pequeño porcentaje son pacientes que presentaron un fallo o abandono en los tratamientos. Tabla No. 1

Tabla No. 1 Resumen de Pacientes evaluados con tuberculosis diagnosticada Microbiológicamente.

	No. Pacientes	Resistencia		
		INH	RIF	MDR
Edad				
≤ 12	80	4	0	1
≥ 13	1258	58	18	18
Genero				
Masculino	887	41	13	13
Femenino	448	21	5	6
VIH status				
Positivo	607	29	12	11
Negativo	584	27	5	8
ND	147	6	1	0
Historia TB				
Nuevo	1330	57	16	18
Abandono/Fallo	1	0	1	0
ND	7	5	1	1
		62	18	19

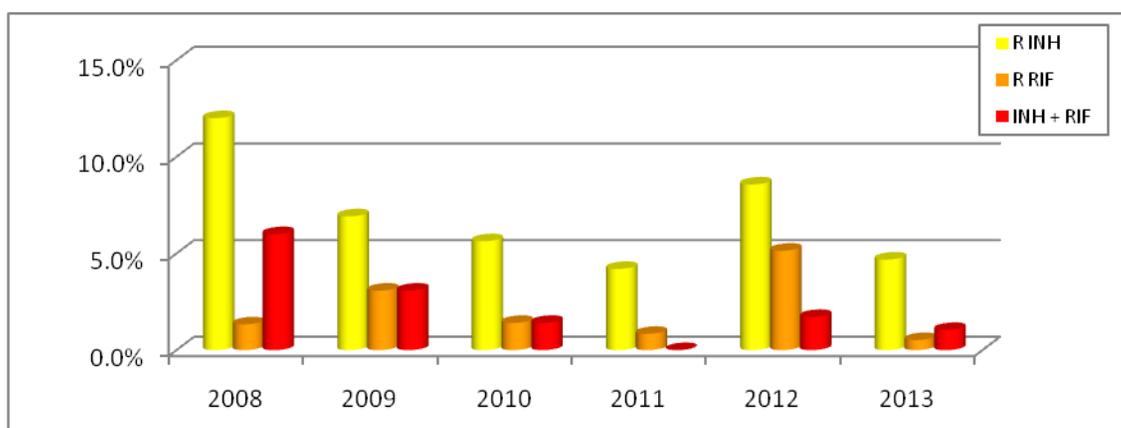
FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

Se estableció el perfil de resistencia de un total de 846 cepas, 761 por el método Genotype MTBDR*plus* y el resto por la metodología de MGIT. La resistencia encontrada, independiente del método de evaluación, fue de 11.6% de los años 2008-2013. Se encontró 62 cepas, 7.2%, con monoresistencia a Isoniacida (INH), 18 cepas, 2.2%, con monoresistencia a Rifampicina (RIF) y 19 cepas con resistencia a ambos antifímicos lo que las califica como cepas MDR y corresponde a un porcentaje del 2.3%.

Tabla No. 2 y Gráfico No. 1 Perfil de resistencia de las cepas MTBC aisladas durante el período 2008 – 2013

	TOTAL	REALIZADA	MONORRESISTENCIA				MDR		TOTAL CEPAS R	% CEPAS R
			R INH	%	R RIF	%	INH+ RIF	%		
2008	329	150	18	12.0%	2	1.3%	9	6.0%	29	19.3%
2009	216	137	11	8.0%	4	2.9%	4	2.9%	19	13.1%
2010	210	71	4	5.6%	1	1.4%	1	1.4%	6	8.5%
2011	158	119	5	4.2%	1	0.8%	0	0.0%	6	5.0%
2012	220	177	15	8.6%	9	5.1%	3	1.7%	27	15.4%
2013	204	192	9	4.7%	1	0.5%	2	1.0%	12	6.3%
TOTAL	1338	846	62	7.2%	18	2.2%	19	2.3%	99	11.6%

FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012



FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

El método Genotype MTBDR*plus* permite la genotipificación de cepas de micobacterias para determinar los genes de resistencia que pueden estar presentes, las 761 cepas que fueron evaluadas por este método determinaron las mutaciones más frecuentes en los genes

rpoB, *inhA* y *katG* causantes de la resistencia a Rifampicina e Isoniacida. Se determinó la presencia de genes mutantes en 91 cepas con algún tipo de resistencia. Se reportaron 58 cepas, 7.6% con monoresistencia a INH, 18 cepas con monoresistencia a RIF y 15 MDR, 2.4% y 2.0% respectivamente. Esta proporción de MDR es comparable con la reportada en el Informe de las Américas de OPS de 2012, en donde la proporción de TB-MDR fue de 2,1% (1,4%-3,0%). (Informe Regional de las Américas, 2012). (19)

En la Tabla No. 3 se detalla la distribución de los genes mutados en las cepas que muestran monoresistencia, ya sea a Rifampicina o Isoniacida. En el período evaluado, la mayor cantidad de cepas con mutaciones a Isoniacida se reportó en los años 2008 y 2012, siendo los principales genes detectados el *inhA* MUT1, 41.4% y el *katG* MUT1, 39.7%.

Tabla No. 3 Mutaciones en el gen *rpoB* causante de la monoresistencia a Rifampicina y los genes *katG* e *inhA* causantes de la monoresistencia a Isoniacida

MONORRESISTENCIA ISONIACIDA

Gen mutado	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total general	%
<i>inhA</i> MUT1	7	5		2	8	2	24	41.4%
<i>katG</i> MUT1	7	2	3	1	6	4	23	39.7%
<i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	2	4	1			3	10	17.2%
Mutación silenciosa					1		1	1.7%
	16	11	4	3	15	9	58	100.0%

MONORRESISTENCIA RIFAMPICINA

Gen mutado	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total general	%
<i>rpoB</i> mutación silenciosa	2	2	0	1	4	1	10	55.6%
<i>rpoB</i> MUT2A		2					2	11.1%
<i>rpoB</i> MUT3			1		5		6	33.3%
	2	4	1	1	9	1	18	100.0%

FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

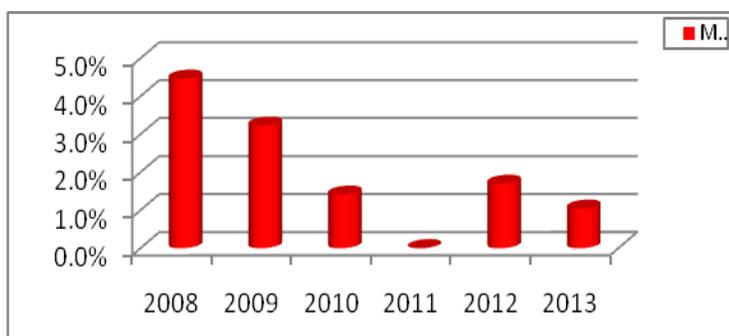
En relación a las cepas con monoresistencia a Rifampicina, el gen más frecuentemente encontrado fue el *rpoB* Mutación silenciosa 55.6%, seguido del gen *rpoB* MUT3, 33.3%. lo que es comparable con los resultados encontrados por *Asencios* y *cols.* en Perú, en donde las mutaciones más frecuentes a RIF fueron: *rpoB* MUT3 con 56.4%, *rpoB* MUT1 con 24.2%. En monoresistencia a INH también se encontraron similitudes. En la presente

investigación el gen más frecuente en monoresistencia a INH fue *inhA* MUT1 con 41.4% seguido de *katG* MUT 1, comparable con los datos encontrados por *Asencios et al*, que reportaron 71.2% para *katG* MUT1 y 13.7% para *inhA* MUT1. (*Asencios et al*, 2012)

En referencia a las cepas MDR, el total de cepas encontradas fue del 2.0%, 15 cepas, en comparación al 4.3% reportado por Gordillo y cols en el período de 2004-2008. En el gráfico No. 2 se observa la distribución de cepas MDR aisladas por año, de éstas 5 cepas se aislaron en 2008, 4.5%, 4 cepas en 2009, 3.2%, 3 en 2012 y 2 en 2013 1.7% y 1.0% respectivamente. En el año 2011 no se aisló ninguna cepa MDR.

Gráfico No. 2 Porcentaje de aislamientos por año de cepas MDR

AÑO	RESISTENCIA INH + RIF MDR	MDR
2008	5	4.5%
2009	4	3.2%
2010	1	1.4%
2011	0	0.0%
2012	3	1.7%
2013	2	1.0%



FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

Tabla No. 4 Distribución de genes mutantes causantes de cepas MDR

Gen mutado	2008	2009	2010	2009	2012	2013	Total general	
<i>rpoB</i> Mutación silenciosa, <i>katG</i> MUT1 e <i>inhA</i> MUT1	5						5	33.3%
<i>rpoB</i> MUT 3, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1			1				1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT2A, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1		1					1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>inhA</i> MUT1						1	1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT 1, <i>inhA</i> MUT1					1		1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT1					2	1	3	20.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT2		3					3	20.0%
	5	4	1	0	3	2	15	100.0%

FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

Los genes más comúnmente detectados en cepas MDR son los genes *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1 con 5 cepas, 33.3%, los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT1 y los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2 con 3 cepas cada uno el 20.0%. Tabla No. 3

Se realizó la caracterización de las especies del complejo de *M. tuberculosis* que manifestaron monoresistencia a RIF y multidrogoresistencia, MDR, y se encontró que la especie predominante es *M. tuberculosis/canetti* en un 76.5%, seguido por *M. africanum* 23.5%. La mayoría de cepas de *M. tuberculosis/canetti* presentaron monoresistencia a Rifampicina 53.8%, mientras que el resto fueron cepas MDR, 46.1%. Para *M. africanum* la mitad de las cepas presentaron resistencia a Rifampicina y la otra mitad son cepas MDR. Tabla No. 5.

En relación a las cepas de la especie de *M. africanum* no hay diferencias en los genes encontrados tanto en monoresistencia como en MDR. Para *M. tuberculosis/canetti* el gen más frecuente para resistencia a RIF es el *rpoB* MUT3 mientras que para las cepas MDR es la combinación entre el *rpoB* MUT3+ *katG* MUT1.

Tabla No. 5 Distribución de genes de resistencia circulantes de las especies del Complejo *M. tuberculosis*.

MTBC	R RIF	MDR	Total	
<i>M. tuberculosis/canetti</i>	7	6	13	76.5%
<i>M. africanum</i>	2	2	4	23.5%
	9	8	17	100.0%

	Gen Mutado	R RIF	MDR	TOTAL	%	
<i>M. africanum</i>	<i>rpoB</i> Mutación silenciosa, <i>katG</i> MUT1 e <i>inhA</i> MUT1		2	2	11.8%	23.5%
	<i>rpoB</i> mutación silenciosa	2		2	11.8%	
<i>M. tuberculosis/canetti</i>	<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT 1, <i>inhA</i> MUT1		1	1	5.9%	76.5%
	<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT1		2	2	11.8%	
	<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT2		3	3	17.6%	
	<i>rpoB</i> MUT2A	2		2	11.8%	
	<i>rpoB</i> MUT3	3		3	17.6%	
	<i>rpoB</i> mutación silenciosa	2		2	11.8%	
	TOTAL	9	8	17	100.0%	100.0%

FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

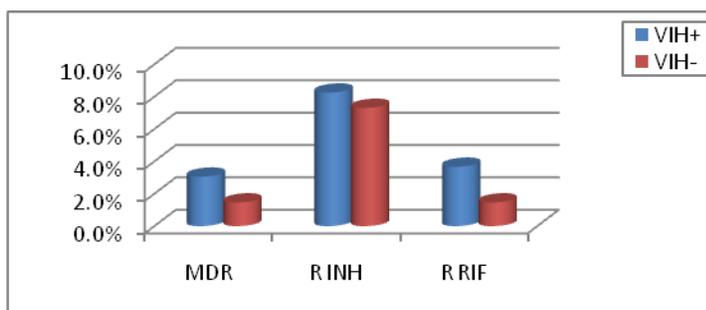
Otro de los parámetros considerados como importantes es la relación entre los perfiles genéticos de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes que presentan infección por VIH. En 91 cepas de *M. tuberculosis* evaluadas por el método genotípico, se encontró que 49

provenían de pacientes VIH+ y 35 de pacientes VIH-, 53.8% y 38.5% respectivamente. Se esperaría que la mayoría de pacientes VIH+ fueran MDR, sin embargo el mayor porcentaje de resistencia se observó en monoresistencia a INH, 8.3%, seguido de monoresistencia a RIF, 3.7% y por último MDR con 3.1%. El porcentaje que se observó en pacientes VIH- respecto a MDR es menor, 1.5%, que el observado en VIH+. Tabla No. 6, gráfico No. 3

Tabla No. 6 y Gráfico No. 3 Distribución de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes VIH.

	VIH+	VIH-	ND
MDR	3.1%	1.5%	0.0%
R INH	8.3%	7.3%	6.8%
R RIF	3.7%	1.5%	1.1%

FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012



En relación a los tipos de genes encontrados para monoresistencia a RIF, en pacientes VIH+ el más frecuente es el *inhA* MUT1 mientras que en pacientes VIH- es el *katG* MUT1, de igual manera existe una marcada diferencia en cuanto a monoresistencia a INH, en VIH+ el gen predominante es el *rpoB* MUT3 mientras que en VIH- únicamente se encontró *rpoB* mutación silenciosa.

Referente a MDR se observó que en pacientes VIH+ se detectaron varias combinaciones de genes siendo las más frecuentes *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1 y los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2, ambos con un 30%, mientras que en pacientes VIH- únicamente se encontraron dos combinaciones de mutaciones. Tabla No.7

Al establecer la correlación entre los pacientes VIH+ con la resistencia de cepas de *M. tuberculosis* se encontró un valor de $p=0.5503$ lo que nos indica que si existe una relación entre VIH y resistencia pero que esta no excluye que pacientes VIH- manifiesten resistencia.

Tabla No. 7 Distribución de mutaciones de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes HIV.

R INH	VIH+		VIH-		ND	
<i>inhA</i> MUT1	12	44.4%	9	36.0%	3	50.0%
<i>katG</i> MUT1	7	25.9%	15	60.0%	1	16.7%
<i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	8	29.6%	0	0.0%	2	33.3%
Mutación silenciosa	0	0.0%	1	4.0%	0	0.0%
	27	100.0%	25	100.0%	6	100.0%

R RIF	VIH+		VIH-		ND	
<i>rpoB</i> mutación silenciosa	4	33.3%	5	100.0%	1	100.0%
<i>rpoB</i> MUT2A	2	16.7%	0	0.0%	0	0.0%
<i>rpoB</i> MUT3	6	50.0%	0	0.0%	0	0.0%
	12	100.0%	5	100.0%	1	100.0%

MDR	VIH+		VIH-		ND	
<i>rpoB</i> Mutación silenciosa, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	3	30.0%	2	40.0%	0	0.0%
<i>rpoB</i> MUT 3, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
<i>rpoB</i> MUT2A, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>inhA</i> MUT1	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT 1, <i>inhA</i> MUT1	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT1	0	0.0%	3	60.0%	0	0.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT2	3	30.0%	0	0.0%	0	0.0%
	10	100.0%	5	100.0%	0	0.0%

FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

CORRELACION ENTRE EL METODO FENOTIPICO Y EL METODO GENOTIPICO

Se realizó la comparación entre un método fenotípico, MGIT™ 960 y un método genotípico para la determinación de la resistencia de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de los años 2008-2013, en total por ambos métodos se evaluaron un total de 99 cepas encontrándose que para la detección de monoresistencia a INH, existe una concordancia entre ambos métodos del 82.5%, mientras para la monoresistencia a RIF, no se puede

determinar ya que las cepas que fueron resistentes por un método son totalmente sensibles por el método de MGIT™ 960. Esto se debe a que las cepas que fueron mono-resistentes a RIF manifestaron una mutación silenciosa, y este tipo de mutación no puede ser detectada por medio de un método fenotípico como lo es el MGIT™ 960.

Tabla No. 8 Resultados obtenidos de las 99 cepas de *M. tuberculosis* mediante el método genotípico MTBDRplus contra el método de referencia MGIT™ 960.

Drogas	HAIN	MGIT		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Concordancia (%)
		R	S			
INH	R	6	4	95	32	82.8
	S	13	76			
RIF	R	0	3	NA	NA	NA
	S	8	88			

FUENTE: PROYECTO FODECYT 062-2012

NA: No aplicable

PARTE IV.

IV.1 CONCLUSIONES

Objetivo General

1. La resistencia encontrada en las cepas de *M. tuberculosis* durante el período 2008-2013 para INH y RIF, cepas MDR es de 2.2% en pacientes del Hospital Roosevelt. Se encontró un total de 91 cepas que presentaron resistencia, siendo la de mayor porcentaje la monoresistencia a INH, 7.2% del total de cepas evaluadas, seguidas por MDR, 2.3% y luego monoresistencia a RIF, 2.2%

Objetivo Específico 1

1. Las especies más frecuentes del complejo *M. tuberculosis* que fueron identificadas son *M. tuberculosis/canetti* y *M. africanum*. El perfil genético de resistencia encontrado en las especies más frecuentes fue en *M. tuberculosis/canetti* el gen *rpoB* MUT3 es el más frecuente en resistencia a RIF, mientras que en MDR los genes más frecuentes son *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2

Objetivo Específico 2 y 3

1. Los genes circulantes más frecuentes de resistencia a INH, los genes *inhA* MUT1, 41.4% y el *katG* MUT1, 39.7%. Para monoresistencia a Rifampicina, el gen más frecuente encontrado fue el *rpoB* Mutación silenciosa 55.6%, seguido del gen *rpoB* MUT3, 33.3%. En cepas MDR los genes detectados fueron la combinación de *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1 con 5 cepas, 33.3%

Objetivo Específico 4

1. En la población evaluada de 91 cepas con resistencia, 49 provenían de pacientes VIH+ y 35 de pacientes VIH-, 53.8% y 38.5% respectivamente. Los porcentajes de cepas MDR son mayores en pacientes con coinfección TB-VIH, 3.1% que pacientes VIH-, 1.5%.
2. Las combinaciones de mutaciones en pacientes TB-VIH son de varios tipos, mientras que en pacientes VIH- se encontró únicamente dos combinaciones *rpoB* Mutación silenciosa, *katG* MUT1 + *inhA* MUT1 y la combinación *rpoB* MUT3 +

katG MUT1. Existe una correlación entre pacientes TB-VIH y la presencia de cepas con algún grado de resistencia. Aunque esta resistencia también puede ser puesta de manifiesto en pacientes VIH-.

Objetivo Específico 6

1. La correlación entre los métodos utilizados no pudo ser establecida, ya que las mutaciones genéticas que corresponden a las mutaciones silenciosas del gen *rpoB* detectadas por un método genotípico no pueden ser detectadas por un método fenotípico, ya que estas no se manifiestan.

IV.2 RECOMENDACIONES

Objetivo General

1. Es importante la implementación de técnicas para detección de los perfiles de resistencia de cepas de *M. tuberculosis*, de manera que se pueda establecer el perfil y la epidemiología de las cepas circulantes.
2. Se debe de disponer de un abastecimiento constante de reactivos que permitan la detección de los perfiles de resistencia.

Objetivo específico 2 y 3

1. Es importante la incorporación rutinaria de la determinación de la resistencia a drogas de primera y segunda línea, así como la determinación de la frecuencia en los genes mutantes para establecer la epidemiología presente en los pacientes del Hospital Roosevelt lo que a su vez permitirá incrementar la sobrevida de los pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente, ya que apunta a un tratamiento adecuado y certero acorde a los resultados obtenidos para cada uno de los antifímicos.

Objetivo 4

1. Se recomienda continuar con la evaluación de los perfiles genéticos de resistencia en pacientes con coinfección TB-VIH, de manera que se establezcan las diferencias para obtener mejores resultados en los tratamientos de los pacientes con este tipo de condición.
2. La información de los perfiles genéticos de resistencia proveerá información para establecer los esquemas de tratamiento más adecuados para los pacientes con coinfección TB-VIH.

Objetivo 5

1. Continuar con la alimentación de la base de datos, mediante las hojas de recolección de datos clínicos de los pacientes, para analizar la epidemiología de la Tuberculosis en la población que asiste al Hospital Roosevelt.

Otros

1. Se recomienda realizar otros estudios para establecer los perfiles genéticos a nivel de país, ya que esto permitiría conocer la epidemiología de los genes que causan la resistencia de los antifímicos a fin de establecer un mejor manejo terapéutico de la enfermedad.
2. Es importante continuar con estudios a nivel genético de los perfiles de resistencia presentados tanto en pacientes sin coinfección como en pacientes con coinfección TB-VIH para establecer los tratamientos adecuados en ambos tipos de pacientes, mejorando la sobrevida y disminuyendo la morbi-mortalidad.

IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. 2000 Tuberculosis. Fact Sheet No. 104. Pp. 1-4
2. Brooks et.al. (2002). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17^a Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México 345-352
3. Brock. (2004). Biología de los microorganismos. 10^a Edición. Editorial Pearson Educación. S.A. Madrid 412-413
4. Ruiz, H, Gordillo, R y Matta, V. (2010). Evaluación de la técnica en microplaca de 3-(4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) como marcador de la susceptibilidad micobacteriana en el Laboratorio del Hospital Roosevelt.
5. Cuevas-Córdoba, B & Zenteno-Cuevas, R. (2010). Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. El selvier. 28(9): 621-628
6. Asencios, L. et.al. (2012). Prueba molecular Genotype MTBDR_{plus}, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. Perú. Med. Exp Salud Pública. 29 (1) 92-98.
7. Bass JB Jr, Farer LS, Hopewell PC, O'Brien R, Jacobs RF, Rubén F, et. al. (1994) Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Am J Respiratory Critical Care Medical. (149), 1359-1374.
8. Caminero, J. et.al. (2009). Actualización en el tratamiento de la tuberculosis. Revista Española de Patología torácica, 21, (2), 88-101.
9. Cárcamo M, et.al. (2005) Caracterización de la coinfección VIH/SIDA tuberculosis en el Hospital Roosevelt. Informe anual inédito. Hospital Roosevelt, Guatemala.
10. Castañeda, VL, Sánchez J y Moran-Moguel, MC. (2003) El papel de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico y control de tuberculosis. Gaceta Médica de México. 139(3), 288-290.
11. Gordillo, R. & Palacios M. (2006) Susceptibilidad Antibiótica de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en los años 2004 y 2005. Hospital Roosevelt. Informe anual inédito. Hospital Roosevelt, Guatemala.
12. Gordillo R, Boloix M, Mejía C & Palacios MC. (2012). Multidrogo resistencia en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente en el Hospital

- Roosevelt de la Ciudad de Guatemala en el período 2004-2008. Revista del Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala, VI, (3), 82.
13. HAIN. (Mayo-2009). Genotype MTBDR*plus*. Test de genética molecular para identificación de Resistencia a Rifampicina y/o Isoniacida del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Hain Lifescience GmbH. Alemania
 14. HAIN. (Octubre-2010). Genotype MTBDR*sl*. Test de genética molecular para la identificación de Resistencia a Fluoroquinolonas, Aminoglicósidos/Péptidos cíclicos y Etambutol del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Hain Lifescience GmbH. Alemania
 15. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. (2006). Molecular epidemiology of tuberculosis: Current Insights. Clinical Microbiologic, (19) 658-685.
 16. Organización Panamericana de la Salud. (2009). Guías técnicas para la vigilancia de la drogoresistencia en la tuberculosis. Washington, (IV), 16-17.
 17. Pablos-Méndez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. (1998) Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. New England Journal Medical, (338), 1641-1649.
 18. World Health Organization. (2008). *Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008*. World Health Organization. Disponible: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/download_centre/en/index.html. (Consulta: 2012, julio 25)
 19. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22954&Itemid
 20. Informe Anual OPS/WHO 2013 disponible en: <http://www.who.int/tb/es/>

IV. 4 PUBLICACIONES Y PATENTES

- a. Gordillo R, Boloix M, Mejía C & Palacios MC. (2012) Multidrogo resistencia en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente en el Hospital Roosevelt de la Ciudad de Guatemala en el período 2004-2008 VI, (3), 82.
- b. Ruiz, H & Gordillo, R. (2011) Flujograma de Tuberculosis, Nuevas tecnologías. Memorias de labores de la Clinica de Enfermedades Infecciosas, Unidad de Enfermedades Infecciosas HR. 84-85
- c. Gordillo, R & Palacios, MC. (2009) Datos de Resistencia de *M. tuberculosis* Resistencia de cepas de *M. tuberculosis* en Hospital Roosevelt 2004-junio2006. Memoria de labores Comité Control de Infecciones Nosocomiales Año 2004-2008, 20-21
- d. Gordillo, R., et al. (2008) Área de Microbiología. Tuberculosis 2008. Memorias de labores de la Clinica de Enfermedades Infecciosas, Unidad de Enfermedades Infecciosas HR. 50-55.
- e. Mejía, V & Silvestre, M. (2009). Actividades sobre control y manejo de Tuberculosis. Memorias de labores Comité Control de Infecciones Nosocomiales Año 2004-2008. 19

IV.5 ANEXOS

Anexo No. 1

Hoja de recolección de datos generales del paciente



Solicitud de baciloscopia, identificación y/o prueba de sensibilidad para *Complejo Mycobacterium tuberculosis*

No. cultivo

La información requerida en esta solicitud es la mínima que precisa el laboratorio para elegir los estudios, métodos a aplicar y mantener comunicación con el médico que refiere el estudio. La falta de información ocasiona el uso inapropiado de recursos diagnósticos y la inadecuada e inoportuna transmisión de resultados.

Datos del paciente		No. Registro: _____
Fecha de ingreso _____	Servicio _____	
Nombres: _____		Apellidos: _____
Edad: _____	Sexo: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	Ocupación: _____
Lugar de procedencia: _____		No. Celular: _____
Localización de la enfermedad	<input type="checkbox"/> TB pulmonar	<input type="checkbox"/> TB Extrapulmonar
SI ES LA SEGUNDA O TERCERA MUESTRA NO LLENAR ESTA PARTE		
Exposición a tuberculosis		
<input type="checkbox"/> Caso nuevo	<input type="checkbox"/> Caso reincidente	<input type="checkbox"/> Fallo esquema A
<input type="checkbox"/> Contacto	<input type="checkbox"/> Control tratamiento	<input type="checkbox"/> Fallo esquema B
<input type="checkbox"/> Abandono	<input type="checkbox"/> Falla terapéutica	<input type="checkbox"/> Otros: _____
Historia clínica		
<input type="checkbox"/> Sin tratamiento previo	<input type="checkbox"/> Regreso al tratamiento después del abandono	
<input type="checkbox"/> Anteriormente tratado	<input type="checkbox"/> Fracaso terapéutico	
<input type="checkbox"/> Recaída	<input type="checkbox"/> Otro (especifique): _____	
El tratamiento actual fue iniciado en el mes de: _____ año: _____		
Tipo de esquema administrado: _____		
Las drogas administradas son: _____		
La evolución del paciente con este tratamiento es:		
<input type="checkbox"/> Buena	<input type="checkbox"/> Estable	<input type="checkbox"/> Mala
INFORMACIÓN DE LA MUESTRA ENVIADA		
	<input type="checkbox"/> Para diagnóstico	<input type="checkbox"/> Para control de tratamiento
<input type="checkbox"/> 1ra. Muestra	<input type="checkbox"/> 2da. Muestra	<input type="checkbox"/> 3ra. Muestra
Condición del paciente VIH:	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Positivo
Persona VIH positiva, conteo de CD4: _____		
Estadio VIH: _____		
TIPO DE MUESTRA ENVIADA		
Especifique:		
<input type="checkbox"/> Esputo	<input type="checkbox"/> Líquido cefalorraquídeo	
<input type="checkbox"/> Lavado bronquial/broncoalveolar	<input type="checkbox"/> Líquido pleural	
<input type="checkbox"/> Cepillados	<input type="checkbox"/> Líquido articular	
<input type="checkbox"/> Orina	<input type="checkbox"/> Ganglio	
<input type="checkbox"/> Sangre	<input type="checkbox"/> Heces	
<input type="checkbox"/> Aspirados pulmonares	<input type="checkbox"/> Aspirados gástrico	
<input type="checkbox"/> Aspirado Traqueal		
<input type="checkbox"/> Biopsia de: _____	(especifique)	
<input type="checkbox"/> Otros: _____		

Anexo No. 2 Hoja de recolección de datos de laboratorio

Resultados de estudios al paciente:	
Fecha: _____	Tipo de Muestra: _____
<input type="checkbox"/> Baciloscopia:	
<input type="checkbox"/> Tinción de Kinyoun	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Abundante <input type="checkbox"/> Reg. cantidad <input type="checkbox"/> Escaso <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> No Realizado <input type="checkbox"/> Indeterminado
<input type="checkbox"/> Tinción Auramina Rodamina	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Abundante <input type="checkbox"/> Reg. cantidad <input type="checkbox"/> Escaso <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> No Realizado <input type="checkbox"/> Indeterminado
<input type="checkbox"/> Identificación directa a partir de la muestra:	
<input type="checkbox"/> Realizado <input type="checkbox"/> No Realizado	
<input type="checkbox"/> MTD	<input type="checkbox"/> GeneXpert MTB/RIF <input type="checkbox"/> Detección de MTBC con resistencia a Rifampicina <input type="checkbox"/> Detección de MTBC sin resistencia a Rifampicina <input type="checkbox"/> Negativo
<input type="checkbox"/> Detección de MTBC <input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Genotype Directa <input type="checkbox"/> <i>M. avium</i> <input type="checkbox"/> <i>M. intracellulare</i> <input type="checkbox"/> <i>M. kansasii</i> <input type="checkbox"/> <i>M. malmoense</i> <input type="checkbox"/> Complejo <i>M. tuberculosis</i> <input type="checkbox"/> Negativo
<input type="checkbox"/> Cultivo:	
<input type="checkbox"/> Realizado <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> No realizado
Método de identificación de la cepa	
<input type="checkbox"/> Genprobe	<input type="checkbox"/> Genotype CM <input type="checkbox"/> Genotype AS
Identificación de:	
<input type="checkbox"/> Complejo <i>M. tuberculosis</i> <input type="checkbox"/> Complejo <i>M. avium</i> <input type="checkbox"/> <i>M. kansasii</i> <input type="checkbox"/> <i>M. gordonae</i>	
Otros (especifique): _____	
Cultivo creció en medio: _____ a los _____ días de incubación	
<input type="checkbox"/> Sensibilidad para Complejo <i>M. tuberculosis</i>	
<input type="checkbox"/> MTBDR _{plus} <input type="checkbox"/> MTBDR _{sl} <input type="checkbox"/> MGIT 960	
Aislamiento identificado como sensible (S) /resistente (R) a:	
<input type="checkbox"/> Rifampicina <input type="checkbox"/> Isoniacida <input type="checkbox"/> Estreptomicina <input type="checkbox"/> Etambutol <input type="checkbox"/> Pirazinamida	

Anexo No. 3

Copia de la carta de entrega de base de datos de EpiInfo.



OFI MICRO 048/2014
Guatemala, 17 de Junio, 2014

Doctora
Johanna Meléndez
Infectóloga Clínica Infecciosas
Hospital Roosevelt
Edificio

Dra. Meléndez:

Reciba un cordial y atento saludo. El motivo de la presente es para hacerle entrega de las papaletas de tuberculosis recopiladas durante el año en curso, así como la base de datos para que se inicie con el ingreso de la información proporcionada. Con esto se concluye el objetivo 4 de los objetivos específicos del Proyecto Fodecyt 062-2012 titulado "Caracterización, evaluación y determinación de la prevalencia de mutaciones asociadas con resistencia a Rifampicina e Isoniacida en aislamientos clínicos de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes del Hospital Roosevelt, Guatemala".

Agradezco su atención a la presente.

Licda. Ma. Remei Gordillo Mata
Investigador Asociado I
Jefe Sección de Microbiología
Hospital Roosevelt

Atentamente,



Vo.Bo. Dr. Carlos Rodolfo Mejía Villatoro
Investigador Principal
Jefe Clínica de Enfermedades Infecciosas
Hospital Roosevelt

c.c. Archivo

Dr. Johanna Meléndez 17/ junio 2014.

PARTE V
V.1 INFORME FINANCIERO

								AD-R-0013	
		FICHA DE EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA							
LINEA:									
FODECYT									
Nombre del Proyecto:				"Caracterización, evaluación y determinación de la prevalencia de mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina e isoniacida en aislamientos clínicos de las especies del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de pacientes del Hospital Roosevelt, Guatemala".					
Numero del Proyecto:				062-2012					
Investigador Principal y/o Responsable del Proyecto:				DR. CARLOS RODOLFO MEJÍA VILLATORO					
Monto Autorizado:				Q396,255.00		Orden de Inicio (y/o Fecha primer pago):		02/01/2013	
Plazo en meses				18 meses					
Fecha de Inicio y Finalización:				02/01/2013 al 30/06/2014					
Grupo	Renglon	Nombre del Gasto	Asignacion Presupuestaria	TRANSFERENCIA		Ejecutado	Pendiente de Ejecutar		
				Menos (-)	Mas (+)				
1		SERVICIOS NO PERSONALES							
	122	Impresión, encuadernación y reproducción	Q 500.00				Q 500.00		
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad	Q 115,000.00			Q 102,250.00	Q 12,750.00		
	189	Otros estudios y/o servicios: evaluación extena de impacto	Q 8,000.00				Q 8,000.00		
2		MATERIALES Y SUMINISTROS					Q -		
	243	Productos de papel o cartón			Q 178.50	Q 178.50	Q -		
	261	Elementos y compuestos químicos	Q 248,800.00			Q 233,743.82	Q 15,056.18		
	291	Papel de escritorio	Q 500.00				Q 500.00		
	292	Útiles de limpieza y productos sanitarios	Q 2,770.00	Q 178.50		Q 400.00	Q 2,191.50		
	295	Útiles menores, médico-quirúrgicos y de laboratorio	Q 20,685.00	Q 740.00		Q 17,540.50	Q 2,404.50		
3		PROPIEDAD, PLANTA, EQUIPO E INTANGIBLES							
	329	Otras maquinarias y equipos			Q 740.00	Q 740.00	Q -		
		GASTOS DE ADMÓN. (10%)							
			Q 396,255.00	Q 918.50	Q 918.50	Q 354,852.82	Q 41,402.18		
		MONTO AUTORIZADO	Q 396,255.00			Disponibilidad	Q 41,402.18		
	(-)	EJECUTADO	Q 354,852.82						
		SUBTOTAL	Q 41,402.18						
	(-)	CAJA CHICA	Q -						
		TOTAL POR EJECUTAR	Q 41,402.18						