

---

---

## Susceptibilidad de *M. tuberculosis* a drogas antituberculosas, determinada por dos técnicas, en el estado Sucre, Venezuela.

Rosmy Mendoza<sup>1,2</sup>, Marcos De Donato<sup>2</sup>, Jacobus H. de Waard<sup>3</sup>, Howard Takiff<sup>4</sup>,  
Teresita Bello<sup>3</sup> y Gladys Chirinos<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Postgrado en Biología Aplicada, <sup>2</sup>Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumaná, Venezuela.

<sup>3</sup>Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina, Hospital Vargas. Caracas, Venezuela.

<sup>4</sup>Laboratorio de Genética Molecular,

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas – IVIC, Altos de Pipe y

<sup>5</sup>Laboratorio de Tuberculosis, Hospital "Dr. Julio Rodríguez". Cumaná, Venezuela.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, resistencia, pruebas de resistencia, Gen *rpoB*.

**Resumen.** El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia a isoniacida (INH), rifampicina (RIF), estreptomycin (STR) y etambutol (EMB) de 59 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, aisladas en el período agosto 2005-diciembre 2006, en el estado Sucre, Venezuela, empleando el método de proporciones de Canetti y de nitrato reductasa. Se encontró 6,3% de resistencia primaria y 14,3% de adquirida. Una cepa fue considerada MDR, al presentar resistencia a RIF e INH. Se comparó la prueba de nitrato reductasa con el método de las proporciones, encontrándose 100% de concordancia entre los resultados de los dos métodos para INH, RIF y EMB, y 95,65% para STR. Además, la prueba nitrato reductasa produjo resultados en 10 a 14 días, comparado con 42 días para el método de proporciones, por lo que la primera se postula como una alternativa muy valiosa para acortar el tiempo de respuesta en la valoración de la susceptibilidad de *M. tuberculosis*. La secuencia del gen *rpoB* en la cepa resistente a RIF demostró la presencia de una mutación no descrita anteriormente en la región hipervariable de 81 pares de bases, donde se ha reportado el mayor número de mutaciones de cepas resistentes a RIF. Esta mutación produjo un cambio en el codón 456 de TCG > CAG. Al comparar nuestros resultados con los hallados en el último estudio de prevalencia de resistencia realizado en el estado, se demuestra una disminución en la circulación de cepas resistentes en la zona de estudio.

## Susceptibility of *M. tuberculosis* to antituberculosis drugs as determined by two methods, in Sucre state, Venezuela.

*Invest Clin* 2010; 51(4): 445 - 455

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, resistance, multidrug-resistant, resistance assay, *rpoB* gene.

**Abstract.** The objective of this study was to evaluate the resistance to isoniazid (INH), rifampicin (RIF), streptomycin (STR) and ethambutol (EMB), with the Canetti's proportions method (PM) and the nitrate reductase assay (NRA) of 59 clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*, isolated in the period of august 2005 to december 2006, in Sucre state, Venezuela. Primary and acquired drug resistance was 6.3% and 14.3%, respectively. Only one strain was found to be multidrug resistant (MDR). The overall agreement between the NRA and PM was 100% for INH, RIF and EMB, and 96% for STR. The time to obtain results was 10 to 14 days for the NRA, compared to 42 days for the PM. The NRA was easy to perform and therefore represents a useful tool for rapid and accurate determination of drug-resistant *M. tuberculosis*. The sequence of the *rpoB* gene of the RIF resistant strain demonstrated a never described mutation (change in the codon 456; TCG > CAG) in the hypervariable region of 81 base pairs where most of the mutations of the RIF resistant strains have been reported. Comparison of our results with those of the last resistance prevalence study carried out in the years 1998-1999, shows a decrease in the studied area.

Recibido: 10-06-09. Aceptado: 15-04-10.

### INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad que representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, lo que representa un importante reservorio que influye en la generación en el mundo de más 8 millones de casos nuevos y 2 millones de muertes cada año (1-3).

En Venezuela, en el año 2004, se notificaron 6.519 casos de tuberculosis, o sea, 25 casos cada 100.000 habitantes (hab) y los estados con la mayor tasa por cada 100.000 hab. fueron: Distrito Capital

(63,3), Portuguesa (37,9), Sucre (30,2), Zulia (24,5), Bolívar (19,2), Miranda (18,5), Carabobo (18,4) y Lara (15,8). En el estado Sucre, la mayor tasa se registró en los municipios Sucre (49,2), Bermúdez (19,2), Montes (50,5) y Valdez (30,3) (3). La enfermedad ha experimentado una disminución en el número de casos en nuestro país, ya que para el año 2006, el número de casos nuevos fue de 3.647, para una tasa de 13,5, siendo los estados más afectados: Distrito Capital (35,6), Portuguesa (18,2), Sucre (14,6), Miranda (12,6), Carabobo (12,5), Zulia (12,2), Anzoátegui (11,4), Bolívar (10,0) y Lara (9,9). En el estado Sucre, los municipios con mayor número de casos continúan siendo Sucre (25,3), Bermúdez (7,5) y Montes (14,6) (4).

Entre las principales causas que han favorecido al aumento de la tuberculosis a nivel mundial, se encuentran el incremento de pacientes con infección por VIH, la aparición de resistencia debido a la administración de regímenes antituberculosos incorrectos, incumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes, que son factores que contribuyen al aumento y circulación de cepas resistentes (5-7). Por esta razón, es importante el diagnóstico oportuno de la tuberculosis y la detección rápida de resistencia a las drogas con el fin de evitar la propagación de cepas resistentes (8, 9).

El estudio más reciente sobre resistencia a las drogas antituberculosas realizado en Venezuela, durante 1998-1999, arrojó una prevalencia de 7,5% en resistencia primaria y 30,8% en resistencia secundaria o adquirida, presentando el estado Sucre el mayor índice de resistencia primaria (22,0%), seguido de los estados Zulia (14,1%), Portuguesa (9,4%) y Monagas (8,9%) (10).

La determinación de resistencia a fármacos de primera línea, en especial a la rifampicina y la isoniazida, ha sido la base del diseño de técnicas de susceptibilidad, dada la importancia que estos dos medicamentos tienen dentro del esquema de tratamiento (9). Se han detectado cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a más de una droga, por lo que se conocen como multi-droga resistente (MDR). Actualmente, la resistencia a rifampicina es considerada un marcador de multiresistencia, ya que la resistencia a este fármaco raramente se presenta sola y frecuentemente viene asociada con resistencia a la isoniazida (9, 11, 12).

Existen diferentes métodos para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas. En América Latina, se ha usado el método de las proporciones como técnica de referencia (13). Debido a la laboriosidad y el tiempo prolongado que este método requiere para emitir los resultados, se

han implementado otras técnicas, tales como el sistema radiométrico BACTEC, en donde los resultados se obtienen en un tiempo relativamente corto (5-10 días), pero sus mayores inconvenientes son el uso de material radioactivo y su elevado costo (8, 14, 15). La prueba de Nitrato Reductasa, es un método alternativo, basado en la habilidad que tiene *M. tuberculosis* para reducir nitrato a nitrito (16). Esta prueba ha sido considerada como una herramienta útil para la detección rápida y precisa de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea (16-20).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas de primera línea en zonas endémicas del estado Sucre, Venezuela y comparar el método nitrato reductasa con el método de las proporciones para ser usado como prueba de rutina para la detección de drogas antituberculosas de primera línea.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Se recolectaron 59 muestras de esputos de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, con resultados de baciloscopia positiva, procedentes del Hospital Dr. Julio Rodríguez de Cumaná (municipio Sucre), Hospital Dr. Luís Daniel Beauperthuy de Cumanacoa (municipio Montes) y del Hospital Santos Aníbal Dominici de Carúpano, municipio Bermúdez, Venezuela, durante el período agosto 2005-diciembre 2006. Los pacientes firmaron un consentimiento, previa información, donde declararon su voluntad de participar.

### Baciloscopia y cultivos

Los extendidos de esputos fueron teñidos con la coloración de Ziehl-Neelsen y examinados mediante la técnica de examen directo (baciloscopia) (21). Las muestras se

cultivaron por duplicado en medios de cultivo Lowenstein-Jensen y Ogawa, previa descontaminación con NaOH al 4%, de acuerdo al método de Ogawa-Kudoh (21). Los cultivos se incubaron a 37°C y las revisiones se hicieron a los 4, 7, 15, 30, 45 y 60 días. De un total de 59 muestras cultivadas, 46 muestras resultaron viables para las pruebas de resistencia, y los 13 cultivos restantes no fueron incluidos en el estudio por presentar aislamientos insuficientes (2 a 4 colonias) o presentar contaminación.

### Susceptibilidad a las drogas

Para determinar la susceptibilidad frente a isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y estreptomycin (STR), se empleó el método de las proporciones de Canetti (15), como método de referencia, el cual consiste en determinar en una cepa la proporción de mutantes resistentes para cada droga y un método alternativo, la prueba de Nitrato Reductasa (16). Para llevar a cabo esta prueba, se preparó inicialmente una suspensión madre, a partir de cada cultivo. De la suspensión madre, se tomó 1 mL y se agregó a un tubo que contenía 9 mL de agua destilada (dilución 1:10). Posteriormente, se inocularon 200  $\mu$ L de la dilución 1:10 a tres tubos con medio Lowenstein-Jensen sin antibiótico, que fueron designados como controles del día: 7, 10 y 14. Así mismo, se inocularon 200  $\mu$ L de la solución madre sin diluir en los tubos Lowenstein-Jensen con antibiótico. Los tubos se incubaron a 37°C durante 7 días, al cabo de este tiempo se procedió a revelar el primer control sin antibiótico (control día 7), cuando el control resultó positivo, se realizó el revelado del tubo de prueba con antibiótico. En caso en que este control resultó negativo, se esperó para realizar el revelado de los controles del día 10 y 14, si era el caso. Los resultados se clasificaron en:

- Negativo: no hubo cambio de color.

- $\pm$ : aparición de color rosado pálido.
- 5+: color rojo fuerte a violeta oscuro.

Una cepa fue considerada resistente al antibiótico cuando el cambio de color en el tubo con el antibiótico fue mayor que en el tubo control 1:10 del mismo día.

En ambos métodos se utilizaron las siguientes concentraciones críticas de las drogas: 0,2  $\mu$ g/mL INH; 40,0  $\mu$ g/mL RIF; 2,0  $\mu$ g/mL EMB y 4,0  $\mu$ g/mL STR (15, 16). Se empleó como control una cepa de referencia H<sub>37</sub>Rv sensible a las drogas ensayadas. Para valorar la concordancia entre los dos ensayos utilizados, se empleó como método estadístico la prueba de kappa.

Las cepas se consideraron con resistencia primaria cuando se aislaron de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, con resultados de baciloscopia (BK) positiva y demostración bacteriológica (cultivo positivo), sin antecedentes de tratamiento antituberculoso o quimioprolaxis anterior o en el momento de la toma de muestra. En cambio, las cepas se consideraron con resistencia secundaria cuando se aislaron de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, con resultados de baciloscopia positiva, demostración bacteriológica, y con antecedentes de haber recibido tratamiento antituberculoso normado, pacientes con recaídas, recuperación de abandono, crónicos y fracaso de tratamiento.

### Caracterización del gen *rpoB*

La única cepa de *M. tuberculosis* que resultó resistente a rifampicina, así como 5 cepas que resultaron sensibles, escogidas al azar, fueron caracterizadas a nivel del gen *rpoB* para determinar la presencia de mutaciones. Utilizando el kit de extracción de ADN genómico Wizard (Promega Corp., Madison, WI, USA) se extrajo el ADN de estas cepas, así como de 2 cepas usadas como controles positivos: 1 cepa MDR de Bélgica (BELG) y 1 cepa resistente a rifampicina

del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Caracas (CCS) y la cepa H<sub>37</sub>RV sensible como control negativo. Para la caracterización del gen *rpoB*, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Kapur y col. (22): *rpoBF*: 5' GGGAGCGGAT GACCACCCA 3', *rpoBR*: 5' GCGGTACGGC GTTTCGATGAAC 3', que amplifican un fragmento de 350 pb.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 100  $\mu$ L, utilizando 5  $\mu$ L de ADN (100 ng aproximadamente), 20  $\mu$ L de buffer de *GoTaq* 5X (10 mmol/L de Tris-HCl, pH 9,0; 50 mmol/L de KCl y 1% de Triton X-100), MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, 200  $\mu$ mol/L de cada desoxirribonucleotido trifosfato; 0,5  $\mu$ mol/L de cada oligo y 1,25 U de *GoTaq* polimerasa (Promega Corp., Madison, WI, USA). La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemania), con la siguiente programación: 1 ciclo a 94°C por 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos con un paso a 94°C por 1 min para la desnaturalización, otro a 54°C por 1 min para la hibridación de los *primers*, y otro a 72°C por 1 min para la extensión, y 1

ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final. Los productos amplificados fueron corridos por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% que contenía bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/mL en buffer TBE 1X durante 45 min a 100 volts. El ADN fue visualizado en un transiluminador ultravioleta.

Los productos de la PCR obtenidos fueron purificados usando el Kit QIAquick (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) y enviado al Servicio del Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), para su secuenciación en un aparato automatizado ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## RESULTADOS

De las 46 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas (Tabla I), 32 pertenecían a pacientes clasificados como casos nuevos, de éstas, 30 (93,7%) resultaron sensibles a los cuatro medicamentos ensayados y 2 (6,3%) presentaron resistencia (resistencia primaria) a una droga (estreptomicina). Con respecto a la resistencia en pacientes previa-

**TABLA I**  
SUSCEPTIBILIDAD A MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS POR EL MÉTODO DE LAS PROPORCIONES

	Casos nuevos		Casos previamente tratados	
	N	%	N	%
Total de cepas estudiadas	32	100	14	100
Susceptibles	30	93,7	12	85,7
Cualquier resistencia	2	6,3	2	14,3
Resistencia a:				
INH	0	0,0	0	0,0
RIF	0	0,0	0	0,0
EMB	0	0,0	0	0,0
STR	2	6,3	1	7,1
MDR (INH+RIF)	0	0	1	7,1

INH: isoniacida. RIF: rifampicina. EMB: etambutol. STR: estreptomicina.

**TABLA II**  
COMPARACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS ESTUDIADAS POR LA PRUEBA NITRATO REDUCTASA Y EL MÉTODO DE LAS PROPORCIONES

Droga	Método proporciones	Nitrato Reductasa		Concordancia
		N° cepas resistentes	N° cepas susceptibles	
INH	Resistente	1	0	100%
	Susceptible	0	45	
RIF	Resistente	1	0	100%
	Susceptible	0	45	
EMB	Resistente	0	0	100%
	Susceptible	0	46	
STR	Resistente	1	2	95,65%
	Susceptible	0	43	

mente tratados, de las 14 cepas estudiadas, 12 fueron sensibles (85,7%) y 2 (14,3%) resistentes (resistencia adquirida), una resistente a estreptomycinina y la otra fue considerada MDR, ya que mostró resistencia tanto a la rifampicina como a la isoniacida.

Al comparar el método de las proporciones de Canetti con la prueba de Nitrato Reductasa (Tabla II) para la determinación de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea, se evidencia que para la isoniacida y rifampicina 1 cepa resultó resistente y 45 susceptibles por ambos métodos. En cuanto al etambutol, por ambos métodos todas las cepas fueron identificadas como susceptibles. En el caso de la estreptomycinina, se hallaron 43 cepas susceptibles por los dos métodos, 3 resistentes por el método de las proporciones, pero dos de éstas sensibles por el método Nitrato Reductasa. El coeficiente kappa demostró una muy buena concordancia entre el método nitrato reductasa y el método de las proporciones para las todas drogas ensayadas.

Además, el tiempo promedio requerido para obtener los resultados de resistencia fue de 10 días en 12 cepas y 14 días en 34 cepas por el método Nitrato Reductasa,

mientras que el método de proporciones requirió 42 días para detectar la resistencia.

La cepa de *M. tuberculosis* que resultó resistente a rifampicina en este estudio, junto con 3 cepas controles (2 Rif-R, 1 Rif-S), fueron usadas para amplificar por PCR un fragmento específico del gen *rpoB* (Fig. 1) de 350 pares de bases que contiene el dominio de interacción de esta droga con la ARN polimerasa.

El análisis de la secuencia de este gen demostró la presencia de mutaciones en las cepas resistentes (Fig. 2): en la cepa BELG, la mutación ocurrió en el codón 441, donde se produjo un cambio de Asp->Val (GAC->GTC); en la cepa CCS, se presentó una mutación en el codón 451, con el cambio His->Asp (CAC->GAC); y la cepa aislada en nuestro estudio, se observó una mutación en el codón 456, donde se produjo un cambio de Ser->Gln (TCG->CAG). Esto fue corroborado por la secuenciación del fragmento con ambos primers.

## DISCUSIÓN

El Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social, al estudiar la resistencia de *M. tuberculosis* durante 1998-1999 (10), reportó

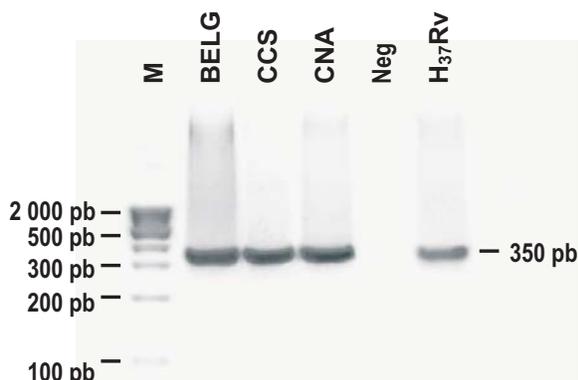


Fig. 1. Producto de la amplificación por PCR del gen *rpoB* de *M. tuberculosis*. Electroforesis en gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio. BELG y CCS (cepas resistentes a rifampicina de Bélgica y Caracas, respectivamente) y CNA (cepa resistente a rifampicina aislada en nuestro estudio), agua (neg) y H<sub>37</sub>Rv cepa sensible (control negativo). M: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

para el estado Sucre el mayor índice de resistencia primaria (22%) y secundaria (50%), lo cual fue motivo de inquietud para la realización de este trabajo. La menor frecuencia de resistencia tanto primaria como secundaria encontrada por nosotros puede sugerir un buen funcionamiento del programa de tratamiento de la tuberculosis en el Estado, aunque todavía los niveles de resistencia son importantes.

La búsqueda de nuevas técnicas que faciliten en costo y tiempo, la obtención de los resultados de susceptibilidad a las drogas empleadas para el tratamiento de la tuberculosis, es importante en países de bajos recursos y donde existe una alta prevalencia de casos de tuberculosis resistentes (19).

El método Nitrato Reductasa demostró ser un método alternativo para la rápida detección de susceptibilidad a las drogas anti-tuberculosas de primera línea, representando una reducción notable del tiempo en la obtención de los resultados. En cierto modo, estos datos concuerdan con los aportados por Lemus y col. (23), quienes señalan que el tiempo promedio requerido para obtener los resultados con el uso de Nitrato Reductasa es de 10 días.

En el estudio se observó una menor concordancia para la estreptomycin, por la prueba de nitrato reductasa. Al respecto, Angeby y col. (17) en su estudio empleando la prueba Nitrato Reductasa, señalaron la dificultad que se les presentó al evaluar la especificidad (83%) de resistencia a la estreptomycin y la sensibilidad (75%) en la detección de resistencia al etambutol. Lemus y col. (23), al utilizar la prueba de Nitrato Reductasa obtuvieron una sensibilidad de 91,7%; 96,5%; 88,0% y 93,9%, y una concordancia de 97,0%; 92,0%; 92,0% y 99,0% para isoniacida, estreptomycin, etambutol y rifampicina, respectivamente; acotando que los resultados de su estudio son prome-



Fig. 2. Comparación de las secuencias de la región determinante de resistencia a rifampicina del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* de la cepa resistente y las de referencia comparadas con una secuencia del GenBank (Accession Number: AE000516). La numeración mostrada es según Telenti y col. (27).

tedores ya que obtuvieron pocos resultados discordantes entre el método de las proporciones y Nitrato Reductasa. De la misma forma, la Organización Mundial de la Salud (24) y Lazlo y col. (25) señalan que es difícil determinar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a estreptomycin y etambutol cuando se usan métodos convencionales.

Debido a que la rifampicina y la isoniazida constituyen la columna vertebral del esquema terapéutico antituberculoso (26), es importante detectar cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estas drogas para implementar tratamiento con agentes alternativos con el fin de curar la enfermedad. Agapito y col. (1), hallaron en su estudio que todas las cepas aisladas resistentes a rifampicina también lo eran a isoniazida, con excepción de 2 (3,9%), que tenía resistencia a por lo menos un fármaco más. La multidrogoresistencia (MDR) en estas cepas fue de 98% (49/50). Estos autores señalan que al encontrar una cepa de un paciente que tenga resistencia a rifampicina, existe una probabilidad cercana al 100%, que también lo sea a isoniazida. En tal sentido, Telenti y col. (27) y Porras y col. (26); señalan la importancia que tiene la determinación de resistencia a rifampicina, para ser usada como un marcador para la detección de *M. tuberculosis* MDR.

Con base a lo antes planteado por los diferentes autores, señalamos que la resistencia tanto a rifampicina como a isoniazida (multiresistencia), esta dada por la administración de estas dos drogas durante la fase inicial del tratamiento. La relación en su resistencia no puede atribuirse ni a la diana, ni a la forma como actúan ambos fármacos, ya que los mecanismos de acción de estas drogas son diferentes y los genes que están involucrados en dicha resistencia también son distintos.

Es importante contar con métodos rápidos de determinación de susceptibilidad a las drogas antituberculosas, ya que permite

modificar el tratamiento para la cura de los pacientes, disminuyendo así la probabilidad de contagio de la población con cepas resistentes.

En tal sentido, se puede considerar, al igual que lo planteó Lemus y col. (23), que el método nitrato reductasa constituye una herramienta útil para la detección de susceptibilidad a las drogas antituberculosas, en especial a rifampicina e isoniazida, en ciudades de bajos recursos, con limitaciones en sus laboratorios, debido al bajo costo de la prueba, a su facilidad de uso y al no requerir equipos sofisticados. Podríamos emplear este método como una buena opción a la hora de evaluar inicialmente a los pacientes con casos de tuberculosis crónicas, en donde se amerita resultados de susceptibilidad lo antes posible.

Aproximadamente un 95% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina presentan un alteración genética en la región de 81pb del gen *rpoB*, esta región se extiende desde los codones 507 al 533. Se ha observado, que aproximadamente el 86% de las mutaciones ocurren en los codones Ser 531, His 526 y Asp 516, representando éstos, los puntos calientes dentro de esta región determinante de resistencia a rifampicina (29, 30). Spindola y col. (30) y Van Rie y col. (31), señalan que las mutaciones en los codones Ser 531 e His 526 dentro de la región hipervariable de 81 pb del gen *rpoB* son las más comunes y su frecuencia relativa es muy similar en distintas regiones geográficas

En las tres cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina (BELG, CCAS y CNA) secuenciadas en este estudio, se pudo determinar la existencia de mutaciones en el gen *rpoB*. Al realizar la comparación de nuestros resultados con el sistema de numeración empleado por Telenti y col. (27), observamos mutaciones en los codones 516, 526, 531 de las cepas BELG, CCS y CNA, respectivamente, y de acuerdo a la li-

teratura consultada nuestros resultados concuerdan con los reportados por muchos autores, que estas mutaciones son las que frecuentemente ocurren en las cepas *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina.

García y col. (33), hallaron un mayor número de mutaciones en los codones 516, 526, 531; el cambio observado para el codon 516 fue GAC->GGC (Asp->Gli) y GAC->GTC (Asp->Val), en cuanto al codon 526, el cambio fue CAC->GAC (His->Asp), CAC->TAC (His->Tyr) y CAC->TGC (His->Cys), y para el codon 531, el cambio fue TCG->TTG (Ser->Leu) y TCG->TGG (Ser->Trp). Agapito y col. (2), reportaron que en el 96,1% de los aislamientos resistentes, las variaciones encontradas estuvieron en los codones 531, 526, 516 y 513 y un 3,9% en los codones 522, 527, 533, 520, 512 y 511. Karahan y col. (34), hallaron en el 90% de los aislados resistentes a rifampicina una mutación en el codon 531 TCG->TTG (Ser->Leu). Ozturk y col. (35), demostraron la existencia de mutaciones en los codones 516 GAC->GTC (Asp->Val) y 531 TCG->TTG (Ser->Leu). En Venezuela, Aristimuño y col. (36), encontraron la misma mutación reportada previamente por Karahan y col. (34) y la reportada en el codon 516 por Ozturk y col. (35).

Llama la atención, que en la bibliografía consultada, no conseguimos reportes de mutaciones que concuerden con el cambio de aminoácidos observado en la cepa aislada en nuestro estudio en el codón 531 con el cambio Ser->Gln (TCG->CAG). Este resultado pone de manifiesto que dichas mutaciones son propias de cada región y destacamos la importancia de realizar estudios posteriores que aporten nuevos resultados sobre la identificación de mutaciones a todo lo largo del territorio nacional.

En nuestra experiencia, la prueba de nitrato reductasa ha demostrado ser un método sencillo, los resultados se obtienen en un tiempo relativamente corto y muestran

buena concordancia al ser comparados con el método de las proporciones, sugiriéndose como una alternativa de uso en los laboratorios de diagnóstico de tuberculosis del país. Los resultados hallados demuestran una disminución en la circulación de cepas resistentes en la zona estudiada, lo pudiera sugerir un buen funcionamiento del programa de tratamiento de la tuberculosis en el estado Sucre.

## REFERENCIAS

1. **Agapito J, Neyra V, Castro J, Accinelli R, Rodríguez I, Espinoza J.** Caracterización de las mutaciones en el gen *rpo B* asociadas a la resistencia a rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Rev Peru Med Exp Salud Public* 2002; 19(3): 117-123.
2. **Brudey K, Gordon M, Moström P, Svensson L, Bodil J, Sola C, Ridell M, Rastogi N.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Sweden. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):3046-3051.
3. **Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS).** Programa Nacional Integrado de control de la tuberculosis en Venezuela. Caracas. 2006.
4. **Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS).** Programa Nacional Integrado de control de la tuberculosis en Venezuela. Caracas. 2007.
5. **Montoro E.** La resistencia a múltiples fármacos: una amenaza para el control de la tuberculosis. *Rev Panam Salud Pública* 2004; 16(1):68-73.
6. **Calderón R, Asencios L, Quispe N, Custodio W, Montoya Y.** Detección rápida de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-SSCP y PCR-Heteroduplex. *Rev Peru Med Exp Salud Public* 2003; 20(2):65-71.
7. **Montoro E, Echernendía M, Lemus D, Marrero A, Llanes M, Valdivia J.** Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas en Cuba, 1995-1998. *Biomédica* 2004; 24:80-84.

8. **Musa H, Ambrogi M, Souto A, Angeby K.** Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy positive sputum samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3159-3161.
9. **Palomino, J.** Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J* 2005; 26:339-350.
10. **Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS).** Informe de evaluación anual del programa integrado de control de la tuberculosis en Venezuela. Caracas. 2000.
11. **Goble M, Iseman MD, Madsen L, Waite D, Ackerson L, Horsburg CR Jr,** Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med* 1993; 328:527-532.
12. **Cole S, Telenti A.** Drug resistente in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Res J* 1995; 8:1130-1135.
13. **Drobniewski F, Wilson S.** The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* a molecular story. *J Med Microbiol* 1998; 47:189-196.
14. **Quirós E, Airoldi M, Moretti F, Carosi G.** Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Diag Biol* 2001; 50(4):1126-1129.
15. **Canetti G, Rist N, Grosset J.** Mésure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires pour la méthode des proportions. *Rev Tuberc Paris* 1963; 27:217-272.
16. **Lemus D, Martin A, Montoro E, Portaels F, Palomino J.** Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:130-133.
17. **Angeby K, Klintz L, Hoffner S.** Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2):553-555.
18. **Panaiotov S, Kantardjiev T.** Nitrate reductase assay for drug susceptibility testing *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3881-3882.
19. **Coban A, Birinci A, Ekinci B, Durupinar B.** Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 304-306.
20. **Montoro E, Lemus D, Echemendía M, Martin A, Portaels F, Palomino J.** Comparative evaluation of the nitrate reductase assay; The MMT test and the resazurin microtiter assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:500-505.
21. **Vargas L, Quintero O, Ulloa I, Giraldo E, León C, Naranjo N, Bernal M, Guerrero M, Camargo D.** Tuberculosis. Tercera edición. Ministerio de Salud e Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 1990, 55 pp.
22. **Kapur V, Li L, Iordanescu S, Hamrick M, Wanger A, Kreiswirth B, Musser J.** Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene *rpoB* encoding the RNA polymerase  $\beta$  subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4):1095-1098.
23. **Lemus D, Montoro E, Echemendía M, Martin A, Portaels F, Palomino J.** Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low-resource laboratories. *J Med Microbiol* 2006; 55:861-863.
24. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Resistencia a drogas antituberculosas en el mundo. Geneva. 2000.
25. **Laslo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M, WHO/IUATLD.** Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: Five rounds of proficiency testing. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:748-756.
26. **Porrás T, León C, Guerrero M, Martin A, Portaels F, Palomino J.** Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de farmacoresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica* 2005; 25:22-33.
27. **Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston M, Matter L, Schopfer**

- K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993; 341:647-650.
28. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enfer Infecc Microbiol Clin 2003; 21(6):299-308.
29. Ramaswamy S, Musser J. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tub Lung Dis 1998; (79):29.
30. Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, p. 235-254. In: F. Hatfull and W. Jacobs (ed). Molecular genetics of mycobacteria. ASM Press, Washington, D.C. 2000.
31. Spindola S, Kritski A, Fillol I, Habitat C, Panteix G, Drovet E. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolates in Brazil and France. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(2):247-250.
32. Van Rie A, Warren R, Mshanga I, Jordan A, Vander S, Richardson M. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. J Clin Microbiol 2001; 39(2):636-641.
33. García L, Alonso M, Rebollo M, Tercero J, Chavez F. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and rapid detection by PCR-Enzyme linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 2001; 39(5):1095-1098.
34. Karahan Z, Atalay F, Uzun M, Erturan Z, Atasever M, Akar N. Sequence analysis of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. Microb Drug Resist 2004; 10: 325-333.
35. Ozturk C, Sanic A, Kaya D, Ceyhan I. Molecular analysis of isoniazid, rifampin and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Düzce, Turkey. Jpn J Infect Dis 2005; 58:309-312.
36. Aristimuño L, Armengol R, Cebollada A, España M, Guilarte A, Lafoz C, Lezcano M, Revillo M, Martín C, Ramírez C, Rastogi N, Rojas J, Vásquez A, Sola C, Samper S. Molecular characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the first national survey of antituberculosis drug resistance from Venezuela. BCM Microb 2006; 6:90.