

RESISTENCIA A LA HIDRACIDA DEL ACIDO ISONICOTINICO ADQUIRIDA POR EL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN EL MEDIO DE LOWENSTEIN MODIFICADO

POR EL DR ALFREDO QUIROZ

Jefe encargado del Laboratorio Central de Diagnóstico Bacteriológico de Tuberculosis del Instituto Nacional de Higiene "Leopoldo Izquieta Pérez" de Guayaquil, Ecuador

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo versa sobre un estudio bacteriológico hecho para determinar la frecuencia y la intensidad del fenómeno de la resistencia adquirida por varias cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de los materiales tuberculosos enviados al Laboratorio Central de Diagnóstico Bacteriológico de Tuberculosis del Instituto Nacional de Higiene "Leopoldo Izquieta Pérez," de Guayaquil, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales empleados y su procedencia

Este trabajo constituye el resumen de 323 pruebas de sensibilidad verificadas con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de 241 pacientes tuberculosos bajo tratamiento con isoniacida. La calidad de los materiales empleados es diferente, como se puede apreciar a continuación:

Espustos.....	234
Lavado gástrico.....	79
Líquido pleural.....	2
Lavado bronquial.....	2
Heces.....	2
Orinas.....	1
Líquido de punción ganglionar.....	1
Piezas de autopsia.....	2
	—
Total.....	323

Las muestras proceden de los diferentes servicios de la Liga Ecuatoriana Antituberculosa (LEA), de Guayaquil y de otros lugares del país, así como también de consultorios médicos privados, como se muestra a continuación:

Hospital "Alfredo J. Valenzuela".....	180
Dispensario "Arosemena".....	70
Sanatorio "Calixto Romero".....	32
Dispensario "Mata Martínez".....	11
Laboratorio de Patología de LEA.....	2
Dispensarios rurales y consultorios privados.....	28
	—
	323

Manuscrito recibido el 29 de julio de 1954.

Método empleado en la prueba de sensibilidad

El método seguido en esta prueba es el del subcultivo, que consiste en aislar en un cultivo primario los gérmenes presentes en las muestras cuya sensibilidad a un determinado agente quimioterápico se desea investigar. Luego, a partir de estas colonias, se prepara una suspensión bacteriana triturando unas colonias en solución salina y sembrando en una serie de tubos con diferentes concentraciones de la droga y en un tubo control sin droga. Se eligió este método por cuanto es aplicable tanto a las muestras de esputos de alto contenido bacteriano como a otras muestras que generalmente contienen escasos bacilos (lavados de estómago, líquido céfalorraquídeo, etc.).

La preparación de las diferentes muestras, con pocas variantes, es en el fondo similar.

Cuando se trata de muestras líquidas, como lavados de estómago, orinas, etc., se concentra el material mucoso que contiene los bacilos por medio de una centrifugación, luego, por decantación, obtenemos el sedimento, el cual se someterá a los mismos procedimientos usados para muestras de consistencia mucosa, como los esputos. La técnica de preparación es la siguiente:

En un tubo de centrifuga se colocan entre 3 y 5 cc del material mucoso, con un volumen igual de soda cáustica al 4% con indicador rojo de fenol al 0.004%. Se homogeniza agitando por unos 15 minutos en un agitador mecánico; se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 15 minutos; se decanta el sobrenadante y el sedimento se neutraliza usando HCl $\frac{2}{3}$ N y NaOH al 2%; finalmente se siembra 0.1 cc, en cuatro medios de Lowenstein.

Preparación de la suspensión bacteriana y siembra del material

Se separan todos los cultivos positivos que se obtengan a partir de la segunda hasta la sexta semana de sembrados para practicar la prueba de sensibilidad.

Se toman con el asa en forma de espátula colonias de diferentes partes de la superficie del medio y se disgregan contra las paredes de un tubo, el cual contiene de 1 a 2 cc de solución salina.

Tomando precauciones de asepsia, se siembra una serie de tubos que contienen las diferentes concentraciones de isoniacida y un tubo de Lowenstein sin droga para control (0.1 cc en cada tubo). Después de sembrados se mantienen en posición inclinada por dos semanas en la incubadora para evitar que el crecimiento se efectúe en el fondo del tubo.

Interpretación de los resultados; cepas sensibles, resistentes, parcialmente resistentes

Una prueba se considera satisfactoria cuando se han desarrollado por

lo menos unas 50 colonias en el tubo control; de lo contrario se estima como insatisfactoria y es necesario repetirla.

Una cepa se considera sensible si se obtiene un crecimiento satisfactorio en el tubo control, pero en los tubos con la droga no se observa crecimiento bacteriano a consecuencia de la inhibición producida por la isoniacida.

Una cepa se estimará resistente si se observa crecimiento en el tubo control y en los tubos que contienen la droga, y la intensidad de esta resistencia se evalúa por la más alta concentración de la droga en la cual se observa crecimiento bacteriano. Así, por ejemplo, si en el tubo control y en la concentración 0.2 mcg y 1.0 mcg se observa crecimiento, la cepa se estimará resistente hasta 1 mcg.

Si se observa un crecimiento equivalente a la mitad del observado en el tubo anterior se considera la cepa como parcialmente resistente. Por ejemplo: si observamos crecimiento satisfactorio tanto en el tubo control como en la concentración 0.2, pero en la concentración siguiente 1.0 mcg se observa un 50% de lo observado en la concentración anterior la cepa se estimará parcialmente resistente hasta 1.0 mcg. El tiempo óptimo para la lectura de una prueba de resistencia es de cuatro semanas.

Medio de cultivo empleado

El medio usado es el de Lowenstein modificado, al cual se le adicionó la isoniacida en cantidades necesarias para obtener concentraciones de 0.2, 1.0, 5.0, 7.5, 10 y 20 mcg por cc de medio.

En nuestro estudio usamos el Piricidin de la Nepera Chemical Co. Inc.

Medio de Lowenstein:

Solución salina

Fosfato monopotásico.....	2.4 gr
Sulfato de magnesio.....	0.24 gr
Citrato de magnesio.....	0.6 gr
Asparagina.....	3.6 gr
Glicerina.....	12 cc
Agua destilada.....	600 cc

Mezcla harina solución salina.—Se disuelven todas las sustancias completamente, luego se agregan 30 gramos de harina de papa y se agita vigorosamente; se pone en baño de María hasta que el contenido esté claro; se esteriliza en el autoclave por 30 minutos a 15 libras de presión; se enfría a unos 50°C antes de añadir los huevos.

Huevos totales.—Se emplean huevos frescos de gallina. Se lavan con jabón y cepillo hasta que estén perfectamente limpios y se los desinfecta en alcohol al 70% por 30 minutos. Los huevos se rompen con todos los cuidados de asepsia y un volumen de 1,000 cc, después de haberlos batido perfectamente, se añade a la mezcla harina solución salina. Se

agregan 20 cc de verde de malaquita al 2%, se filtra a través de gasa, se envasan los tubos y se esteriliza en un coagulador por 60 minutos a 90°C.

Medio de Lowenstein con isoniacida: Preparación

Tratándose de antibióticos como la estreptomina, cuando se va a preparar medios de cultivo con esta droga hay que tomar muy en cuenta la acción que el calor tiene sobre esta, ya que después de la coagulación la concentración final de la droga queda reducida a la mitad de la concentración previa a la coagulación. Afortunadamente el ácido isonicotínico es una sustancia bastante estable y después de coagular los medios a una temperatura de 90°C el ácido isonicotínico permanece inalterable. No es absolutamente necesario usar la isoniacida pura al estado de polvo, pues conociendo la cantidad contenida en las tabletas es posible usar éstas para la preparación del medio, aunque indudablemente es mucho mejor usarlo al estado puro. En nuestra experiencia usamos el Pericidin de la Nepera Chemical Company Inc. al estado de polvo puro para uso experimental. La isoniacida usada se añadió en cantidades suficientes para obtener concentraciones de 0.2, 1.0, 5.0, 7.5, 10 y 20 mcg.

TABLA DE LAS DILUCIONES DE LA ISONIACIDA

- (1) Pesar 20 miligramos y disolver en 10 cc de agua destilada. Cada centímetro cúbico de esta solución contiene 2 mg o sea 2,000 mcg.
- (2) Tomar 5 cc de la solución anterior y mezclar con 5 cc de agua. Esta dilución contiene 1 miligramo ó 1,000 microgramos por cc.
- (3) De la solución anterior tómese 1 cc y mézclese con 9 cc de agua. Esta dilución contiene 0.1 mg ó 100 microgramos por cc.

PROCEDIMIENTO PARA AÑADIR LA ISONIACIDA AL MEDIO

- (a) A 200 cc de medio de Lowenstein añadir 2 cc de la solución número 1: Cada centímetro cúbico de medio tendrá: 20 microgramos.
- (b) A 200 cc de medio añadir 1 cc de la solución N° 1. Cada centímetro cúbico de medio contiene: 10 microgramos.
- (c) A 200 cc de medio añadir 1.5 cc de la solución N° 2. Cada centímetro cúbico de medio contiene: 7.5 microgramos.
- (d) A 200 cc de medio añadir 1 cc de la solución N° 2. Cada centímetro cúbico de medio contiene: 5.0 microgramos.
- (e) A 200 cc de medio añadir 0.2 cc de la solución N° 2. Cada centímetro cúbico de medio contiene: 1.0 microgramos.
- (f) A 200 cc de medio añadir 0.4 cc de la solución N° 3. Cada centímetro cúbico de medio contiene: 0.2 microgramos.

Una vez que se ha adicionado la isoniacida de las diversas concentraciones se envasa en los tubos y se coagula en la misma forma que cuando

se prepara el Lowenstein sin la droga. Después de la prueba de esterilidad de 48 horas está listo para usarse.

RESULTADOS

Durante el curso de este trabajo se han realizado 323 pruebas de sensibilidad a la isoniacida con los gérmenes aislados de materiales orgánicos provenientes de 241 pacientes tuberculosos. La calidad de las muestras ha sido diversa, como apreciamos en la primera parte de este capítulo al hablar de los materiales empleados y su procedencia. Los resultados obtenidos son por demás interesantes al observar el alto porcentaje de resistencia desarrollada por el *Mycobacterium tuberculosis* entre los pacientes que fueron sometidos a tratamiento con isoniacida. Observando el cuadro siguiente podemos apreciar claramente lo antedicho al respecto.

En los resultados obtenidos se omiten 43 pruebas que se contaminaron con otros gérmenes, como hongos o ciertas bacterias de gran poder proteolítico que prácticamente licuan los medios e imposibilitan observar los resultados finales. En este capítulo, al hablar sobre la interpretación de los resultados se explica claramente el significado de una prueba sensible y la interpretación de una prueba resistente a las diversas concentraciones ensayadas. Las pruebas insatisfactorias son aquellas en las cuales el crecimiento en el tubo control demuestra ser desigual en comparación con el de los otros tubos con isoniacida.

CUADRO No. 1.—Resultados obtenidos con las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* examinadas

Cepas sensibles.....	147	52.50%
Cepas insatisfactorias.....	5	1.78%
Cepas resistentes.....	128	45.72%
	280	100.00%

El total de pruebas resistentes, que son 128 (45.72%), comprende a su vez fenómeno de resistencia de diversas intensidades, según se observa en el Cuadro No. 2.

Si las cifras del cuadro anterior se colocan en forma de gráfica podemos apreciar más objetivamente lo siguiente:

Que las cepas resistentes a la concentración de 0.2 mcg alcanzan el alto porcentaje de 24.22%, cifra que baja en la concentración de 1.0 mcg, permaneciendo más o menos estacionaria en la concentración de 5 mcg; luego decrece en la concentración de 7.5 mcg cuyo porcentaje es de 1.56; finalmente observamos un aumento en la concentración de 10 mcg, el cual se hace bruscamente evidente en la concentración de 20 mcg, en que alcanza un porcentaje de 46.88%.

CUADRO No. 2.—*Cepas aisladas resistentes a las diversas concentraciones de isoniácida*

Intensidad de resistencia	Conc. de isoniácida en microgramos	Número de pruebas resistentes	Porcentaje de resistentes	Porcent. de intensidad de resistencia
Moderadamente resistentes	0.2	31	24.22	24.22
Resistentes	1.0	15	11.72	22.65
	5.0	12	9.37	
	7.5	2	1.56	
Fuertemente resistentes	10.	8	6.25	53.13
	20.	60	46.88	
Total.....	128	128	100.%	100.%

Agrupando las pruebas resistentes por sus concentraciones con el objeto de facilitar la interpretación del clínico podemos clasificarlas en la forma siguiente:

Cepas resistentes a la concent. de 0.2 mcg: Moderadamente resistentes.

Cepas resistentes a la concent. de 1.0, 5.0 y 7.5 mcg: Resistentes.

Cepas resistentes a la concent. de 10.0 y 20.0 mcg: Fuertemente resistentes.

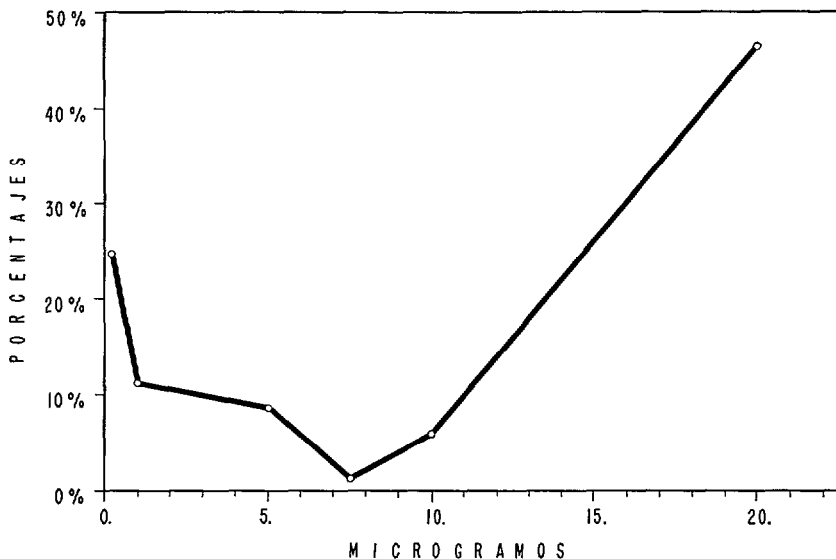
En realidad, las cifras en microgramos significan poco para el clínico, a diferencia de la clasificación anterior, que facilita la interpretación del fenómeno. Según esto tenemos que las cepas fuertemente resistentes sobrepasan el 50 % de todas las pruebas resistentes encontradas.

DISCUSIÓN

El porcentaje total de las pruebas resistentes encontradas, que asciende a 45.72 %, es un fenómeno que no debe llamarnos la atención por cuanto está en perfecto acuerdo con las cifras halladas por algunos investigadores, como William Steenken (2), Pedro Paeza (3), James Nash y W. Grosfeld (4), José Gálvez (5), todos los cuales encuentran fenómenos de resistencia con gran frecuencia y a concentraciones altas. También mencionaremos que el Servicio Cooperativo de Investigación de Salud Pública de los Estados Unidos (6), sobre una experiencia de 150 casos tratados con isoniácida, concluye que al cabo de 28 semanas casi todos los pacientes presentaron gérmenes resistentes en los tratamientos con esta droga, ya sola o asociada a la estreptomycina y al PAS.

Realizar el estudio comparativo entre los fenómenos de resistencia observados en las pruebas de laboratorio y la evolución clínica de los pacientes ha sido un problema algo difícil toda vez que el laboratorio desconocía el estado de los pacientes, la terapéutica y los resultados obtenidos anteriormente. Sin embargo, una vez finalizadas las pruebas,

FIG. 1.—Curva de las cepas aisladas resistentes a las diversas concentraciones de isoniacida



se obtuvieron los datos de algunos de ellos escogidos al azar entre los que demostraron tener bacilos fuertemente resistentes a la isoniacida. Así: 2 pacientes con gérmenes resistentes hasta 10 mcg y 24 con cultivos resistentes hasta 20 mcg.

Los tratamientos que habían recibido estos pacientes fueron variados, según se observa a continuación:

Tratados con isoniacida, PAS y estreptomina.....	19
Tratados con isoniacida y estreptomina.....	3
Tratados con isoniacida.....	3
Tratados con isoniacida y PAS.....	1
Total.....	26

Los períodos de tratamiento varían entre 10 y 32 semanas, con dosis diarias que fluctúan entre 3 y 10 mg. por kilo de peso y con un total entre 18 y 78 gramos de isoniacida.

CONCLUSIONES

De lo expuesto anteriormente podemos concluir lo siguiente:

(1) El fenómeno de resistencia a la isoniacida presentado entre los pacientes que son tratados con esta droga, lejos de ser raro, se observa con gran frecuencia y en un alto porcentaje, que en el presente trabajo alcanza un 45.72 %, cifra que está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores.

(2) El beneficio que pudiera existir en el tratamiento combinado de la isoniacida con PAS o estreptomycinina para evitar el desarrollo de resistencia a la isoniacida es todavía un problema por dilucidar, pues según se observa en este trabajo, entre las cepas fuertemente resistentes aisladas, 19 pertenecían a pacientes tratados con PAS y estreptomycinina y en general 23 habían recibido tratamiento asociado con PAS, con la estreptomycinina o ambos a la vez.

(3) Finalmente la prueba de resistencia a la isoniacida no debe ser omitida por el clínico antes de comenzar un tratamiento, durante el tratamiento y al final de él, toda vez que esto lo ayudará a prescribir las dosis necesarias para evitar que dosis insuficientes aumenten esta resistencia y disminuyan o anulen el beneficio del tratamiento. Por otro lado, en cierta forma y unida a otras pruebas permite pronosticar la evolución de la enfermedad.

RESUMEN

Se efectuaron 323 pruebas de sensibilidad a la isoniacida con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de 241 pacientes tuberculosos bajo tratamiento con isoniacida. Se empleó el método de subcultivo en el medio de Lowenstein modificado al cual se adicionó isoniacida en las concentraciones de 0.2, 1.0, 5.0, 7.5, 10 y 20 mcg. por cc. de medio.

De las 280 pruebas satisfactorias que se obtuvieron, 128 (45.72%) resultaron resistentes a la isoniacida, esto es, casi el 50% de las cepas examinadas. A su vez entre las cepas resistentes más de la mitad fueron fuertemente resistentes a las concentraciones de 7.5 mcg. 10 mcg. y 20 mcg.

La presente investigación nos permite establecer la frecuencia y la intensidad de los fenómenos de resistencia observados en los pacientes tratados con isoniacida, fenómeno que ya ha sido demostrado por otros investigadores. El beneficio de la combinación de isoniacida con otras drogas, como el PAS. y la estreptomycinina, para evitar la aparición de cepas resistentes a la isoniacida no está claramente demostrado ya que algunos pacientes con gérmenes resistentes a la isoniacida habían recibido además de la isoniacida, estreptomycinina y PAS., o ambas a la vez. De lo anterior se estima que la prueba de sensibilidad a la isoniacida no debe ser omitida por el clínico antes de iniciar un tratamiento, durante y al final de éste.

REFERENCIAS

- (1) Henry Stuart Willis y Martin M. Cummings: "Diagnostic and experimental methods in tuberculosis." Second edition 1952.—Pag. 115-170.
- (2) William Steenken, Jr., Gordon M. Meade, Emanuel Wolinsky y E. Osborne Coates, Jr.: Demonstration of increased drug resistance of tubercle bacilli from patients treated with hydrazines of isonicotinic acid. *Am. Rev. of Tuberc.* Vol. 65, N° 6. Pag. 754. 1952.

- (3) Pedro Paeza Vega, Amado E. Domínguez y Eduardo J. Muzio: Resultados obtenidos en el tratamiento de tuberculosis pulmonar por la hidrazida del ácido isonicotínico. *Revista Cubana de Tuberculosis*. Año XVI Nos. 3 y 4. Pag. 269.—(VII-XII-52).
- (4) James C. Narsh, M. D. W. Crosfeld: Isoniazid and iproniazid resistance in pulmonary tuberculosis. *The Journal of The American Medical Association*. Vol. 150. N° 8. octubre 25—1952. Pag. 813.
- (5) José Gálvez Brandon: Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos durante los ensayos de laboratorio con isoniácida. *Revista de Tuberculosis. Organo Oficial de la Sociedad Peruana de Tisiología*. Pág. 12. Año XII. enero-junio 52. N°. 34.
- (6) A United States Public Health Service Cooperative Investigation on the effect of Streptomycin on the Emergency of Bacterial Resistance to Isoniazid. *Am. Rev. of Tuberc.* Vol. 67. mayo 53. N° 5.