

Original

Resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* durante un periodo de cuatro años en un hospital de Madrid

E. Aznar, D. Domingo, S. Abanades, E. García-Peñuela y M. López-Brea

Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, España

RESUMEN

La tuberculosis es considerada un grave problema de salud pública. Algunos factores, como la infección por VIH o la inmigración, han afectado de manera importante a la epidemiología de esta enfermedad en España. El problema se ha visto agravado en los últimos años con la diseminación de cepas multirresistentes. Por todo ello debe establecerse una vigilancia periódica respecto a la incidencia y las resistencias observadas. En este estudio se recogen los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en los años 2001, 2002, 2003 y 2004, y sus características de sensibilidad a los antituberculosos en pacientes del Área 2 de Madrid. Para evaluar la sensibilidad de las cepas se utilizó el sistema MGIT 960[®]. Se aislaron 244 cepas, de las cuales el 15,2% fue resistente al menos a un antibiótico (distinto de la estreptomina). Un 29,9% de los aislamientos se obtuvieron en muestras de pacientes inmigrantes. Además, la población inmigrante afectada mostró un mayor porcentaje de resistencias ($p < 0.01$) y una edad media menor ($p < 0.01$) que la población autóctona.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis* - Resistencias - Madrid

Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a four-year period in a Madrid hospital

SUMMARY

Tuberculosis is considered a serious public health problem. Some factors, such as HIV infection and immigration, have had a major impact on the epidemiology of this illness in Spain. The problem has worsened in recent years due to the dissemination of multiresistant strains. Therefore, a periodic surveillance should be established with respect to the incidence and the resistances observed. In this study we collect *M. tuberculosis* isolates carried out in the years 2001, 2002, 2003 and 2004, and their susceptibility characteristics in patients from Area 2 in Madrid. To evaluate the isolates' susceptibilities, the MGIT 960[®] system was used. Of a total of 244 isolates, 15.2% were resistant to at least one antibiotic (different to streptomycin), and 29.9% of the isolates were obtained in samples from immigrant patients. In addition, the immigrant population affected showed a greater percentage of resistances ($p < 0.01$) and a younger mean age ($p < 0.01$) than the indigenous population.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* - Resistance - Madrid

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis supone un grave problema de salud pública en todo el mundo. Aunque es en los países en vías de desarrollo donde se concentra el 95% de la población infectada y las cifras de mortalidad son mucho mayores que en los industrializados, el aumento de la prevalencia en el primer mundo desde mediados de la década ha sido continuo. La pandemia del VIH y los flujos migratorios desde países de mayor prevalencia a aquellos de menor prevalencia son los dos factores que parecen haber contribuido en mayor medida a este aumento. En los últimos años, sin embargo, el mayor control de la infección por el VIH ha ocasionado un claro ascenso del papel de la inmigración (1).

El problema se ha visto agravado, además, por la aparición y diseminación de cepas multirresistentes (2). Los métodos estándar para determinar la sensibilidad a los fármacos antituberculosos, la proporción en agar Middlebrook 7H10 y Lowenstein-Jensen, requieren entre tres y cuatro semanas, durante las cuales el paciente podría estar recibiendo un tratamiento ineficaz, y con ello se contribuye al aumento de las resistencias y al fracaso terapéutico.

La necesidad de métodos rápidos y precisos para el diagnóstico de la infección y de la detección de resistencias ha llevado a la comercialización de diversos sistemas, eficaces y capaces de ofrecer resultados en un periodo de tiempo relativamente corto. El primero en desarrollarse, el sistema *BACTEC 460*[®], presenta para algunos el inconveniente del manejo de material radiactivo (3). Posteriormente se ha introducido el sistema *MIGT 960*[®] (M960), que utiliza tubos con medio de Middlebrook 7H9 modificado con un indicador fluorescente unido a oxígeno embebido en una base de silicona en el fondo del tubo (4). Cuando las bacterias crecen y consumen el oxígeno, el indicador se libera y emite fluorescencia al iluminarlo con luz ultravioleta. Se trata de un sistema completamente automatizado y continuamente monitorizado. La sensibilidad a distintos agentes antituberculosos puede estudiarse comparando el crecimiento en tubos que contienen los fármacos y en otro que no contiene ninguno y sirve de control. Mediante este método pueden evaluarse las resistencias a los fármacos de primera línea, como estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol (combinación conocida como SIRE). Utilizando un medio específico con pH 5,9, también se puede evaluar la pirazinamida, fármaco imprescindible para las pautas de tratamiento de corta duración.

El objetivo de este estudio fue determinar los porcentajes de resistencia de los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en nuestro medio mediante el sistema

M960 en el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2001 y diciembre de 2004, y relacionarlos con grupos poblacionales de infectados por el VIH y población inmigrante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 244 aislamientos de *M. tuberculosis* obtenidos de muestras clínicas que provenían tanto de niños como de adultos, del Área 2 de Madrid.

Las muestras fueron descontaminadas utilizando una solución de NaCl-NaOH e inoculadas en tubos con medio líquido del sistema M960 suplementados con PANTA (polimixina B, amfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y azlocilina) y OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (*BACTEC MGIT 960 Supplement Kit*[®], Becton-Dickinson, Sparks, USA). Asimismo, se sembró la muestra en medio sólido (Lowenstein-Jensen o Coletsos, o ambos).

La identificación se llevó a cabo mediante el *kit Accu-probe M. tuberculosis complex culture confirmation*[®] (Gen-Probe, San Diego, California, USA).

La sensibilidad a la estreptomina, la isoniazida, la rifampicina y el etambutol se estimó con el *BACTEC MGIT 960 SIRE Kit*[®] (Becton-Dickinson, Sparks, USA). Así, para cada muestra se utilizaron cinco tubos MGIT 960: un control de crecimiento y un tubo por antibiótico. Los tubos fueron suplementados con 0,8 ml del preparado OADC. A continuación se añadieron 100 µl de cada antibiótico en su correspondiente tubo para conseguir unas concentraciones finales de 1 mg/l de estreptomina, 0,1 mg/l de isoniazida, 1 mg/l de rifampicina y 5 mg/l de etambutol. Por último se inoculó la cepa: 0,5 ml de un tubo de MGIT960 48 horas después de haber dado un resultado positivo en cada uno de los tubos con antibiótico y una dilución 1:100 de ese mismo inóculo en el control de crecimiento.

En el caso de la pirazinamida se utilizaron dos tubos por muestra: un control de crecimiento y un tubo con antibiótico. Ambos se suplementaron con 0,8 ml de medio enriquecido y al segundo se le añadieron 100 µl de antibiótico para obtener una concentración final de 100 mg/l de pirazinamida. El inóculo de la cepa fue el mismo que en los otros cuatro antibióticos en el tubo con pirazinamida y una dilución 1:10 en el control de crecimiento.

La lectura se realizó en los siguientes 4 a 14 días. Las cepas detectadas como resistentes fueron enviadas al centro nacional de referencia (Instituto Carlos III, Madrid) para su confirmación.

Para el análisis informatizado de los datos y su estudio estadístico se utilizó el programa *Epiinfo*, versión 6,04 (CDC).

RESULTADOS

De los 244 pacientes estudiados, 73 (29,9%) eran inmigrantes y 15 (6,1%) eran VIH positivos. Entre los casos de VIH, tres eran inmigrantes. Diecisiete de las muestras provenían de niños, y de ellos ocho eran inmigrantes y ninguno era seropositivo. La media de edad de los pacientes inmigrantes adultos fue de 32,1 (DE: 11,8) años, mientras que la de los pacientes autóctonos adultos fue de 48,7 (DE: 20,6) años. La diferencia de edad entre los dos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

Los aislamientos se obtuvieron de muestras de esputo (138), aspirado bronquial (28), jugo gástrico (15), orina (14), líquido pleural (11), adenopatías (10), lavado broncoalveolar (8), líquido cefalorraquídeo (4) y otros (16).

Todas las cepas fueron sometidas al estudio de su sensibilidad a estreptomycin, isoniazida, rifampicina y etambutol, y en 125 de ellas se estudió además la sensibilidad a pirazinamida.

La media de tiempo que el sistema M960 requirió para establecer la sensibilidad a los antituberculosos estudiados fue de 182 horas (DE: 46,7) (siete días y 14 horas) para estreptomycin, isoniazida, rifampicina y etambutol, y 157,5 horas (DE: 41,9) (seis días y 13 horas) para pirazinamida.

Los porcentajes totales de cepas resistentes fueron del 16,9% para estreptomycin, 7,4% para isoniazida, 2,5% para rifampicina, 3,3% para etambutol y 4% para pirazinamida.

Treinta y siete de los aislamientos (15,2%) resultaron resistentes al menos a uno de los cuatro fármacos de primera línea.

No se encontró ningún tipo de relación significativa entre la seropositividad para el VIH y la prevalencia de resistencia entre los aislamientos de *M. tuberculosis*.

Un 2,9% resultó resistente a dos o más antibióticos diferentes a la estreptomycin. Entre estas cepas, tres fueron resistentes a todos los antibióticos probados, una lo fue a isoniazida, rifampicina y pirazinamida, dos a isoniazida y rifampicina, y una a isoniazida y etambutol.

Cuatro de estos aislamientos multirresistentes se obtu-

vieron de muestras de pacientes inmigrantes y los otros tres de pacientes autóctonos, sin que se encontrara una relación estadísticamente significativa ($p = 0.17$, prueba exacta de Fisher).

El total de cepas resistentes fue 52 (21,3%), de las cuales 22 (42,3%) se aislaron de pacientes inmigrantes (el 30,1% de estos pacientes) y 30 (57,7%) de pacientes autóctonos (17,5% de ellos). En este caso sí se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones inmigrante y autóctona ($p = 0.02$, prueba de χ^2 ; RR = 1,7; intervalo de confianza para el 95%: 1,1 a 2,8). Las diferencias en el grado de resistencia para cada uno de los antibióticos estudiados se reflejan en la Tabla 1.

De los 16 pacientes seropositivos para el VIH sólo uno mostró una cepa resistente (a estreptomycin y etambutol).

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La prevalencia de las resistencias a los fármacos anti-tuberculosos muestra marcadas diferencias geográficas y es un punto clave a la hora de decidir el tratamiento inicial de la infección por *M. tuberculosis*.

El 29,9% de los casos de tuberculosis de este estudio se dio en pacientes inmigrantes. Otros estudios en España han obtenido resultados diferentes, tanto mayores (50%) (5) como menores (21%) (6). Tales diferencias se deben, con toda probabilidad, a la diferente proporción de población inmigrante que encontramos en las distintas áreas geográficas de España. En Madrid, los países de origen más frecuentes son Ecuador, Rumanía y Colombia.

La media de edad de los pacientes inmigrantes fue significativamente menor que la de los pacientes autóctonos, tal y como se ha comunicado en otros estudios (5, 7), lo que igualmente refleja las diferencias que existen entre la población sana, ya que el fenómeno de la inmigración ha aumentado de forma reciente y afecta básicamente a sectores jóvenes de la población: niños y población trabajadora.

La proporción de cepas resistentes al menos a uno de los antituberculosos de primera línea fue superior a la encon-

Tabla 1. Porcentajes de resistencia a los antituberculosos probados en población autóctona e inmigrante.

Antibiótico	Población autóctona	Población inmigrante	p	RR
Estreptomycin	13,9%	24,3%	0,041	1,75
Isoniazida	3,5%	16,4%	0,001	4,68
Rifampicina	1,8%	4,5%	0,25	2,34
Etambutol	2,9%	4,2%	0,43	1,43
Pirazinamida	3,7%	4,5%	0,58	1,23

trada con anterioridad en Madrid por otros autores (8). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, prueba de χ^2) entre el grupo de pacientes inmigrantes y el de autóctonos. Así mismo, las diferencias fueron significativas, al estudiar cada uno de los antibióticos, en los casos de la estreptomycin y especialmente la isoniazida.

A propósito de la multirresistencia, la tendencia observada parece indicar una mayor frecuencia en los pacientes inmigrantes, pero posiblemente el número de casos no fue suficiente para demostrar diferencias estadísticas.

Por otra parte, aunque el número de pacientes VIH positivos no fue muy elevado, no se encontró relación con el porcentaje de resistencias y la tendencia en estos casos fue incluso la opuesta, mostrando una menor prevalencia de resistencias. Este resultado coincide también con otros estudios realizados previamente en España (9).

Aunque no se pudo determinar con exactitud la naturaleza de las resistencias, cabe pensar que en un elevado número de enfermos éstas fueron primarias, al no constar aislamientos previos de *M. tuberculosis* de estos casos en nuestro hospital.

El tiempo medio empleado por el sistema M960 fue ligeramente inferior al referido en otros estudios, tanto en el caso de la combinación SIRE como en el de la pirazinamida (4).

También debemos señalar el alto grado de resistencia global a la estreptomycin, mayor incluso que en otros trabajos realizados en países donde las resistencias a todos los demás antituberculosos son mayores (10). Otros estudios, sin embargo, han encontrado una resistencia aún mayor frente a este antibiótico (11).

En resumen, cabe destacar la elevada proporción de pacientes inmigrantes y la mayor frecuencia de aislamientos resistentes en ellos, con marcadas diferencias en el caso de la isoniazida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Dra. M^a Soledad Jiménez, del Centro Nacional de Microbiología, por el estudio de las cepas resistentes. Este trabajo ha sido parcialmente financiado con el FISS nº 030654.

BIBLIOGRAFÍA

1. La tuberculosis: Un problema de salud pública. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad y Servicios Sociales, Comunidad de Madrid 1999.
2. Kim, J.Y., Mukherjee, J.S., Rich, M.L., Mate, K., Bayona, J., Becerra, M.C. *From multidrug-resistant tuberculosis to DOTS expansion and beyond: Making the most of a paradigm shift*. Tuberculosis (Edimburgo) 2003; 83: 59-65.
3. Roberts, G.D., Goodman, N.L., Heifets, L. y cols. *Evaluation of the BACTEC radiometric method for the recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of M. tuberculosis from acid-fast smear positive specimens*. J Clin Microbiol 1983; 18: 689-696.
4. Macondo, E.A., Ba, F., Gaye-Diallo, A. y cols. *Rapid testing of Mycobacterium tuberculosis by the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, AST, SIRE)*. Clin Microbiol Infect Dis 2000; 6: 363-367.
5. Díez, F., Rogado, M., Álvarez, R., Delgado, M., Hidalgo, M.A., Salas, J. *Tuberculosis e inmigración en el poniente almeriense. Impacto en la incidencia y efectividad del tratamiento*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 20 (Supl. 1): 191.
6. Ramos, J.M., Masiá, M., Rodríguez, J.C., Padilla, I., Soler, M.J., Gutiérrez, F. *Tuberculosis en inmigrantes: Diferencias clinicoepidemiológicas con la población autóctona (1999-2002)*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22: 315-318.
7. Chirveches Pérez, E., Peleato Catalán, M.D., Caballero Díaz, M.S., Torné Chachor, J. *Enfermedad tuberculosa en inmigrantes de la comarca del Garraf*. Aten Primaria 2001; 28: 506-509.
8. Esteban, J., Granizo, J.J., Álvarez-Castillo, M.C., Soriano, F. *Drug resistance among Mycobacterium tuberculosis strains in immigrants: Is there a real threat everywhere?* Clin Microbiol Infect 2004; 10: 335-336.
9. Torres, L., Arazo, P., Blas Pérez, J. y cols. *Resistance of Mycobacterium tuberculosis in Zaragoza, Spain (1993-1997) and related factors*. Med Clin (Barc) 2000; 115: 605-609.
10. Liu, C.E., Chen, C.H., Hsiao, J.H., Young, T.G., Tsay, R.W., Fung, C.P. *Resistance of Mycobacterium tuberculosis complex in central Taiwan*. J Microbiol Immunol Infect 2004; 37: 295-300.
11. Kart, L., Altin, R., Tor, M. y cols. *Drug resistance patterns in two regions of Turkey: A retrospective analysis*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2002; 16: 6.