

**TRANSMISION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTE Y
SENSIBLE A LOS MEDICAMENTOS ENTRE CONTACTOS CONVIVIENTES
O CERCANOS**

Autores: Morcillo N S1, Belen Imperiale B R1, Di Giulio A B2, Zumárraga M J3,
Cataldi A A3

Hospital Dr. Antonio A. Cetrangolo, Vicente López, Buenos Aires, Argentina 2. Hospital
Petrona V. de Cordero, San Fernando, Buenos Aires, Argentina 3. Instituto Nacional
de Tecnología Agropecuaria (INTA) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Resumen

Propósito. Estimar la transmisión de *Mycobacterium tuberculosis*, especialmente resistentes a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF, MDR) entre familiares y contactos convivientes o cercanos. **Objetivos:** analizar la adaptación o *fitness* de las micobacterias durante la transmisión; establecer la relación entre perfiles de drogo-resistencia (D-RES), el *fingerprinting* de los aislamientos y las mutaciones asociadas a resistencia a las drogas; y diseñar cadenas probables de transmisión con elementos de la Epidemiología molecular y clásica.

Métodos. Se recolectaron datos epidemiológicos y clínicos de 169 pacientes y 688 contactos. Criterios de inclusión: a) identificación del caso de TB MDR; b) contactos del caso MDR; c); grupos de contactos convivientes y/o cercanos con ≥ 3 enfermos con TB sensible a los fármacos (D-SEN) o resistente no MDR (D-RES). De los aislamientos se recolectaron: sensibilidad a los fármacos, *fingerprinting*, y mutaciones relacionadas con la resistencia a las drogas. Los patrones de sensibilidad antibiótica a drogas de primera y segunda línea fueron determinados por el sistema BACTEC MGIT 960™ y el software Epicenter™. Los experimentos de *fitness* se realizaron determinando los siguientes parámetros de crecimiento: fase lag (t_0), tiempo exponencial y número de crecimiento (GN), tasa de crecimiento (TC) y *fitness* relativo (FR) calculado comparando el GN obtenido con el de la cepa de referencia.

Resultados. Un total de 124 casos (124/169, 73,4%) y 388 contactos convivientes/familiares (GRUPO) fueron finalmente incluidos en el estudio. Los valores de FR de aislamientos MDR cayeron en promedio 16,7% (14,0-17,0%) en comparación con valores hallados para aislados D-SEN. Con los aislamientos extensivamente resistentes (XDR) esa caída fue mayor: 27,5% (22,3-29,4%). Un total de 20 GRUPOs tuvieron como caso índice (CI) un TB MDR y generaron 26 (26/20, 1,3) casos secundarios (CS), 23 (1,2) de ellos M/XDR; 4 CS con una cepa D-RES y 2 D-SEN tuvieron idéntico aislamiento que el CI MDR que los originó presumiblemente antes de generarse la MDR durante el tratamiento. Los 16 casos D-

SEN produjeron 29 CS (29/16, 1,8) y los 3 CI D-RES originaron 2 CS (2/3, 0,7), Las diferencias en la generación de CS a partir de CI MDR o D-SEN no fue significativa (χ^2 : 0,923, P: 0,3366).

Conclusión. Los patrones genéticos y el estudio de contactos mostraron que la transmisión activa de TB M/XDR, fue similar a la ocurrida con aislamientos D-SEN (más de 1 caso secundario a partir de un CI). Los resultados sobre infecciosidad y transmisibilidad de TB M/XDR podrían contribuir con el diseño de actividades de control como la normatización del tratamiento de los contactos con TB latente. El concepto que considera caso MDR a los enfermos contactos con un CI MDR se demostró no siempre correcto, pudiendo conducir a error terapéutico ya que el esquema de segunda línea es más prolongado, caro y tóxico y menos eficaz que el que incluye INH y RIF. La resistencia a estas drogas debería ser siempre detectada *in vitro* como elemento fundamental del diagnóstico de MDR.

Palabras clave: Tuberculosis
Transmisión
Contactos convivientes

Introducción

Mycobacterium tuberculosis es un microorganismo cuyo único huésped es el ser humano. Posee una gran versatilidad metabólica con gran capacidad para adaptarse y sobrevivir en condiciones ambientales extremas o situaciones de estrés tales como la desecación, la hipoxia y la acción de ciertos fármacos que interfieren en distintas vías biosintéticas de la bacteria (1). Es un hecho que *M. tuberculosis* resistente a las drogas usadas en la terapia anti tuberculosis (anti-TB) puede afectar tanto a huéspedes inmunocompetentes como inmunocomprometidos si las condiciones ambientales son adecuadas y permiten su diseminación y el establecimiento de la enfermedad (2). Si bien fue descrito que el *M. tuberculosis* resistente por ejemplo a isoniacida mostraba menor virulencia, no se conoce adecuadamente la transmisibilidad entre humanos de cepas resistentes a varios antibióticos y frente a huéspedes con variados estados inmunológicos (2, 3). La pregunta que surge actualmente es la siguiente: ¿serán capaces esos microorganismos de expandirse y causar una nueva pandemia en el futuro con cepas resistentes a los antibióticos?, o sea reemplazando a la milenaria TB sensible a los fármacos que ocurre alrededor del mundo hasta hoy (4, 5). Diferentes aproximaciones pueden ser hechas para tratar de responder esa pregunta: las mejoras en las condiciones socio-económicas de las poblaciones más afectadas podrían contribuir a disminuir la TB y, por ende las formas de M/XDR; las mejoras en la calidad de los componentes de los Programas de Control de TB (PCTB); estudios de laboratorio que, combinados con la epidemiología clásica permitan incrementar el conocimiento acerca de la fisiología de la micobacteria y la relación entre el huésped y su patógeno (5, 6).

El concepto de “*fitness*” ha sido definido como la capacidad fisiológica de un microorganismo de sobrevivir, reproducirse y ser transmitido (7).

En las micobacterias la drogo-resistencia (D-RES) se genera por el mecanismo denominado de “mutación-selección” que establece que las mutaciones que confieren resistencia a una determinada droga se originan al azar, son irreversibles y

genéticamente localizadas ya que *M. tuberculosis* carece de plásmidos o elementos genéticos móviles que pudieran adquirir y transmitir la resistencia durante el tratamiento. El segundo momento en la adquisición de la resistencia ocurre cuando por presión antibiótica mueren todos los microorganismos sensibles a la droga en cuestión subsistiendo sólo las bacterias resistentes al mismo, o sea hasta que el cambio en la composición de la población bacteriana dentro del paciente se ha completado (4, 5).

Las mutaciones en el genoma de *M. tuberculosis* que conducen a un perfil de resistencia a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF) y que denominamos multidrogo-resistente (TB MDR) pueden influenciar la virulencia y la transmisibilidad de estas micobacterias. En estos casos el pronóstico con respecto al resultado del tratamiento es incierto y muchas veces relacionado con un probable fracaso terapéutico (8). La situación va empeorando, si no es detectada rápida y adecuadamente, a medida que las bacterias adquieren resistencia a más drogas tal como ocurre con la forma denominada TB XDR o extensivamente resistente, la cual por definición está causada por una bacteria MDR que además presenta resistencia comprobada *in vitro* a una fluoroquinolona y un agente inyectable de segunda línea (kanamicina, amicacina, capreomicina) (9, 10). Por lo expuesto, la TB M/XDR representa un problema de salud importante a ser tenido en cuenta por las autoridades sanitarias y los PCTB, especialmente si no se conoce, aunque sea estimativamente, su grado de transmisión en la comunidad.

La tasa de crecimiento *in vitro* de la bacteria es comúnmente usada para experimentos en los cuales pueda ser estimado el *fitness* de esos organismos a distintas condiciones ambientales como la resistencia a un antibiótico en el medio de cultivo (10). La determinación del *fitness* puede entonces contribuir al esclarecimiento de la virulencia y al entendimiento de la capacidad del patógeno para ser transmitido en la comunidad. Variaciones en *fitness* pueden ser usadas como indicadores para estudiar la transmisibilidad de TB M/XDR entre contactos convivientes.

El propósito de este estudio ha sido evaluar la transmisión de TB M/XDR entre familiares y contactos convivientes o cercanos como una estimación de la transmisión en la comunidad de estos microorganismos.

Los objetivos específicos fueron: detectar los casos de TB entre los miembros o contactos convivientes de un caso inicial; caracterizar esas micobacterias analizando sus patrones genéticos y de drogo-resistencia; determinar la diferencia entre parámetros de crecimiento de aislamientos de TB M/XDR; identificar la mutación o mutaciones responsables de esa resistencia; estimar el *fitness* reproductivo de los aislamientos como una medida de su potencial transmisibilidad; comparar la transmisibilidad de los organismos M/XDR con la de aquellos sensibles a los agentes anti-TB; diseñar retrospectivamente, cadenas de transmisión probables dentro de cada grupo de contactos.

Materiales

Pacientes y aislamientos clínicos. En el período 2001-2012 fueron diagnosticados 4.376 casos de TB en el Hospital Dr. A. Cetrángolo de residentes del conurbano norte en su mayoría. Los criterios de selección para el presente estudio fueron los siguientes:

- a) Datos epidemiológicos: identificación del grupo familiar, o contacto conviviente o cercano; edad, género
- b) Datos clínicos: localización de la enfermedad; estado VIH; historia de tratamiento previo
- c) Datos bacteriológicos: resultados del examen directo; identificación del microorganismo como perteneciente al Complejo *M. tuberculosis*; patrón de resistencia a drogas de primera y segunda línea; patrón genético o *fingerprinting* de cada aislamiento
- d) Identificación de por lo menos un miembro del grupo de contactos con TB M/XDR; contactos convivientes/familias con más de 3 miembros afectados con TB sensible a los fármacos (D-SEN) o TB resistente a uno o más antibióticos excepto M/XDR (D-RES)

Para los experimentos microbiológicos fueron empleadas como controles las cepas sensibles a los agentes anti-TB de referencia H37Rv ATCC 27294 y *M. bovis* AN5.

Los documentos fuente revisados para la recolección de los datos fueron las historias clínicas de los Hospitales Cordero y Cetrángolo y las encuestas sociales realizadas bajo normas del PCTB (9, 10, 11).

Definición de términos

Caso índice (CI) o primario: el primer paciente de un grupo de contactos en ser diagnosticado (12). A los efectos de proponer una presunta cadena de transmisión entre los contactos de un mismo grupo, el año del diagnóstico, los perfiles genéticos y de drogo-resistencia, y el *fitness* relativo fueron considerados.

Fingerprinting: patrones moleculares obtenidos del genoma de la micobacteria y que define el aislamiento como individual.

Caso secundario (CS): todos los casos con idéntico aislamiento al del CI. Originados en fecha posterior y presuntamente a partir de éste.

Cluster: agrupaciones de dos o más aislamientos con patrones genéticos de *spoligotyping* y RFLP IS6110 idénticos.

Métodos

- a) Los pacientes fueron diagnosticados siguiendo las normas establecidas por el PCTB empleando el examen clínico, la radiografía de tórax, la búsqueda microbiológica de las micobacterias por examen directo y cultivo en los sintomáticos respiratorios (9). Los cultivos fueron realizados en medios sólidos de Lowenstein-Jensen y Stonebrink y en sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Argentina) (13, 14, 15).
- b) La sensibilidad bacteriana a los fármacos de primera línea fue realizada empleando el método de las proporciones en medio de Lowenstein-Jensen o el SIRE kit MGIT 960 siguiendo las instrucciones del fabricante (16).
- c) La sensibilidad a drogas de segunda línea fue realizada empleando el sistema MGIT 960 y el software TB*Exist*® o bien utilizando el micrométodo colorimétrico con colorante vital (MMC). Este método MMC fue utilizado también para determinar el nivel de resistencia a INH y RIF (17, 18, 19, 20).
- d) La identificación de la especie bacteriana fue realizada por medio de pruebas bioquímicas o la técnica molecular, casera *spoligotyping* (9, 21, 22).
- e) Las pruebas moleculares para obtener el *fingerprinting* de las micobacterias estudiadas fueron las siguientes: el IS*6110* RFLP (análisis de la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción 6110) y el *spoligotyping* (21, 22).
- f) Mutaciones presentes en los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* de *M. tuberculosis* fueron analizados por medio de una PCR múltiple alelo específica (MAS-PCR) realizada en forma casera. Cuando fue imposible detectar la mutación por este sistema se recurrió a la secuenciación (22).
- g) Experimentos para calcular el *fitness*: las cepas almacenadas de *M. tuberculosis* fueron sub-cultivadas en medios sólidos durante 20 días. Al cabo de ese tiempo se prepararon suspensiones (A) en 2,0 mL de medio líquido de cultivo. A partir de esta suspensión A fueron preparadas otras con una turbidez semejante al patrón 1 Mc

Farland en agua destilada estéril (B) conteniendo aproximadamente 10^6 - 10^8 bacilos/mL (UFC/mL). A fin de separar los bacilos que se agrupan naturalmente en medio líquido o agua, la suspensión B fue homogeneizada por el pasaje a través de una aguja tipo 21GX1. La suspensión final (C) se obtuvo diluyendo B 1:500 en agua destilada. Un total de 500.0 μ L de C (conteniendo aproximadamente 10^5 UFC/mL) fue inoculada en el sistema MGIT 960 por duplicado. Los tubos se incubaron automáticamente y se recolectó la información acerca del crecimiento cuando éste fue ≥ 200 UC y luego de la señal positiva del instrumento (23).

Métodos estadísticos

a) Los datos epidemiológicos, clínicos y microbiológicos fueron analizados empleando el software Excel version 7.0 y MedCalc 12.7 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Los resultados fueron analizados extrayendo la estadística descriptiva y realizando el análisis de las diferencias por ANOVA o el test exacto de Fischer. Análisis multivariados fueron realizados para explorar asociaciones entre las variables relevadas.

b) El análisis de los patrones moleculares de los aislamientos fue realizado empleando el software BioNumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

c) Para el cálculo de *fitness* se utilizaron los registros de crecimiento obtenidos con el software EpiCenter™ que forma parte del sistema MGIT 960. Fueron recolectadas las siguientes variables: fase lag de crecimiento (t_0 , horas), tiempo (horas) para alcanzar las 200 unidades de crecimiento (UC), la tasa de crecimiento (TC), y el número de crecimiento (GN). El *fitness* relativo (FR) fue definido como la relación expresada por la siguiente fórmula: GN_{MX} / GN_{H37Rv} , donde GN MX es el número de crecimiento de la cepa en estudio en relación con el GN de la cepa de referencia H37Rv. Con los aislamientos de *M. bovis* la fórmula aplicada fue la siguiente: GN_{MX} / GN_{AN5} (23, 24).

Resultados

Un total de 124 casos (124/169, 73,4%) y 388 contactos convivientes/familiares (GRUPOS) fueron finalmente incluidos en el estudio. De los 45 casos restantes y/o sus contactos no se obtuvieron datos completos, razón por la que fueron excluidos del análisis final. Los 124 casos correspondieron a 39 GRUPOS que en algunos casos también incluyó vecinos en estrecha relación cotidiana. La edad media fue de 30,7 años (intervalo: <1,0-60,0 años). Los pacientes, aislamientos y GRUPOS incluidos se muestran en la **Tabla 1**. Los estudios de epidemiología molecular mostraron que todos los casos de TB M/XDR estuvieron agrupados en *clusters*.

Como puede observarse en la **Tabla 2**, en los aislamientos MDR se verificó una caída promedio del 16,7% (14,0-17,0%) en los valores de FR en comparación con los valores hallados para los aislados sensibles a todos los agentes anti-TB. Con los aislamientos XDR esa caída fue aún mayor: 27,5% (22,3-29,4%). Las diferencias observadas en ambos casos con respecto a los aislamientos D-SEN fue significativa ($p < 0.0001$). Comparativamente también, los desvíos estándar (DS) para la distribución de los valores del FR para las cepas MDR y XDR se incrementó un 45.0% y 64.2% respectivamente. Estas diferencias fueron también significativas (F: 3.3401, $p: 0.001$, and F: 7.8014, $p: 0.003$) (**Tabla 2**).

Los resultados de la fase lag, o t_0 , fueron también analizados. Los valores medios de t_0 para las cepas M/XDR se incrementaron un 32.0% en relación con los t_0 obtenidos para las cepas D-SEN y los controles ($t: 5.204$, $p < 0.0001$). Sin embargo las diferencias entre las medias de los primeros con los segundos no fue significativa ($p: 0.9798$). El DS obtenido para la distribución de t_0 para TB M/XDR mostró un incremento de 41,6%, siendo significativa la diferencia con las cepas D-SEN (F: 2.9317, $p: 0.012$).

La tasa de crecimiento hasta alcanzar las 200 unidades de crecimiento o TC, fue calculada teniendo en cuenta el patrón de resistencia de los aislamientos. La media de la TC fue (en horas): para MDR, 29,0; XDR, 32,3; D-RES, 24,6; D-SEN, 21,9. La TC

de M/XDR se incrementó entre 32,3 y 17,9% comparando los valores para D-SEN y D-RES respectivamente (Tabla 2). Las diferencias entre las TC medias de M/XDR con D-SEN fueron estadísticamente significativas (F: 4.778, $p < 0.0001$ and t: 5.167, $p < 0.0001$, respectivamente).

La comparación entre los DS obtenidos para las distribuciones de FR, t_0 , y TC fueron ≥ 1.8 , ≥ 1.7 , y ≥ 2.5 veces para TB M/XDR que para las cepas D-SEN.

En un GRUPO formado por 2 pacientes la enfermedad estuvo causada por *M. bovis* MDR. La transmisión fue verificada y ocurrió desde uno de los casos que adquirió la MDR durante el tratamiento e infectó a su conviviente que desarrolló la enfermedad y fue diagnosticado 3 años más tarde.

La **Tabla 3** muestra la composición de cada uno de los GRUPOS de acuerdo con el número de miembros, la resistencia bacteriana de los aislamientos causantes de la enfermedad en cada caso y en aquellos considerados CI. Es posible observar que 6 GRUPOS presentaron una composición mixta con respecto a los patrones genéticos de los aislamientos que muestran claramente que no todos los miembros estaban enfermos con el mismo microorganismo.

La generación de casos secundarios propuesta y asignada a cada CI fue realizada teniendo en cuenta el momento del diagnóstico bacteriológico, la edad, en el caso de los niños, y las características de crecimiento de las bacterias representadas por los parámetros t_0 , TC y FR.

Un total de 20 GRUPOS tuvieron un CI con TB MDR los cuales generaron 26 (26/20, 1,3) CS, 23 (1,2) de ellos M/XDR. Cuatro CS con una cepa D-RES y 2 D-SEN tuvieron idéntico aislamiento que el CI MDR que los originó presumiblemente antes de generarse la MDR en estos pacientes durante el tratamiento. Los 16 casos D-SEN produjeron 29 CS (29/16, 1,8) y los 3 CI D-RES originaron 2 CS (2/3, 0,7), Las diferencias en la generación de CS a partir de CI MDR o D-SEN no fue significativa (χ^2 : 0.923, P: 0.3366).

La **Tabla 5** muestra ejemplos de cadenas de transmisión propuestas que generaron la composición de los GRUPOS mostrados. Particularmente el GRUPO V compuesto por 5

personas presentó un aislamiento MDR caracterizado por su *fingerprinting* particular, una mutación doble relacionada con la resistencia a RIF (*rpoB*513-565) y un valor de FR < 60.0%. Esta cepa no fue transmitida exitosamente entre su GRUPO siendo diseminada entre los otros 4 miembros del mismo un microorganismo D-SEN de la comunidad cuyo FR era $\approx 100\%$.

Otro ejemplo observable en la **Tabla 5** es la cepa XDR que formó parte de un brote de MDR que involucró a un trabajador de la salud del GRUPO XII. La cepa XDR (B_1 , FR: 76%) se transmitió a un niño cuyo aislamiento (E_1 , FR: 66%) no fue hallado posteriormente entre los otros miembros del GRP.

El análisis multivariado para la exploración de asociaciones entre el FR y las variables siguientes: mutaciones en el gen *rpoB* en las posiciones 526 y 531, la duración de t_0 , y los niveles de resistencia hallados para INH y RIF, mostró un coeficiente de correlación de 0,88, siendo sólo las mutaciones en *rpoB* 531 (p : 0.0222) las levemente asociadas con una caída en el FR. Mutaciones en el gen *katG* 315 y en la región promotora (-15) del gen *inhA* estuvieron relacionadas con altos y bajos niveles de resistencia a las drogas ensayadas respectivamente, pero no asociadas a la caída de los FR.

Discusión

La TB M/XDR plantea un serio problema tanto a nivel clínico como de salud pública ya que la transmisión de estas micobacterias a distintos huéspedes es verificable y comprobable desde el punto de vista microbiológico además del epidemiológico.

Desde la aparición de la TB MDR las cifras han ido incrementándose lentamente pero el interrogante si el éxito de su diseminación depende sólo de las características del huésped o de la micobacteria o de ambos si bien es comprobable en algunos casos, permanece y es difícil de predecir.

Este estudio fue diseñado con la finalidad de explorar individualmente las cepas de *M. tuberculosis*, estimar su diseminación dentro del grupo de contactos cercanos del paciente considerado como CI, observando el comportamiento bacteriano a partir de la medición *in vitro* de parámetros de crecimiento de un mismo microorganismo aislado durante el pasaje de un huésped a otro como una posible explicación a la ausencia de transmisión ocurrida en algunos casos.

Con respecto a la pregunta realizada inicialmente sobre la posibilidad de que una nueva TB resistente a los fármacos reemplace a la actualmente sensible que afecta la gran mayoría de seres humanos con esta enfermedad, seguramente podrá ser completamente respondida en el futuro pero, el intento de este trabajo de describir la transmisión entre contactos convivientes y cercanos muestra que el desbalance del equilibrio depende de cuan esmeradamente se diagnostiquen y se traten estos casos y todos los casos de TB.

La mayoría de las bacterias de los casos del mismo GRUPO pertenecían a un sólo *cluster* o sea eran aislamientos idénticos definidos por los patrones moleculares hallados. Sin embargo los GRUPOS compuestos en su mayoría por casos de TB M/XDR tenían por lo menos un miembro enfermo con una bacteria D-SEN, presumiblemente adquirida por contagio en la comunidad.

Este estudio tiene como principales limitantes haber incluido a los pacientes intentando captar la mayoría de las veces al CI con TB MDR y de restringirse a

investigar TB en los contactos que hemos denominado GRUPO. Teniendo en cuenta estas limitaciones, fue posible observar que cuando los aislamientos D-RES o D-SEN mostraban un FR >85% la cepa se diseminaba exitosamente entre los miembros del GRUPO, en cambio cuando los valores de FR eran $\leq 75\%$ la cepa no volvía a hallarse como responsable de casos de TB, ocupando su lugar en la transmisión organismos de la comunidad definidos por sus *fingerprintings* y generalmente D-SEN. Además, cuando los valores de FR oscilaban entre 80-90% en general las cepas lograban transmitirse exitosamente sólo de un miembro a otro del GRUPO estudiado. Estos hechos fueron utilizados en conjunto con los datos epidemiológicos para estimar las cadenas de transmisión que se muestran, como algunos ejemplos, en la **Tabla 5** ya que podría explicarse de esta forma por qué algunos aislamientos MDR pudieron ser transmitidos de un miembro a otro del GRUPO mientras que en algunos casos esta transmisión se interrumpió. Estos hechos además darían lugar a establecer la hipótesis siguiente: cuando una bacteria especialmente D-RES se disemina de un huésped, a otro por alguna razón como factores intrínsecos del huésped entre otros, perdería gradualmente su capacidad de adaptación al medio ambiente.

Por otra parte el análisis multivariado mostró que sólo las mutaciones más frecuentemente halladas en el gen *rpoB* mostraron una débil asociación con valores disminuidos de FR. Este hallazgo difiere de otros publicados previamente (5) si bien el presente estudio focalizó sobre la transmisión entre un grupo que podríamos considerar cerrado de contactos. Bacterias D-RES con esas mutaciones se presentan en el ambiente con ventajas y desventajas. La ventaja sería la capacidad incrementada de subsistir en presencia del antibiótico al cual es resistente, a diferencia de los organismos sensibles que terminarían muriendo por la acción del mismo. La desventaja se manifiesta por la disfunción de las rutas metabólicas que se encuentran alteradas a nivel molecular como consecuencia de las mutaciones que las afectan. Esto último obliga a las bacterias a buscar rutas biosintéticas alternativas para poder sobrevivir, las cuales muchas veces pueden no resultar tan eficaces como lo eran las originales previamente a las mutaciones. Este hecho podría ser evidenciado

in vitro con una pérdida, también gradual a medida que progresan los aislamientos de diferentes huéspedes, de los parámetros de crecimiento medibles como el FR. Esto originaría que, en determinado momento la cepa D-RES se encontrara en condiciones de competencia desfavorables para establecer la infección especialmente frente a organismos D-SEN de la comunidad. El producto final sería entonces una especie de autolimitación de la transmisión.

El análisis de los patrones genéticos confirmó la transmisión de persona a persona de *M. bovis* MDR. Además los patrones genéticos hallados están en concordancia con lo publicado previamente en Argentina y otros países, como los predominantemente circulantes (25, 26, 27). Pero a diferencia de otras regiones, el linaje Beijing no fue encontrado en este estudio y lo es raramente en Argentina (25, 28, 29)

Conclusiones

Teniendo en cuenta los patrones genéticos hallados y el estudio de contactos realizado, se observó que la transmisión activa entre contactos convivientes y/o cercanos de TB M/XDR a otra persona sin antecedentes de tratamiento, fue similar a la ocurrida con aislamientos D-SEN: más de un CS originado a partir de un CI. Por errores en el tratamiento, los bacilos D-SEN devienen resistentes a una o más drogas del esquema terapéutico empleado. Esto explica la aparición de casos D-RES o MDR a partir de aislamientos D-SEN en el huésped considerado CI. Por otra parte, las cifras sobre transmisión encontradas en este estudio son compatibles con otros realizados en la Argentina que muestran que la tendencia en las incidencias de TB sensible y TB M/XDR en casos nuevos se mantiene prácticamente estable a lo largo de las últimas décadas (30, 31). Es sin embargo importante remarcar que si bien todos los casos M/XDR se mostraron agrupados en diferentes *clusters*, o sea eran una única cepa micobacteriana, no todos los casos M/XDR produjeron casos secundarios. La caída del FR a valores inferiores aproximadamente al 75% podría estar indicando una limitación en la transmisión de esa micobacteria.

Los resultados sobre infecciosidad y transmisibilidad de los aislamientos M/XDR demostrados en este estudio, podrían contribuir con el diseño de actividades desde el PCTB como ser el abordaje del tratamiento de la TB latente en forma normatizada entre los contactos convivientes y/o cercanos. Otro punto importante sería revisar el concepto médico que considera caso MDR a los contactos enfermos en relación con un CI MDR. Esto puede llevar a un error terapéutico muy grande ya que el esquema incorporando medicamentos de segunda línea resulta más prolongado, caro y tóxico y es menos eficaz que el que incluye INH y RIF. Por lo tanto la resistencia a estas dos drogas debería ser siempre detectada *in vitro* como elemento fundamental del diagnóstico de MDR.

Agradecimientos. Deseamos agradecer a Marcelo Mazza y Guillermo Alonso por su asistencia técnica. Este trabajo fue parcialmente financiado por la Comisión Europea Proyecto N°: 201690. BI es becaria post-doctoral de CONICET; y AC es investigador de CONICET

Bibliografía

1. Cook G M, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox R, Danilchanka O, Niederweis M. Physiology of Mycobacteria. Elsevier 2009; 55: 81-82.
2. Shenoï S V, Escombe R A, Friedland G. Transmission of Drug-Susceptible and Drug-Resistant Tuberculosis and the Critical Importance of Airborne Infection Control in the Era of HIV Infection and Highly Active Antiretroviral Therapy Rollouts. Clin Infect Dis 2010; 50 (Supplement 3) S231-S237.
3. Caminero Luna J A. Resistencia de *M. tuberculosis* a fármacos antituberculosos. En: Guía de la Tuberculosis para médicos especialistas. Capítulo 11. Ed. Unión Internación Contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias (UICTER), París, Francia, 2003; 217-228
4. Andersson D I, Lavin I R. The biological cost of antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 489-93
5. Borrell S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; 13: 1456-66.
6. Chian C Y; van Deun A; Trèbucq A; Heldal E; Caminero A; Ait-Kaled N. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis: definition of the outcome failure. Int J Tuberc Lung Dis 2011; 15: 4-5.
7. Orr H A. Fitness and its role in evolutionary genetics. Nat Rev Genet. 2009; 10: 531-539.
8. WHO Report XDR: WHO Progress Report. Towards universal access to diagnostic and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015. World Health Organization 2011; pp: 8.
9. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Normas técnicas. Ministerio de Salud de la República Argentina y Programa de Vigilancia de la Salud y Control e Enfermedades (VIGI+A), 2001
10. Pope C F, McHugh T D, Gillespie S. In: Antibiotic resistance protocols. Methods in Molecular Biology. Chapter 9: Methods to determine fitness in bacteria. Eds:

Gillespie S and McHugh T D, 2nd edition. Springer Science+Business Media, LLC 2010, 642: 113-121

11. Verhagen L, van der Hof S, van Deutekom H et al. Mycobacterial factors relevant for transmission of tuberculosis. JID 2011; 203: 1249-1255

12. Emerging & Re-emerging infectious Diseases. National Institutes of Health. Glosary.

<http://science.education.nih.gov/supplements/nih1/diseases/other/glossary/act1-gloss3.htm>. Retrieved: 05/04/2011

13. International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Technical Guide.2000. Sputum Examination for Tuberculosis by Direct Microscopy in Low Income Countries. Fifth Edition.

14. Morcillo N., Imperiale B., Palomino J. C. New Simple Decontamination Method Improves Microscopic Detection and Culture of Mycobacteria in Clinical Practice. 2008. Infection and Drug Resistance 1: 21–26.

15. Hanna B, Ebrahimzadeh A, Elliott B, et al. Multicenter evaluation of the Bactec MGIT 960 system for the recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1999; 748-752.

16. Heifets L B. Drug susceptibility tests in the management of chemotherapy of tuberculosis. In: Heifets L B Ed, Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. Boca Raton, CRC Press. 1991: 89-121.

17. Bemer P, Palikova F, Rush-Gerdes S, Drugeon H B, Pfyffer G E. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 150-154.

18. Martin A, Portaels F, Palomino J C. Colorimetric-redox indicator methods for the rapid detection of multidrug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. JAC 2006; 59: 175-183

19. Morcillo N, Imperiale B, Di Giulio B. Evaluation of MGIT 960® and the colorimetric-based method for tuberculosis drug-susceptibility testing. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010; 14: 1169-1175.
20. Martin A; Paasch F; Docx S et al. Multicentre laboratory validation of the colorimetric redox indicator (CRI) assay for the rapid detection of extensively drug-resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2011. Published online 2011-01-19
21. Van Embden, J D A, Cave M D, Crawford J T et al. Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409
22. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R et al. Comparison of methods based on different epidemiological markers for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607-2618
23. Imperiale B, Cataldi A, Morcillo N. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific PCR. 2010. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 496-501
24. Toungassova O, Caugant D, Sandvent P, Mariandyshev A O, Bjune G. Impact of drug resistance on fitness of *M. tuberculosis* strains of the W-Beijing genotype. *Immunol and Medical Microbiol* 2004; 281-290
25. Gillespie S H, Billington O, Breathnach A, McHugh T. Multiple drug-resistant *M. tuberculosis* evidence for changing fitness following passage through human hosts.
26. Gonzalo X, Ambroggi M, Cordova E, Brown T, Poggi S, Drobniowski F. Molecular epidemiology of *M. tuberculosis*, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* Volume 17, Number 3–March 2011 <http://www.cdc.gov/EID/content/17/3/528.htm> RFLP en Argentina
27. Brudey K, Filliol I, Ferdinand S et al. Long-term population-based genotyping study of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in the French Departments of the Americas. *J Clin Microbiol.* 2006;44:183–91

28. Durmaz R, Zozio T, Gunal S et al. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions in Turkey. *Infect Genet Evol.* 2007;7:513-9
29. Morcillo N, Di Giulio B, Chirico C et al. First description of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Argentina. *Rev Arg Microbiol* 2005; 37: 92-95
30. Morcillo N., Imperiale B., Corral J. Paediatric tuberculosis, MDR-TB and XDR-TB in Buenos Aires Province during the period 2002-2007. 2009. *Rev Am Respir Med.* 2009; 9: 5-13
31. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias E. Coni. El control de la TBC en Argentina: Situación Actual y perspectivas. Ministerio de Salud. Santa Fe, Argentina, 2008

Tabla 1. Características de los pacientes y los aislamientos incluidos en el estudio

Características pacientes/aislamientos	N° (%)
Pacientes TB	
Edad promedio: 30,7 años (1.00-60,0)	124 (100.0)
Grupos de contactos convivientes/familias	39 (100.0)
Mujeres	58 (46,8)
Co-infectados con el HIV	23 (18,5)
TB pulmonar	112 (90,3)
Historia de tratamiento previo	37 (29,3)
Contactos estudiados	388 (media 3,7)
	Intervalo/caso de TB: 2-6
Aislamientos patrón de sensibilidad	N° (%)
Total	168 (100)
DR	28 (16,6)*
MDR	74 (44,1)*
XDR	4 (2,3)
MTS	62 (37,0)*

*: Más de un aislamiento por paciente incluido

Tabla 2. *Fitness* relativo y distribuciones de fase lag y tasas de crecimiento obtenidas para los aislamientos clínicos estudiados en relación con los patrones de sensibilidad antibiótica hallados

Patrón de Resistencia	FR		T ₀ (horas)		TC (horas)	
	Media ± DS (intervalo)	IC 95%	Media ± DS (intervalo)	IC 95%	Media ± DS (intervalo)	IC 95%
D-SEN	0,98±0.58 (0,87-1,17)	0,94-1.00	116,7±32,9 (64,0-198,0)	105,4-127,8	21,5±2,65 (17,0-22,9)	17,0-25,9
D-RES	1,04±0,07 (0,93-1,14)	0,98-1,09	117,7±39,0 (64,0-197,0)	155,5-191,4	24,5±2,77 (20,2-24,7)	13,8-27,2
MDR	0,85±0,11 (0,44-0,96)	0,84-0,86	173,4±54,6 (97,0-283,0)	155,5-191,4	29,0±6,79 (23,5-53,1)	26,8-32,0
XDR	0,74±0,16 (0.63-0.86)	0,58-0,88	166,7±56,3 (153,0-194,0)	107,8-255,5	32,3±7,07 (27,3-37,3)	25,8-33,5

Tabla 3. Composición de los grupos de contactos y generación de casos secundarios en relación con los casos índices propuestos

Grupo N°	Total CI			Total CS			Caso causado por diferente cepa	Total Casos
	MDR	D-SEN	D-RES	M/XDR	D-SEN	D-RES		
I	1	0	0	3	0	0	1	5
II	1	0	0	0	0	1	0	2
III	1	0	0	2	0	0	0	3
IV	1	0	0	0	0	1	0	2
V	1	0	0	0	4 ²	0	1 ²	5
VI	0	1	0	0	1	3	0	5
VII	1	0	0	0	1	0	0	2
VIII	1	0	0	1	0	0	0	2
IX	0	1	0	0	2	0	0	3
X	0	1	0	0	2	1	0	4
XI	1	0	0	0	0	0	1	2
XII	1	0	0	4 ³	0	0	0	5
XIII	1	0	0	1	0	0	0	2
XIV	0	0	1	0	2	1	0	4
XV	0	1	0	0	2	0	0	3
XVI	1	0	0	0	0	0	1	2
XVII	0	1	0	0	11	3	0	15
XVIII	0	1	0	0	1	0	0	2
XIX	0	1	0	0	3	0	0	4
XX	1	0	0	2	0	0	1	4
XXI	0	1	0	1	0	1	0	2
XXII	0	1	0	0	1	0	0	2
XXIII	1	0	0	1	0	0	0	2
XXIV	1	0	0	2	0	0	0	3
XXV	1	0	0	1 ¹	0	0	0	2
XXVI	0	0	1	0	0	1	0	2
XXVII	1	0	0	0	1	0	0	2
XXVIII	0	1	0	0	0	2	0	3
XXIX	0	1	0	0	2	0	0	3
XXX	0	1	0	0	2	0	0	3
XXXI	0	1	0	0	1	0	0	2
XXXII	0	1	0	2	0	0	0	3
XXXIII	0	0	1	1	0	0	1	3
XXXIV	0	1	0	1	0	0	0	2
XXXV	1	0	0	1	0	0	0	2
XXXVI	1	0	0	1	0	1	0	3
XXXVII	0	1	0	1	0	0	0	2
XXXVIII	1	0	0	1	0	0	0	2
XXXIX	1	0	0	1	0	1	0	3
Total	20	16	3	27	36	16	6	124

D-SEN: aislamientos sensibles a los agentes anti-TB; MDR: multidrogo-resistentes; D-RES: aislamientos resistentes a uno o más fármacos pero no MDR; 1 y 3: número de casos XDR generados en cada grupo; 2: casos infectados a partir de una cepa sensible del mismo GUPO V donde había un caso MDR

Tabla 4. Generación de casos secundarios a partir de los presuntos casos índice

Patrón de drogo-resistencia		Casos secundarios N°			
	CI N°	MDR	D-RES	D-SEN	Total
MDR	13	23			36
	4		4		8
	3			6	9
D-RES					
	1	1			2
	2		2		4
D-SEN					
	4	5			9
	1		10		11
	11			28	39
O Ais					6
Total	39	29	16	34	124

D-SEN: aislamientos sensibles a los agentes anti-TB; MDR: multidrogo-resistentes; D-RES: aislamientos resistentes a uno o más fármacos pero no MDR; CI: caso índice; O Ais: aislamiento diferente del CI

Tabla 5. Cadenas de transmisión postuladas para varios grupos de contactos convivientes/familias y contactos cercanos

GRUPO ID	Casos TB	Aislamientos por paciente					Cadena de transmisión propuesta					
		Patrón de resistencia			Parámetros de crecimiento							
Nº	Nº	MDR	D-RES	D-SEN			A	B	C	D	E	
I	5	A, B, C, E	-	D		FR	0.96	0.83	0.74	1.00	0.82	
						t ₀	135	163	134	97	116	
						TC	34.3	56.8	28.8	26.4	35.8	
II	2	A*	A B	-		FR	0.96 0.99*	0.71	-	-	-	
						t ₀	135 111*	235	-	-	-	
						TC	34.4 17.3	34.4	-	-	-	
III	3	A, B, C	-	-		FR	0.97	0.86	0.50	-	-	
						t ₀	163	228	432	-	-	
						TC	36.7	52.4	59.6	-	-	
IV	2	A	B	-		FR	0.90	0.98	-	-	-	
						t ₀	206	0.97	-	-	-	
						TC	52.2	35.5	-	-	-	

V	5	B	-	A, C, D, E	FR	1.00	0.93	1.00	0.99	1.00	
					t₀	138	123	169	168	168	
					TC	30.4	22.2	32.5	33.2	33.4	
VI	5	-	B, C, E	A, D	FR	0.97	0.96	0.94	0.96	0.98	
					t₀	135	135	138	168	174	
					TC	24.3	24.5	25.0	24.5	24.0	
VII	2	A	-	B	FR	0.87	0.98	-	-	-	
					t₀	188	125	-	-	-	
					TC	30.4	15.8	-	-	-	
VIII	2	A**, B	-	A	FR	0.98	0.75	-	-	-	
					t₀	135	199	-	-	-	
					TC	23.5	25.8	-	-	-	
XII	5	A, B (B ₁), C, D, E ₁	-	-	FR	0.94	0.94	0.98	0.76	0.66	
					t₀	194	194	153	162	158	
					TC	25.0	25.0	26.8	26.7	26.3	

*: Paciente A GRUPO II: las cepas se convirtieron en MDR durante el tratamiento, al momento del diagnostico solo era resistente a INH y este aislamiento se transmitió al paciente B; **: Paciente del GRUPO VIII: la cepa adquirió resistencia a INH durante el tratamiento. El aislamiento fue transmitido al paciente B Family VIII; GRUPO XII: B (B₁): el aislamiento MDR isolate (B) se convirtió en XDR (B₁) durante el tratamiento; E₁: XDR aislamiento transmitido desde B₁