



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD
DE *Mycobacterium tuberculosis* A DROGAS ANTITUBERCULOSAS EN
POBLACIONES ENDÉMICAS DEL ESTADO SUCRE**

Lcda. Rosmy del Valle Mendoza Guevara

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE Magister Scientiarum EN BIOLOGÍA APLICADA,
MENCION MICROBIOLOGÍA APLICADA

Cumaná, mayo de 2009.

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD
DE *Mycobacterium tuberculosis* A DROGAS ANTITUBERCULOSAS EN
POBLACIONES ENDÉMICAS DEL ESTADO SUCRE**

Aprobado en la universidad de oriente, por el siguiente jurado examinador:

Dr. Marcos De Donato
(Asesor)

Jurado Principal

Jurado Principal

ÍNDICE

<u>DEDICATORIA.....</u>	<u>i</u>
<u>AGRADECIMIENTOS.....</u>	<u>ii</u>
<u>LISTA DE TABLAS.....</u>	<u>iii</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>iv</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>v</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>1</u>
<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>9</u>
<u>General.....</u>	<u>9</u>
<u>Específicos.....</u>	<u>9</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>10</u>
<u>Recolección de muestras.....</u>	<u>10</u>
<u>Diagnóstico microscópico o baciloscopia.....</u>	<u>11</u>
<u>Cultivo.....</u>	<u>12</u>
<u>Pruebas de susceptibilidad.....</u>	<u>12</u>
<u>Extracción de ADN para la secuenciación.....</u>	<u>15</u>
<u>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....</u>	<u>16</u>
<u>Secuenciación.....</u>	<u>17</u>
<u>Spoligotyping.....</u>	<u>17</u>
<u>Análisis de los datos.....</u>	<u>20</u>
<u>RESULTADOS.....</u>	<u>21</u>
<u>Prevalencia.....</u>	<u>21</u>
<u>Comparación de pruebas de susceptibilidad.....</u>	<u>22</u>
<u>Secuenciación.....</u>	<u>24</u>
<u>Spoligotyping.....</u>	<u>26</u>
<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>32</u>
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>40</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>41</u>
<u>ANEXO.....</u>	<u>51</u>
<u>HOJAS DE METADATOS.....</u>	<u>54</u>

DEDICATORIA

A mi hijo, mi mayor felicidad.

Que todos mis esfuerzos por mejorar te sirvan de ejemplo y motivación.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** y a mi virgencita Del Valle, por cada día de mi vida, por darme la familia que tengo y por ponerme en el camino ángeles que me apoyaron y me brindaron su ayuda para llevar a cabo este trabajo:

Mi familia, por su amor y estar siempre a mi lado.

Mi esposo, por su amor, comprensión y apoyo en todos mis planes.

Mi suegra, por estar siempre al lado de mi hijo.

Dr. Marcos de Donato, por su asesoría, su paciencia y su amistad.

Dr. Jacobus de Waard, por sus orientaciones y su ayuda en todo momento.

Dr. Howard Takiff, por su valiosa colaboración.

Lcda. Gladys Chirinos y la Sra Petra Elis del Laboratorio de Tuberculosis del Hospital Julio Rodríguez, por su amistad y su ayuda en el procesamiento de las muestras.

Lcda. Teresita Bello, Sra. Xiomara Brito, Sra. Yessica y a todo el personal del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Caracas, por su tiempo dedicado y valiosa ayuda en el análisis de las muestras.

Dra. Mercedes España, Lcda. Thais Morao y Lcda. Carmen Ramírez del Programa Nacional de Tuberculosis, por su valiosa colaboración.

Prof. Richard Heymans[†], por sus orientaciones en el análisis estadístico.

Msc. Luz Betina Villalobos, Mcs. Aracelys Arcia, Dra. Mariolga Berrizbeitia y la Sra Luz, por su colaboración y atenciones durante mi preparación académica.

Dr. Edgar Abadia y Msc. Claudia Cortesia, del IVIC, por su ayuda en el análisis de las cepas.

Mi amiga, Msc. Hectorina Rodulfo, por brindarme siempre su apoyo, por sus orientaciones y ayuda en la revisión del trabajo.

Mis compañeros y amigos de postgrado, por los gratos momentos compartidos durante mis estudios: Msc. Jessica Rodríguez, Lcda. Evis Parra, Msc. Yoina Rivas, Msc. Daniel Belmar, Msc. Pablo Cornejo, Lcdo. Javier Santiago y Msc. Zulay Simoni.

Al Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología (FONACIT) por la ayuda económica para la realización de mi maestría.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de las drogas antituberculosas utilizadas en las series de diluciones de cultivo para la determinación de la susceptibilidad por el método de las proporciones (Canetti et al., 1963).....	14
Tabla 2. Prevalencia de resistencia a medicamentos antituberculosos por el método de las proporciones, de pacientes procedentes del servicio de tuberculosis del Hospital Dr. Julio Rodríguez de Cumaná, del Hospital Dr. Luís Daniel Beauperthuy de Cumanacoa y del Hospital Santos Aníbal Dominici de Carúpano, entre agosto 2005 y diciembre 2006.....	21
Tabla 3. Resultados de sensibilidad y resistencia de la prueba nitrato reductasa al ser comparada con el método de las proporciones.....	22
Tabla 4. Identificación de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> aisladas en este estudio. Tipos y familias biogeográficas, patrón de hibridación (descripción del espoligotipo del 1 al 43, cuadrado negro: hibridación, cuadrado blanco: no hibridación) y la descripción octal. NA= no aplica, tipo no reportado por SpolDB4. MDR: cepa resistente a isoniazida y rifampicina. STR: cepa resistente a estreptomina.....	28
Tabla 5. Frecuencia de los tipos y las familias encontradas en el estudio y su distribución geográfica.....	29
Tabla 6. Características clínicas y epidemiológicas de la población estudiada.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de los hospitales de donde provenían las muestra de los pacientes (marcadas en rojo).	11
Figura. 2. Esquema para la preparación de las diluciones de los cultivos utilizadas en el método de las proporciones (Canetti et al., 1963).....	13
Figura 3. Producto de la amplificación por PCR del gen rpoB de M. tuberculosis. Corrida electroforética 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 H37Rv cepa sensible (control negativo). M: marcador de peso molecular de 100pb (Promega).....	23
Figura 4. Electroferograma de las secuencias del fragmento amplificado a partir de las muestras BELG (A), CCS (B) y CNA (C), utilizando el primer rpoBF. La codificación de las bases es A: adenina (Color verde), C: citosina (Azul), G: guanina (Negro) y T: timina (Rojo). El tamaño de los picos corresponde a la intensidad de la fluorescencia de cada fragmento. La flecha muestra la posición de las bases mutadas.....	24
Figura 5. Comparación de las secuencias del fragmento amplificado del gen rpoB de M. tuberculosis de la cepa resistente estudiada y las de referencia comparadas con una secuencia del GenBank (Accession Number: AE000516).....	25

RESUMEN

Se evaluó la susceptibilidad a isoniacida (INH), rifampicina (RIF), estreptomina (STR) y etambutol (EMB) y las características epidemiológicas-moleculares de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en poblaciones endémicas del estado Sucre. Para ello, se recolectaron muestras de esputos tomadas por expectoración, de pacientes con sintomatología respiratoria procedentes del servicio de tuberculosis del Hospital Dr. Julio Rodríguez de Cumaná (municipio Sucre), del Hospital Dr. Luís Daniel Beauperthuy de Cumanacoa (municipio Montes) y del Hospital Santos Aníbal Dominici de Carúpano (municipio Bermúdez), durante el periodo de agosto 2005 – diciembre 2006. Las muestras con baciloscopia positiva y cultivo positivo fueron incluidas en el estudio y en una hoja de registro se recopiló los datos epidemiológicos de los pacientes. De un total de 54 muestras, 46 cultivos resultaron viables, a los cuales se les realizó las pruebas de susceptibilidad empleando el método de proporciones de Canetti y de nitrato reductasa. Se realizó la extracción, purificación y secuenciación del ADN de las cepas que resultaron resistente a rifampicina en este estudio, así como de 2 cepas controles positivos y 1 cepa H₃₇RV sensible (control negativo). A las 46 cepas aisladas, se les realizó la caracterización molecular, empleando la técnica de Spoligotyping. Los resultados mostraron un 6,3% de resistencia primaria y 14,3% de resistencia adquirida. Una cepa fue considerada multidrogaresistente (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 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 Ser->Gln (TCG->CAG), lo cual representa un nuevo tipo de mutación para esta región. Al comparar estos resultados con los encontrados 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. Los resultados del Spoligotyping revelaron un total de 15 grupos (clusters) con perfiles de espiligotipos diferentes, el perfil con mayor frecuencia correspondió al espiligotipo 93 (23,9%), seguidos de los espiligotipos 17 (19,6%), 42 (8,6%), 134 (6,5%), 64 (6,5%), 216, 60, 880, 167 53, 905 y 605 (2,2%), pertenecientes a las familias biogeográficas LAM2, LAM9, Haarlem3, LAM6, LAM9, LAM4, T1, T1, T1, U y U, respectivamente. Las variables clínicas y epidemiológicas de los pacientes (edad, sexo, positividad de la baciloscopia y contacto con pacientes con tuberculosis), no estuvieron asociadas estadísticamente con los espiligotipos hallados, por lo que no representaron factores relacionados con la condición de los pacientes a ser portadores de una cepa con un patrón determinado o que existan ciertas condiciones en los pacientes que faciliten la diseminación de las cepas en la población. Solo la condición de tratamiento previo arrojó un valor de $p=0,05$ y $OR=4,05$ para el espiligotipo 93, que corresponde a la familia LAM5. Consideramos de suma importancia que se sigan realizando trabajos de este tipo que contribuyan con el conocimiento de la biodiversidad de los aislados clínicos que circulan en nuestras regiones.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una infección bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo Gram positivo, perteneciente al orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae (Balandrano *et al.*, 1996). Este microorganismo se caracteriza por ser aerobio, no esporulado, no capsulado, de multiplicación lenta, ya que su cromosoma se replica cada 18 a 25 horas y posee una pared celular con elevadas concentraciones de lípidos de alto peso molecular, que le confiere a la bacteria la característica de ser llamada también acidorresistente, es decir que el colorante fucsina no puede ser eliminado del microorganismo aún cuando es tratado con alcohol ácido (De La Parte *et al.*, 2001; Abbas *et al.*, 2002).

El género *Mycobacterium* incluye más de cien especies que se dividen en tres grupos: Complejo Tuberculosis, formado por *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG), *M. africanum*, *M. microti* (Casal, 1990), *M. caprae*, *M. Canetti* (Cole 2002) y recientemente identificada *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003). El otro grupo está formado por el Complejo Lepra, que incluye, *M. leprae* y *M. leprae-marinum*, causantes de la lepra en el hombre y en el ratón respectivamente; y el tercer grupo denominadas micobacterias “no tuberculosas”, donde se incluyen el resto de las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores (Rastogi *et al.*, 2001).

La tuberculosis es un ejemplo de infección causada por una bacteria intracelular, en la que coexisten la inmunidad protectora, que intenta eliminar al microorganismo y la hipersensibilidad patológica. Generalmente, la infección se localiza en los pulmones, pero puede afectar a otros órganos. Las lesiones son causadas principalmente por la respuesta del huésped (Abbas *et al.*, 2002).

La infección se produce frecuentemente por vía respiratoria y se transmite de persona a persona. Esta se inicia cuando una persona sana inhala gotas de saliva o aire con partículas infectadas por *M. tuberculosis*, las cuales por su pequeño tamaño evaden al sistema mucociliar y se depositan en los alvéolos y bronquiolos respiratorios. A partir de este momento, macrófagos y polimorfonucleares son los responsables de la primera línea de defensa

inespecífica para erradicar el microorganismo intracelular, a través de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno, interleucina-1(IL-1) y el factor de necrosis tumoral γ (TNF γ), que activan señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune (De La Parte *et al.*, 2001). Una vez que el macrófago alveolar fagocita a la bacteria, ésta puede sobrevivir en el interior del macrófago, multiplicándose lentamente. En esta etapa de infección primaria, más del 90% de los pacientes permanecen asintomáticos, pero las bacterias sobreviven en los pulmones (Abbas *et al.*, 2002).

Después de 6 a 8 semanas de iniciada la infección, se afectan los ganglios linfáticos locales y se activan las células T CD₄⁺, debido a la acción del macrófago que produce IL-1 para que estas células T acudan al sitio de infección, de tal forma que ocurra la presentación del antígeno a los linfocitos T CD₄⁺; estas células Th1 producen interferón γ (INF γ), que sirven para atraer y activar a otras células inflamatorias efectoras y aumenten su capacidad para destruir las bacterias fagocitadas. La continua activación de los linfocitos T conduce a la formación de granulomas con necrosis central, denominada necrosis caseosa, causada por productos de los macrófagos, esta necrosis sirve para eliminar los macrófagos infectados y proporciona un ambiente anóxico en el que el bacilo no se puede dividir, sin embargo, el microorganismo puede permanecer latente por décadas, todo depende de la eficacia de la respuesta inmune celular del hospedero que determina si la infección es detenida o si progresa, en este caso la infección es referida como latente y puede persistir durante toda la vida en el huésped en un estado asintomático (Abbas *et al.*, 2002; Smith, 2003).

En individuos con una eficiente inmunidad mediada por células, la infección podría ser detenida permanentemente, pero si el individuo infectado no puede controlar la infección inicial en el pulmón o si la infección es latente y el sistema inmune llega a debilitarse por la acción de drogas inmunosupresoras, infección por VIH, malnutrición u otros factores, el centro del granuloma puede comenzar a disolverse por un proceso desconocido lo que sirve como un medio rico en el cual la bacteria ahora reactivada puede replicarse. De este modo, los bacilos de *M. tuberculosis* viables pueden escapar del granuloma y desarrollarse dentro de los pulmones (tuberculosis pulmonar activa) o llegar a otros tejidos por vía del sistema linfático y de la sangre, produciendo tuberculosis extrapulmonar (Smith, 2003).

El cuadro clínico de la tuberculosis puede variar de intensidad, el comienzo suele ser insidioso y se manifiesta por síntomas inespecíficos como malestar general, pérdida de peso, tos y sudoración nocturna. La producción de esputo es escasa o bien sanguinolenta y purulenta. El diagnóstico clínico de rutina se confirma por los hallazgos radiológicos pulmonares, la positividad de las pruebas cutáneas y la detección por el laboratorio de micobacterias en el examen microscópico o el aislamiento en el cultivo (De la Parte *et al.*, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en abril de 1993, que la tuberculosis había adquirido carácter de urgencia mundial, debido principalmente a problemas en la administración de los programas de control, el crecimiento demográfico y el vínculo entre la tuberculosis y el virus de inmunodeficiencia humana. En 1997, la OMS notificó 7,96 millones de nuevos casos de tuberculosis, con una tasa de mortalidad del 23% (OMS, 2001). Para el año 2000, se declararon 8,4 millones de casos nuevos en el mundo y en la actualidad se conoce que cada año mueren alrededor de 2 millones de humanos por causa de la tuberculosis y se ha estimado que un tercio de la población está infectada con *M. tuberculosis* (Brudey *et al.*, 2004; Montoro *et al.*, 2004).

En Venezuela, de acuerdo a una evaluación realizada por el Programa Nacional de la Tuberculosis del MSDS, el número de casos reportados para el año 2001 fue de 6 110, lo que equivale a una tasa de morbilidad de 24,8 por 100 000 habitantes, ocupando el estado Delta Amacuro la mayor prevalencia (81,0 por 100 000 habitantes), seguido de Distrito Capital (63,3), Monagas (43), Portuguesa (38,6), Amazonas (34,5) y Sucre (34,4). Según este informe, la población que registra mayor riesgo de infección es el grupo de mayor de 65 años de edad, con una tasa de 91,7 por cada 100 000 habitantes (MSDS, 2002).

En el año 2004, se notificaron 6 519 nuevos casos de tuberculosis en el territorio nacional, los estados con mayor número de casos fueron: Distrito Capital (1 310), Zulia (838), Miranda (503), Carabobo (391), Portuguesa (312), Bolívar (278), Lara (270) y Sucre (265). En el estado Sucre, durante el año 2004, el mayor registro fue en los municipios Sucre (165), Bermúdez (27), Montes (27) y Valdez (11) (MSDS, 2006). Sin embargo, 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, siendo los estados más afectados: Distrito Capital (740), Zulia (434), Miranda (354), Carabobo (274), Lara (175), Anzoátegui (165), Portuguesa (156), Bolívar (150) y Sucre (132). En nuestro estado, los municipios con mayor número de casos continúan siendo Sucre (87), Bermúdez (11) y Montes (8). El municipio Valdez no reportó su situación epidemiológica (MSDS, 2007).

El tratamiento de la tuberculosis se ha dividido en dos grupos: medicamentos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida) y de segunda línea (kanamicina, amikacina, etionamida y fluoquinolonas) (De La Parte *et al.*, 2001; Coll, 2003; Lado *et al.*, 2004). En Venezuela, desde 1982 está normado el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), recomendado por la OMS como estrategia fundamental para el control de la tuberculosis (Guilarte, 2001).

La aparición de resistencia por parte de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas es un hecho conocido desde el uso de los primeros fármacos antituberculosos (March, 1994; MSDS, 1998). La introducción de la estreptomina determinó dramáticos éxitos terapéuticos que luego se transformaron en recaídas, a medida que surgían bacilos resistentes, esta situación mejoró cuando se iniciaron los esquemas terapéuticos combinados al disponer del ácido paraaminobenzoico y luego la isoniacida (MSDS, 1998).

La resistencia de *M. tuberculosis* a la quimioterapia antituberculosa puede ser primaria o secundaria, también llamada adquirida. La primaria se define como aquella en la que se aíslan cepas resistentes en pacientes que nunca antes han recibido tratamiento antituberculoso, mientras que la secundaria es la consecutiva a una quimioterapia incorrecta, provocada por la utilización de un esquema terapéutico inicial erróneo, una indicación inadecuada del tratamiento de infección tuberculosa (quimioprofilaxis) al no descartar enfermedad activa, o un incumplimiento del tratamiento (Lado *et al.*, 2004).

Las causas más comunes de resistencia secundaria o adquirida de *M. tuberculosis* son los inadecuados regímenes quimioterapéuticos y el incumplimiento del tratamiento por parte

de los pacientes durante la terapia (Mahmoudi & Iseman, 1993). Otro evento importante, que conlleva al desarrollo de cepas *M. tuberculosis* resistentes, tiene que ver con el suministro de drogas de mala calidad (WHO, 2004).

Estudios genéticos han demostrado que la resistencia a los fármacos antituberculosos se produce como consecuencia de la aparición de mutaciones cromosómicas espontáneas en los genes que codifican la diana del fármaco o enzimas implicadas en la activación del mismo (Ramaswamy & Musser, 1998; Quirós *et al.*, 2001; Somoskovi *et al.*, 2001). La frecuencia de aparición de mutantes resistentes varía dependiendo del fármaco: aproximadamente 10^{-6} para isoniacida, estreptomycin y etambutol y 10^{-8} para la rifampicina. Los bacilos resistentes generados durante el proceso replicativo de *M. tuberculosis* conviven con una población de bacilos sensibles que son eliminados durante la terapia, dando como resultado la selección de cepas resistentes. Por este motivo, el tratamiento de la tuberculosis se basa en la asociación de un determinado número de fármacos con mecanismos de acción diferentes para evitar la aparición de resistencia (De La Parte *et al.*, 2001; Quirós *et al.*, 2001).

La rifampicina es un antibiótico macrocíclico semi-sintético, producido a través de un proceso de fermentación del *Streptomyces mediterranei* (Martínez *et al.*, 2001), usado en el tratamiento antituberculoso desde el inicio de los años 70. El blanco de acción del fármaco es a través de su unión a la subunidad β de la ARN polimerasa de tal manera que actúa como potente inhibidor de la síntesis de ARN mensajero y por consiguiente, interfiere en el proceso de transcripción (Quirós *et al.*, 2001; Coll, 2003). Las bases genéticas para la resistencia a la rifampicina en la mayoría de los aislados del complejo *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco, es la mutación en el gen *rpoB*, el cual codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (Telenti *et al.*, 1997). Aproximadamente, el 95% de las cepas resistentes a rifampicina presentan una mutación en la región de 69 pb, correspondiente a los codones 511 a 533 del gen *rpoB* (Watterson *et al.*, 1998). Otros estudios, demuestran que alrededor del 95 al 98% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina presentan una mutación en la región de 81 pb del gen *rpoB* (Telenti *et al.*, 1993; Kapur *et al.*, 1994; Musser, 1995; Hirano *et al.*, 1999).

Actualmente, la resistencia a la rifampicina se considera como un marcador de multiresistencia, ya que la resistencia a este fármaco raramente se presenta sola y frecuentemente viene asociada con resistencia a la isoniacida (Goble *et al.*, 1991; Cole & Telenti, 1995; Drobniewski & Wilson, 1998; Quirós *et al.*, 2001).

En un estudio efectuado a nivel mundial entre los años 1996 y 1999, en el que participaron 58 países, la mayor prevalencia de resistencia primaria la presentó Estonia (36,9%). En dicho estudio, Venezuela obtuvo una prevalencia de 4,1% en resistencia primaria, 16,7% en resistencia secundaria y 8,3% de multiresistencia en casos de tuberculosis previamente tratados (Espinal *et al.*, 2001). El estudio más reciente sobre resistencia a las drogas antituberculosas realizado en Venezuela, durante 1998-1999, empleando el método de las proporciones de Canetti para determinar sensibilidad y/o resistencia a las drogas antituberculosas, 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%) (MSDS, 2000).

Para establecer la sensibilidad o la resistencia de una cepa de *M. tuberculosis* a las distintas drogas antituberculosas, se ha usado el método de las proporciones como técnica de referencia (Canetti *et al.*, 1963; WHO, 2003). Este método es altamente reproducible y de elevada correlación clínica, su desventaja principal radica en el tiempo prolongado que este método requiere para emitir los resultados (WHO, 2003). Se han implementado otras técnicas que reducen el tiempo de obtención de los resultados, tales como el método de nitrato reductasa (Angeby *et al.*, 2002), la técnica basada en la reducción de alamar azul (Porrás *et al.*, 2005) y el sistema radiométrico BACTEC, este último ofrece resultados en poco tiempo, pero sus mayores inconvenientes son el uso de material radioactivo y su elevado costo (Tortoli *et al.*, 2002).

La identificación de alteraciones concretas en el genoma de *M. tuberculosis* relacionadas con la resistencia a la terapia antituberculosa, ha condicionado el desarrollo de diferentes técnicas genéticas. El primer paso es común en todas estas técnicas, consiste en la

destrucción de la pared celular y la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones que contienen las mutaciones responsables (Felmlee *et al.*, 1995). Diversos ensayos han sido usados para investigar las mutaciones del gen *rpoB*, incluyendo el análisis heteroduplex (Williams *et al.*, 1994), el polimorfismo conformacional de cadena simple (PCR-SSCP) (Telenti *et al.*, 1993), el ensayo de hibridación reversa basada en PCR (LiPA) (Cooksey *et al.*, 1997) y la secuenciación de ADN (Kapur *et al.*, 1994), siendo esta última considerada el estándar de oro para la detección de mutaciones, ya que proporciona una identificación definitiva de cualquier mutación presente (Watterson *et al.*, 1998).

La epidemiología molecular es una mezcla de la biología molecular y de epidemiología convencional, es el estudio de la distribución y de los determinantes de la ocurrencia de una enfermedad en las poblaciones humanas, valiéndose para ello de técnicas moleculares (Kato *et al.*, 2000 & Narayanan, 2004).

Durante la década pasada, se desarrollaron métodos de epidemiología molecular con el propósito de revelar las características epidemiológicas de la tuberculosis e identificación de los factores de riesgo que están asociados con la diseminación de cepas multiresistentes a drogas (Möstrom *et al.*, 2002). El método considerado como estándar de oro para el estudio de la epidemiología de la enfermedad, es a través del análisis del *IS6110*, basado en el polimorfismo de longitud de los fragmentos producidos usando enzimas de restricción (RFLP). Sin embargo, este método podría ser exitosamente reemplazado por métodos basados en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), tales como el Spoligotyping y el análisis de un número variable de repetidos en serie del ADN (VNTR), ambos métodos tienen altos índices discriminatorios y de reproducibilidad cuando son usados de forma combinada (Filliol *et al.*, 2000).

El espiligotipaje o Spoligotyping, es un método que estudia la presencia o ausencia de las 43 secuencias espaciadoras localizadas en la región de repetidos directos de *M. tuberculosis* y surge en la búsqueda de otro marcador diferente a *IS6110*, para utilizarse como segundo método de genotipaje en la identificación de aquellas cepas con bajo número de copias de la secuencia de inserción *IS6110* (Van Soolingen, 2001); siendo esta una de las

ventajas de la aplicación de esta técnica, utilizada en el mundo como herramienta en investigaciones epidemiológicas y desarrollo de programas de prevención (Filliol *et al.*, 2003).

Debido a que la tuberculosis representa un problema de salud a nivel mundial, siendo la problemática aún mayor en los países en desarrollo en donde las bajas condiciones socioeconómicas, las deficiencias en los programas de control, sobre todo en la localización oportuna de casos y la presencia de resistencia por parte de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas, factores que inciden marcadamente en el incremento de la enfermedad y motivo de preocupación, se hace necesario llevar a cabo un estudio para evaluar la susceptibilidad a las drogas empleadas para el tratamiento de la enfermedad, en especial la resistencia a la rifampicina, así como también conocer sobre la epidemiología molecular de las cepas que se encuentran en la zona en estudio. Con estos aspectos a evaluar se persigue obtener información valiosa que contribuya a mejorar el control de la tuberculosis en el estado Sucre a través de la evaluación de la eficiencia del tratamiento actualmente empleado.

OBJETIVOS

General

Evaluar la susceptibilidad a drogas antituberculosas, las características epidemiológicas y moleculares de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en poblaciones endémicas del estado Sucre.

Específicos

1. Evaluar la prevalencia de resistencia primaria y secundaria a antimicrobianos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycin).
2. Comparar dos métodos para la determinación de resistencia a antimicrobianos de primera línea, tales como el método de proporciones de Canetti y un método alternativo (nitrato reductasa).
3. Analizar la secuencia del gen *rpoB* para determinar la existencia de mutaciones involucradas en la resistencia a la rifampicina.
4. Determinar el patrón molecular de las cepas aisladas utilizando la técnica de spoligotyping.
5. Relacionar las características epidemiológicas de los pacientes con las características genéticas de las cepas de *M. tuberculosis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Para la realización de esta investigación se recolectaron muestras de esputos tomadas por expectoración, de pacientes con sintomatología respiratoria procedentes del servicio de tuberculosis del Hospital Dr. Julio Rodríguez de Cumaná (municipio Sucre), del Hospital Dr. Luís Daniel Beauperthuy de Cumanacoa (municipio Montes) y del Hospital Santos Aníbal Dominici de Carúpano (municipio Bermúdez) (Figura 1), durante el periodo de agosto 2005 – diciembre 2006.

Se tomaron en consideración ciertas características con el fin de realizar la selección de los pacientes: el grupo para resistencia primaria fueron pacientes de ambos sexos y de cualquier edad, con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, con resultados de baciloscopia (BK) positiva y demostración bacteriológica (cultivo positivo), sin antecedentes de tratamiento antituberculoso o quimioprofilaxis anterior o en el momento de la toma de muestra. En cuanto al grupo para resistencia secundaria, se tomaron pacientes de ambos sexos y de cualquier edad, con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, con resultados de baciloscopia positiva y demostración bacteriológica, con antecedentes de haber recibido tratamiento antituberculoso normado, pacientes con recidivas, recuperación de abandono, crónicos y fracaso de tratamiento.

En una hoja de registro de pacientes (anexo 1), se recopilaron los datos epidemiológicos de los pacientes incluidos en el estudio, siguiendo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki del Consejo Internacional de Organizaciones de las Ciencias (CIOMS, 1993), cada individuo firmó el consentimiento escrito de participación voluntaria (anexo 2).

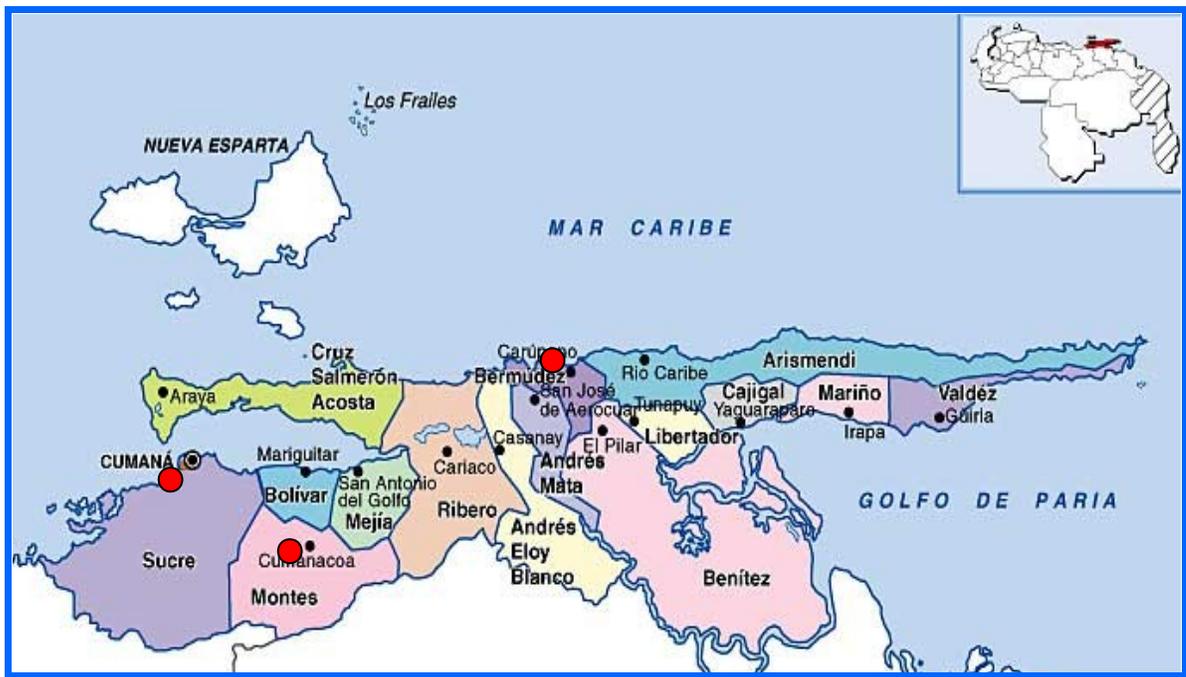


Figura 1. Ubicación geográfica de los hospitales de donde provenían las muestra de los pacientes (marcadas en rojo).

Diagnóstico microscópico o baciloscopia

Se realizaron extendidos de las muestras de esputos de los pacientes y luego se fijaron con calor mediante 2 ó 3 pasos rápidos sobre una llama. Las láminas fijadas fueron coloreadas con la tinción de Ziehl-Neelsen, para ello se cubrió la totalidad de la superficie del extendido con el colorante fucsina durante 7 min., en este tiempo se pasó lentamente el mechero por debajo de la lámina, aproximadamente 3 veces hasta que se produjo la emisión de vapores, posteriormente se lavó la lámina con agua y se le colocó alcohol ácido durante 2 minutos, se lavó nuevamente con agua y se le añadió azul de metileno durante 30 segundos. Finalmente, se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Las láminas se examinaron al microscopio con el objetivo de 100X usando aceite de inmersión, buscando la presencia de bacilos delgados, teñidos de color rojo. El informe de los resultados de la baciloscopia se realizó de la siguiente forma (MSAS; 1996):

Negativo (-): cuando no se encontraron bacilos ácido-alcohol resistente en cien campos observados.

Positivo (+): al menos un bacilo ácido-alcohol resistente por campo, en cien campos observados.

Positivo (++) : de uno a diez bacilos ácido-alcohol resistentes por campo, en cincuenta campos observados.

Positivo (+++): más de diez bacilos ácido-alcohol resistentes por campo, en veinte campos observados.

Cultivo

Un total de 59 muestras que resultaron con baciloscopia positiva, fueron cultivadas en los medios de cultivo: Lowenstein-Jensen y Ogawa. Antes de realizar la siembra en los diferentes medios de cultivo, las muestras fueron descontaminadas por el método de Ogawa-Kudoh (Vargas *et al.*, 1990), con el fin de eliminar la flora asociada. Para ello se tomó la muestra con dos hisopos estériles y cada uno de éstos se introdujo en un tubo de ensayo que contenía 2 ml de hidróxido de sodio al 4%, durante 2 min. Al cabo de este tiempo, se retiró el hisopo y se realizó la siembra en los diferentes medios con movimientos de rotación y ligera presión.

Una vez realizada la siembra, los tubos se incubaron a 37°C en una estufa de incubación. Las revisiones de los mismos se realizó a los 4, 7, 15, 30, 45 y 60 días de incubación. Las observaciones del diagnóstico microscópico y del cultivo se registraron en una hoja de registro de BK y cultivo (anexo 3).

Pruebas de susceptibilidad

De las 59 muestras cultivadas, solo 46 cultivos resultaron viables para las pruebas de resistencia, los 13 cultivos restantes fueron excluidos del estudio por presentar aislamientos insuficientes (2 a 4 colonias) o presentar contaminación.

Se emplearon dos métodos para las pruebas de susceptibilidad:

- **Método de las proporciones de Canetti** (Canetti *et al.*, 1963).

El método consiste en determinar en una cepa, la proporción de mutantes resistentes para cada droga. Para este método se empleó el medio Lowenstein-Jensen sin droga (control), que permite conocer el número total de la población bacilar sembrada y medios Lowenstein-

Jensen con adición de las drogas (isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycin) que permite observar el número de mutantes resistentes.

Este método fue realizado en el Laboratorio de Referencia de la Tuberculosis (El Algodonal, Caracas). Para ello, se transportaron los cultivos primarios (no repique) y los mismos no debían tener más de 40 días desde la siembra hasta el crecimiento de las micobacterias, con el fin de evitar su desecación y contaminación.

Para llevar a cabo la técnica, se realizó inicialmente una suspensión madre, a partir del cultivo de la cepa en estudio. Con un asa metálica se tomó el mayor número posible de colonias desarrolladas (cultivo) y se colocó en un frasco que contenía perlas de vidrio al que previamente se le añadió 5 gotas de agua destilada estéril, luego se agitó el frasco durante dos minutos y se le agregó posteriormente 4 ml de agua destilada, se agitó nuevamente hasta obtener una suspensión homogénea, esta suspensión se dejó sedimentar durante 60 segundos y luego, con una pipeta pasteur se retiró la parte homogénea y se colocó en un tubo, a este tubo se le añadió poco a poco agua destilada, hasta que la opacidad de esta suspensión (suspensión madre) se ajustó a la de un patrón Mc Farland N°1. A partir de esta suspensión madre de la cepa en estudio, se prepararon seis nuevas suspensiones en escala decimal, utilizando 6 tubos que contenían 9 ml de agua destilada rotulados de 10^{-1} a 10^{-6} .

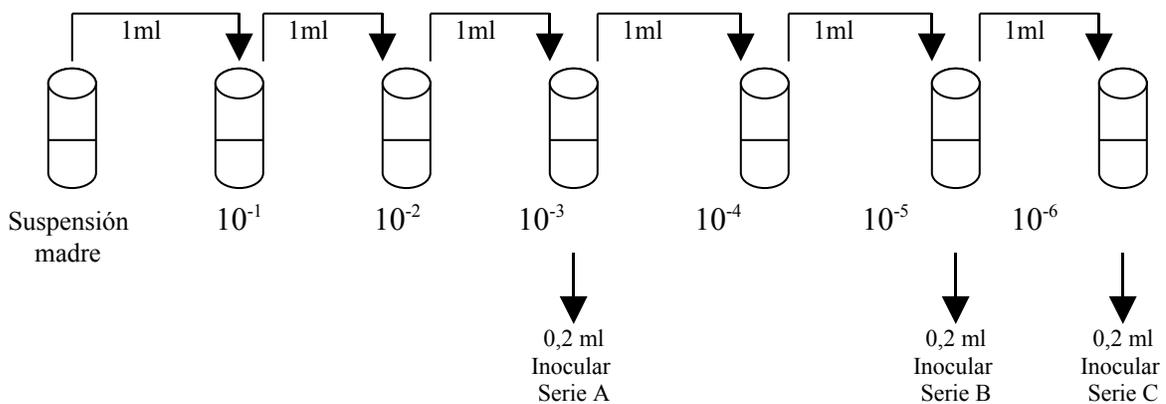


Figura. 2. Esquema para la preparación de las diluciones de los cultivos utilizadas en el método de las proporciones (Canetti *et al.*, 1963).

Una vez realizadas las seis suspensiones decimales (figura 2), se prepararon tres series de tubos (A, B y C) con medio Lowenstein-Jensen sin droga (controles) y los tubos con el medio que contenía la droga, con la concentración descrita en la tabla 1.

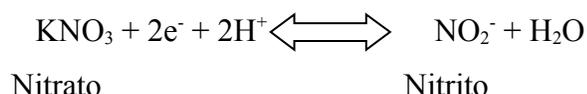
Tabla 1. Concentraciones de las drogas antituberculosas utilizadas en las series de diluciones de cultivo para la determinación de la susceptibilidad por el método de las proporciones (Canetti *et al.*, 1963).

	Control	Medio con droga			
		Isoniacida	Rifampicina	Etambutol	Estreptomina
Serie A	2 tubos L.J	0,2 µg/ml	40,0 µg/ml	2,0 µg/ml	4,0 µg/ml
Serie B	2 tubos L.J	0,2 µg/ml	40,0 µg/ml	2,0 µg/ml	4,0 µg/ml
Serie C	2 tubos L.J				

La serie A, rotulada 10^{-3} , correspondía a los tubos con medio de cultivo sin droga (tubos control) y cada una de las drogas en estudio. Los tubos control se colocaron uno en cada extremo de la serie. La serie B, rotulada 10^{-5} , igual a la anterior y la tercera serie rotulada 10^{-6} , tenía sólo dos tubos con medio sin droga. Cada uno de los tubos, se sembraron con 0,2 ml de la suspensión 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} , según la serie. Finalmente, los tubos se colocaron en posición inclinada a 37°C y las observaciones se realizaron a los 28 y 42 días. El crecimiento en el medio que contiene la droga en estudio define el estado de resistencia de la cepa.

- **Método alternativo: Prueba de nitrato reductasa** (Angeby *et al.*, 2002).

El método se basa en la capacidad de *M. tuberculosis* de reducir nitratos a nitritos, debido a la acción de la enzima nitrato reductasa



La actividad de la nitrato reductasa se detecta por la adición de un reactivo revelador (ácido clorhídrico 50%, sulnilamida 0,2% y dihidrocloruro N-(1-naftil) etilendiamina 0,1%) que pone en evidencia la reducción de nitratos a nitritos por la aparición de un color rojo (prueba positiva).

Para llevar a cabo esta prueba, se preparó inicialmente una suspensión madre, para ello se tomó el mayor número posible de colonias desarrolladas en el medio de cultivo Ogawa y se colocaron en un tubo al que previamente se le había añadido unas gotas de agua destilada estéril. Este tubo se agitó manualmente durante un minuto y luego se le agregó aproximadamente 3 ml de agua destilada estéril, nuevamente agitando el tubo pero ahora con

vortex para homogenizar y se dejando en reposo durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo, se tomó la parte homogénea y se colocó en un tubo, al cual se le fue agregando agua destilada estéril, hasta que su opacidad se ajustó a la de un patrón N° 1 de Mac Farland, que tiene una turbidez semejante a la de una solución de 1 mg de masa bacteriana suspendida en 1 ml de agua destilada. 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 µl 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 µl de la solución madre sin diluir en los tubos Lowenstein-Jensen con antibiótico (isoniacida 0,2 µg/ml, rifampicina 40,0 µg/ml, etambutol 2,0 µg/ml y estreptomycin 4,0 µg/ml). 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 resultara 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.
- ±: 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.

Extracción de ADN para la secuenciación.

Se realizó la extracción del ADN de las cepas que resultaron resistente a rifampicina en este estudio, así como de 2 cepas controles positivos (1 cepa MDR de Bélgica y 1 cepa resistente a rifampicina del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Caracas) y 1 cepa H₃₇RV sensible (control negativo), utilizando el kit de extracción de ADN genómico Wizard (Promega), cumpliendo con el siguiente protocolo, según las especificaciones del fabricante:

1. Se transfirió con un aplicador de madera esteril dos colonias aproximadamente, a un tubo eppendorf que contenía 400 µl de solución lisante de células.
2. Se incubó durante 5 min. a 80°C con el propósito de destruir las células, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3. Se añadió 150 µl de solución precipitante de proteínas, se agitó en un vortex durante 20 seg.
4. Se incubó en hielo durante 5 min.
5. Se centrifugó a 20.000 g, durante 5 min. a 4 °C.
6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga que contenía 600 µl de isopropanol.
7. Se mezcló lentamente y se centrifugó a 20.000 g, durante 15 min. a 4 °C.
8. Se descartó el sobrenadante y se añadió 600 µl de etanol al 70%, luego se centrifugó a 20.000 g, durante 3 min.
9. Se descartó el etanol y se dejó secar a 37 °C.
10. Se resuspendió en 100 µl de solución rehidratante y se incubó a temperatura ambiente hasta el día siguiente.
11. Se guardó el ADN a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez realizada la extracción y purificación del ADN de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, se procedió a realizar la amplificación de un fragmento de 350 pb de una región conservada dentro del gen *rpoB*. Para ello se usaron los siguientes *primers* (Kapur *et al.*, 1994):

rpoBF: 5' GGGAGCGGATGACCACCCA 3'

rpoBR: 5' GCGGTACGGCGTTTCGATGAAC 3'

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 100 µl, utilizando 5 µl de ADN (100 ng aproximadamente), 20 µl 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), 2 mmol/l de MgCl₂, 200 µmol/l de cada desoxirribonucleotido trifosfato; 0,5 µmol/l de cada *primer* 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 minutos 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 µg/mL en buffer TBE 1X durante 45 min a 100 volts. El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Secuenciación

Los productos de la PCR de las cepas resistentes a la rifampicina, fueron purificados usando el Kit QIAquick (Qiagen). Para lograr dicha purificación se procedió de la siguiente forma: en una columna se agregó 100 µl de producto de la PCR y 500 µl de buffer PBI, posteriormente se centrifugó a 3 000 g durante 2 min., luego se descartó la solución que se depositó en la parte inferior de la columna y se añadió 750 µl de buffer PE, se centrifugó a 3 000 g durante 2 min., se descartó la solución y se centrifugó nuevamente a 3 000 g durante 2 min., se descartó el tubo inferior de la columna y en su lugar se colocó un tubo eppendorf estéril. Para eluir el ADN, se agregó 30 µl de H₂O estéril en el centro de la columna, finalmente se centrifugó a 20 000 g durante 5 min. El ADN depositado en el tubo eppendorf fue llevado al Servicio del Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), para su secuenciación, utilizando los primers rpoBF o rpoBR.

Spoligotyping

Se les realizó la caracterización molecular a las 46 cepas incluidas en el estudio de susceptibilidad, empleando la técnica de Spoligotyping, basado en PCR y usado para detectar y genotipificar simultáneamente micobacterias que pertenecen al complejo de *M. tuberculosis*.

Este método se basa en el polimorfismo del ADN presente en la región de repetidos directos (DR), la cual se encuentra presente únicamente en las micobacterias que pertenecen al complejo *M. tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997).

Por este método también se puede detectar la presencia o ausencia de espaciadores de secuencias conocidas. El primer paso en el método es amplificar por PCR la región de repetidos directos de una cepa dada. Los *primers* usados son basados en la secuencia de

repetidos directos e incluye la amplificación de los espaciadores entre los blancos de repetidos directos. Un *primer* marcado con biotina es usado, así que todos los fragmentos sintetizados quedan marcados con biotina. Los oligonucleótidos derivados de espaciadores conocidos en la agrupación de repetidos directos son covalentemente ligados en líneas paralelas a una membrana Biodina C activada.

Esta técnica se realizó en el laboratorio de tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Caracas. El primer paso consistió en la extracción del ADN. Para llevar a cabo dicha extracción, se procedió a tomar con un aplicador de madera estéril 3 colonias de la cepa a identificar y se resuspendió en 100 µl de buffer TE (10 mol/L tris-HCl; 1 mol/L EDTA pH 8,0), luego se hirvió durante 10 min y se centrifugó durante 10 min a 20 000 g. El sobrenadante que contenía el ADN se almacenó a -20°C hasta su uso. Para conservar todas las cepas estudiadas, éstas fueron codificadas en dicho laboratorio, conservadas en glicerol al 10% y congeladas a -70°C.

Para realizar la amplificación, se usaron los *primers* DRa y DRb, los cuales son capaces de amplificar la región de repetidos directos:

DRa: 5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3' (Bionitilado en el extremo 5')

DRb: 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3'

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50µl, utilizando una mezcla de reacción:

5 µl de ADN purificado (aproximadamente 50 ng).

4 µl de *Primer* DRa (20 pmol).

4 µl de *Primer* DRb (20 pmol).

5 µl de MgCl₂.

200 µmol/l de cada desoxirribonucleótido trifosfato.

1 U *Taq* polimerasa (5 unidades/ml).

5 µl de buffer de *GoTaq* 10X.

Se usó un termociclador Peltier Termal Cycler (PTC-100TM) para amplificación de la región DR. El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo a 96 °C por 3 min. para la

desnaturalización inicial, 35 ciclos a 96 °C por 1 min., para la desnaturalización, 55°C por 1 min., para la hibridación de los *primers*, 72 °C por 30 seg., para la extensión y 1 ciclo a 72°C por 5 min., para la extensión final.

Para la hibridación y detección de los productos de la PCR, se procedió de la siguiente forma:

1. Se prepararon los buffers y se mantuvieron a las temperaturas adecuadas: 500 ml 2X SSPE-SDS al 0,1%, a 60°C; 500 ml 2X SSPE0-SDS al 0,5%, a 60°C; 500 ml 2X SSPE-SDS 0,5%, a 42°C y 500 ml 2X SSPE a temperatura ambiente.
2. Se añadió 50 µl de los productos de la PCR a 150 µl de SSPE-SDS al 0,1%.
3. Se desnaturalizaron por calor los productos durante 10 min a 99 °C y luego se colocaron inmediatamente en hielo.
4. Se lavó 2 veces la membrana durante 5 min. a 60 °C en 250 ml 2X SSPE- SDS al 0,1%.
5. Se colocó la membrana en el soporte de goma del minibloter, de tal manera que los canales quedaran perpendiculares a la línea patrón de oligonucleótidos.
6. Se removió por aspiración el fluido de los canales.
7. Se cargaron los canales con los productos diluidos evitando la formación de burbujas en dichos canales y se dejó hibridizar en un horno de hibridación (Amershan Pharmacia Biotech) por 60 min. a 60 °C. El proceso de carga de las muestras se realizó de izquierda a derecha, en el primer y último carril se cargó con buffer, el segundo con un control positivo de la cepa de referencia H₃₇Rv, el tercero con un control positivo de *M. Bovis* (BCG) y el cuarto con agua (control negativo), a partir del quinto en adelante se cargaron las muestras de las cepas estudiadas.
8. Se removieron las muestras del minibloter lentamente por aspiración y se retiró la membrana.
9. Se lavó la membrana 2 veces en 250 ml 2X SSPE-SDS al 0,5% por 10 min. a 60°C.
10. Se colocó la membrana en un cilindro de vidrio y se dejó enfriar para evitar la inactivación de la misma.
11. Se preparó una solución, añadiendo 2,5 µl del conjugado estreptavidina peroxidasa (500 U/ml) a 10 ml de 2X SSPE-SDS al 0,5% y dentro de un horno de hibridación se incubó la membrana en dicha solución por 60 min. a 42 °C en un cilindro de vidrio.

12. Se lavó la membrana 2 veces en 250 ml de 2X SSPE-SDS al 0,5% por 10 min. a 42 °C.
13. Se lavó la membrana 2 veces en 250 ml de 2X SSPE por 10 min. a temperatura ambiente.
14. En una habitación oscura, se incubó la membrana durante 2 min. en un reactivo revelador, luego en el reactivo fijador durante 1 min. y finalmente en agua.
15. Se colocó la membrana dentro de un sistema cerrado (casette) y se cubrió con un plástico, luego sobre el plástico se colocó una película Hyperfilm ACL RPN de Amershan.
16. Se realizó la lectura de cada uno de los patrones de hibridación obtenidos, desde el primer espaciador hasta el espaciador 43.
17. Los resultados se registraron y se ordenaron en una base de datos en Excel.
18. Los patrones obtenidos fueron analizados con la base de datos internacional SpolDB4 (Brudey *et al.*, 2006), con el propósito de realizar la identificación de los aislados y de agrupar las cepas de acuerdo a su espoligotipo.

Análisis de los datos

Se calcularon las frecuencias para la susceptibilidad a las drogas antituberculosas. La comparación de los métodos de determinación de la susceptibilidad de las proporciones de Canetti y de nitrato reductasa se hizo a través de la prueba de kappa (Landis & Koch, 1977), con un nivel de confianza del 95%, para determinar la concordancia entre estos métodos. Además, se aplicó una prueba de regresión logística binaria con un nivel de confianza del 95%, para asociar la presencia de un espoligotipo en particular con las variables clínico-epidemiológicas. Aquellas asociaciones que resultaron positivas se les calculó la razón de probabilidad (OR) para estimar el efecto de una variable sobre la presencia de la otra. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.5.

RESULTADOS

Prevalencia.

Los resultados de prevalencia obtenidos en esta investigación empleando el método de las proporciones de Canetti como prueba de referencia, se resumen en la tabla 2. De las 46 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas, 32 pertenecían a pacientes clasificados como casos nuevos, es decir pacientes sin antecedentes de haber recibido tratamiento antituberculoso. De este grupo, 30 cepas (93,7%) resultaron sensibles a las cuatro drogas ensayadas y 2 presentaron resistencia a una droga (estreptomomicina), es decir que se encontró un 6,3% en resistencia primaria. Con respecto a la susceptibilidad en pacientes previamente tratados, de las 14 cepas estudiadas, 12 resultaron sensibles (85,7%) y 2 resistentes, lo que demuestra una prevalencia de resistencia secundaria o adquirida de 14,3%. De las 2 cepas resistentes, 1 presentó resistencia a la estreptomomicina y la otra fue considerada MDR, ya que mostró resistencia tanto a la rifampicina como a la isoniacida.

Tabla 2. Prevalencia de resistencia a medicamentos antituberculosos por el método de las proporciones, de pacientes procedentes del servicio de tuberculosis del Hospital Dr. Julio Rodríguez de Cumaná, del Hospital Dr. Luís Daniel Beauperthuy de Cumanacoa y del Hospital Santos Aníbal Dominici de Carúpano, entre agosto 2005 y diciembre 2006.

	Casos nuevos		Casos previamente tratados	
	N	%	n	%
Cepas estudiadas	32	100	14	100
Susceptibles	30	93,7	12	85,7
Cualquier resistencia	2	6,3	2	14,3
Resistencia a 1 medicamento	2	6,3	1	7,1
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: estreptomomicina.

Comparación de pruebas de susceptibilidad.

Al comparar dos métodos para la determinación de susceptibilidad a las drogas antituberculosas de primera línea, como lo son el método de las proporciones de Canetti y la prueba de Nitrato Reductasa, los resultados presentados en la tabla 3, evidencian que para la isoniacida, 1 cepa fue identificada como resistente y 45 como susceptibles por ambos métodos. Para la rifampicina, tanto por el método de las proporciones como por el método nitrato reductasa, 45 cepas resultaron sensibles y 1 resistente. En cuanto al etambutol, por los dos 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 estas sensibles por el método nitrato reductasa.

Tabla 3. Resultados de sensibilidad y resistencia de la prueba nitrato reductasa al ser comparada con el método de las proporciones.

Droga	Método proporciones	Nitrato Reductasa		Concordancia	Valor kappa
		Resistentes	Susceptibles		
INH	Resistentes	1	0	100%	1,0
	Susceptibles	0	45		
RIF	Resistentes	1	0	100%	1,0
	Susceptibles	0	45		
EMB	Resistentes	0	0	100%	1,0
	Susceptibles	0	46		
STR	Resistentes	1	2	95,65%	0,96
	Susceptibles	0	43		

INH: isoniacida, RIF: rifampicina, EMB: etambutol, STR: estreptomycinina.

Al aplicar el método estadístico de kappa, los resultados mostrados en la tabla 3, se evidencia que se encontró una buena concordancia entre el método nitrato reductasa y el método de las proporciones.

La cepa de *M. tuberculosis* que resultó resistente a rifampicina en este estudio, fue amplificada por PCR para una secuencia específica del gen *rpoB*, junto con 3 cepas controles de *M. tuberculosis*. En la figura 3, se aprecia el resultado de la amplificación que produjo un fragmento de 350 pares de bases, según lo esperado. Se utilizaron 2 cepas como controles positivos, resistentes a rifampicina. La primera, cepa MDR de Bélgica (BELG) y la segunda, procedente del Laboratorio de Tuberculosis del Dr. Jacobus de Waard (CCS). También se utilizó la cepa H₃₇Rv sensible como control negativo.

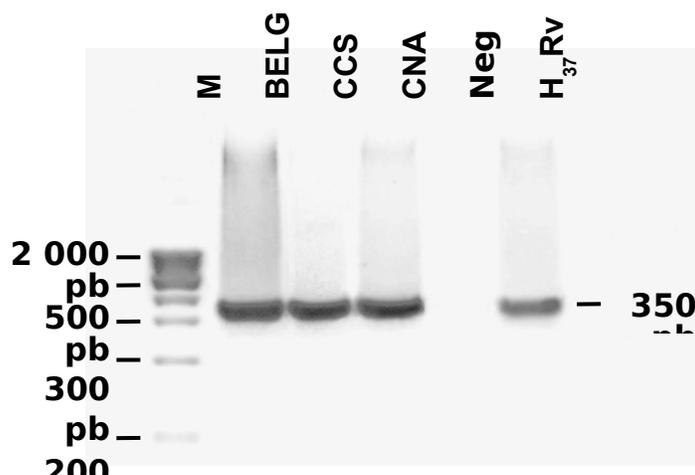


Figura 3. Producto de la amplificación por PCR del gen *rpoB* de *M. tuberculosis*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio. BELG y CCS (cepas resistentes a rifampicina de Bélgica y Caracas, respectivamente) y CNA (cepa resistente a rifampicina aislada en nuestro estudio, agua (neg) y H₃₇Rv cepa sensible (control negativo). M: marcador de peso molecular de 100pb (Promega).

Secuenciación

En las figuras 4 (electroferograma) y 5 (comparación de secuencias), se muestran los resultados de la secuenciación de los productos de amplificación, observándose las siguientes mutaciones: 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, el cambio fue His-Asp (CAC-GAC) y la cepa aislada en nuestro estudio, también es evidente la existencia de una mutación en el codón 456, donde se produjo un cambio de Ser-Gln (TCG-CAG)

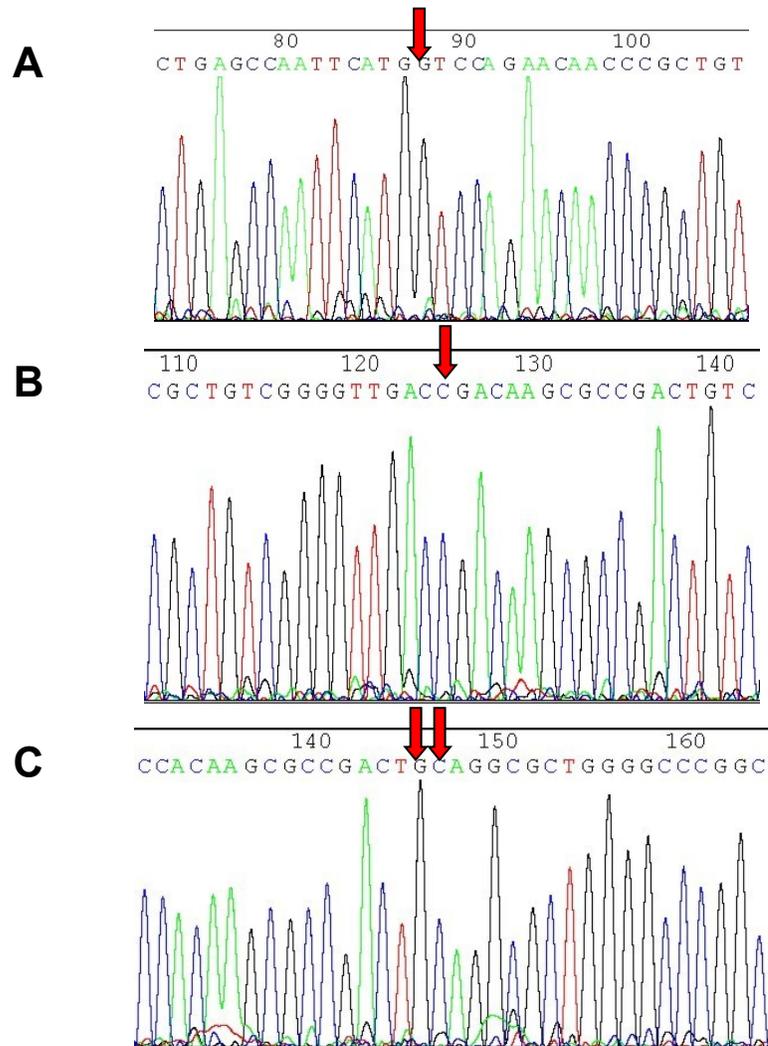


Figura 4. Electroferograma de las secuencias del fragmento amplificado a partir de las muestras BELG (A), CCS (B) y CNA (C), utilizando el primer rpoBF. La codificación de las bases es A: adenina (Color verde), C: citosina (Azul), G: guanina (Negro) y T: timina (Rojo). El tamaño de los picos corresponde a la intensidad de la fluorescencia de cada fragmento. La flecha muestra la posición de las bases mutadas.

GenBank AE000516	GAGCGGATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTTCGCC
Control H37Rv S	GAGCGGATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTTCGCC
Control Bélgica R	GAGCGGATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTTCGCC
Control Caracas R	GAGCGGATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTTCGCC
Muestra Cumaná R	GAGCGGATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTTCGCC

	E R M T T Q D V E A I T P Q T L I N I R P V V A
GenBank AE000516	GCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Control H37Rv S	GCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Control Bélgica R	GCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Control Caracas R	GCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Muestra Cumaná R	GCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG

	A I K E F F G T S Q L S Q F M D Q N N P L S G L
GenBank AE000516	ACCCACAAGCGCCGACTGTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Control H37Rv S	ACCCACAAGCGCCGACTGTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Control Bélgica R	ACCCACAAGCGCCGACTGTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Control Caracas R	ACCCACAAGCGCCGACTGTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG
Muestra Cumaná R	ACCCACAAGCGCCGACTGTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTG

	T H K R R L S A L G P G G L S R E R A G L E V R
GenBank AE000516	GACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTGATC
Control H37Rv S	GACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTGATC
Control Bélgica R	GACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTGATC
Control Caracas R	GACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTGATC
Muestra Cumaná R	GACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTGATC

	D V H P S H Y G R M C P I E T P E G P N I G L I
GenBank AE000516	GGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGGGTCAACCCGTTTCGGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC
Control H37Rv S	GGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGGGTCAACCCGTTTCGGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC
Control Bélgica R	GGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGGGTCAACCCGTTTCGGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC
Control Caracas R	GGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGGGTCAACCCGTTTCGGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC
Muestra Cumaná R	GGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGGGTCAACCCGTTTCGGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC

	G S L S V Y A R V N P F G F I E T P Y R

Figura 5. Comparación de las secuencias del fragmento amplificado del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* de la cepa resistente estudiada y las de referencia comparadas con una secuencia del GenBank (Accession Number: AE000516).

Spoligotyping

En la tabla 4, se muestran los resultados del análisis por spoligotyping de las 46 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas, donde se puede apreciar la procedencia, identificación a nivel de tipos y familias biogeográficas de acuerdo a la clasificación de la base de datos internacional SpolDB4 (Brudey *et al.*, 2006), que posee un registro de 39 295 aislados resumidos en 1 939 patrones. También muestra la descripción de algunas familias con un asterisco al lado (LAM9*, LAM2* y LAM1*), realizada usando el algoritmo de SPOTCLUST (Vitol *et al.*, 2006), los patrones de hibridación, la descripción octal según la estandarización propuesta por Dale *et al.* (2001) y las cepas resistentes. La cepa con el espoligotipo 605 (U) tenía resistencia a isoniazida y rifampicina (MDR), tres cepas con el espoligotipo 93 (LAM5) y una con el espoligotipo 17 (LAM2) eran resistentes a estreptomicina.

De las 46 cepas analizadas, encontramos un total de 15 grupos (clusters) con perfiles de espoligotipos diferentes, el perfil con mayor frecuencia (23,9%) correspondió al espoligotipo 93, seguidos de los espoligotipos 17 (19,6%), 42 (8,6%), 134 (6,5%), 64 (6,5%), 216, 60, 880, 167, 53, 905 y 605 (2,2%) cada uno pertenecientes a las familias biogeográficas LAM2, LAM9, Haarlem3, LAM4, LAM6, T1, y U, y las regiones del mundo donde se han reportado los distintos espoligotipos (tabla 5). De igual forma se muestran los patrones agrupados, con su valor probabilístico marcado con un asterisco, que no aparecen en la base de datos SpolDB4, pero que fueron identificados por SPOTCLUST.

Para evaluar las variables de epidemiología tradicional, en la tabla 6 se presentan las características clínicas y epidemiológicas de la población estudiada. Según el sexo, las cepas estudiadas provinieron principalmente de pacientes varones (65,2%), mientras que el grupo etario que agrupó el mayor número de casos, fue el de 20 – 40 años (47,8%), el 30,4% eran pacientes que habían recibido tratamiento y el 69,6% sin tratamiento.

Evaluando estadísticamente las condiciones epidemiológicas de todos los pacientes incluidos en el estudio, con los espoligotipos encontrados, sólo la condición de tratamiento previo arrojó un valor de $p= 0,05$ y $OR= 4,05$ para el espoligotipo 93 que corresponde a la familia LAM5.

			India(1) Irán(1) Italia(1) Madagascar(1) México(2) Martinica(1) Malawi(2) Malasia(2) Portugal(14) Senegal(1) USA(67) Venezuela(4)
216	LAM9	4,3	Argentina(1) Italia(2) USA (5) Venezuela(1)
NA	LAM1*0.69	2,2	No reportados por SpolDB4
60	LAM4	2,2	Argentina(2) Australia(3) Bélgica(2) Brasil(10) Cuba(4) Alemania(2) Algeria(2) España(1) Francia(8) R. Unido(1) Guinea-Bissau(5) Guyana franc(2) Italia(2) Martinica(3) Madagascar(1) México(3) Mozambique(1) Holanda(1) Portugal(2) Rusia(1) Senegal(2) USA(11) Venezuela(11) Suiza(1)
NA	LAM9*1.00	2,2	No reportados por SpolDB4
880	T1	2,2	México(2) USA(3) Venezuela(1) Sur África(1)
167	T1	2,2	Austria(4) Bélgica(1) Brasil(1) Cuba(1) España(4) Finlandia(2) Francia(1) R. Unido(1) India(1) Italia(1) Turquía(1) USA (5) Venezuela(2)
53	T1	2,2	Antillas Holandesas (1) Argentina(69) Armenia(7) Australia(17) Austria(215) Azerbaijan(1) Bélgica(48) Bangladesh(24) Brasil(74) Barbados(2) R. África Central(3) Canadá(16) China(11) Camerún(21) Comoros(1) Cuba(23) R. Checa(30) Alemania(55) Dinamarca(41) Algeria(4) África del Este(1) Egipto(13) España(24) Estonia(9) Etiopia(37) Finlandia(49) Francia(150) R. Unido(58) Georgia(12) Guadalupe(25) Guinea-Bissau(8) Guyana Franc(49) Haití(27) Hungría(8) Indonesia(16) India(24) Irán(5) Italia(125) Japón(6) Kazakhsan(2) Kenya(2) Libia(5) Latvia(5) Marruecos(12) Madagascar(23) México(54) Mongolia(1) Mozambique(2) Martinica(15) Malawi(12) Malasia(14) Namibia(7) Holanda(84) Noruega(4) Nueva Zelanda(14) Pakistán(4) Perú(6) Polonia(34) Portugal(27) Rumania(1) Rusia(26) Arabia Saudita(4) Sudan(1) Senegal(21) Surinam(2) Suiza(30) Tailandia(11) Turquía(31) USA(1089) Venezuela(42) Vietnam(14) Sur África(14) Zambia(2) Zimbawe(27)
905	U	2,2	Argentina(1) USA (5) Venezuela(9)
605	U	2,2	USA (1) Venezuela(19)

Tabla 6. Características clínicas y epidemiológicas de la población estudiada.

Características	n	%
Procedencia		
Sucre	40	86,9
Bermúdez	3	6,5
Montes	3	6,5
Edad (años)		
20-40	22	47,8
41-60	14	30,4
61-85	10	21,8
Sexo		
Masculino	30	65,2
Femenino	16	34,8
Baciloscopia		
Positivo (+)	19	41,3
Positivo (++)	19	41,3
Positivo (+++)	8	17,4
Tto. Previo		

Si	14	30,4
No	32	69,6
Contacto con pacientes TB		
Si	2	4,3
No	44	95,7

DISCUSIÓN

En los últimos años, la tuberculosis ha reemergido como una de las principales causas del incremento de las tasas de morbi-mortalidad en el mundo (Calderón *et al.*, 2003). Cada año, a nivel mundial el número de casos de tuberculosis aumenta en un 3% debido principalmente, a la aparición y circulación de cepas resistentes a múltiples fármacos; alrededor de 50 millones de personas están infectadas por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos. Esta situación es considerada como el inicio de un problema de consecuencias imprevisibles, ya que la población portadora de esta infección puede ser la fuente de una epidemia de tuberculosis incontrolable (WHO, 2004).

Al comparar los resultados obtenidos en la presente investigación, de resistencia primaria (6,3%) y resistencia adquirida (14,3%), con los resultados obtenidos en el estudio de resistencia realizado en Venezuela, durante 1998-1999 (MSDS, 2000), el cual sirvió de referencia y fue motivo de inquietud para la realización de este trabajo, ya que para ese momento el estado Sucre presentó a nivel nacional, el mayor índice de resistencia primaria (22,0%) y un 50% de resistencia secundaria, se demuestra que en la actualidad existe una menor circulación de cepas resistentes en la zona estudiada, lo que pone en evidencia en cierto modo, el buen funcionamiento del programa de tratamiento de la tuberculosis en el estado, pero hay que señalar que todavía existen niveles importantes de resistencia.

En los laboratorios de tuberculosis, es importante 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, sobre todo en países de bajos recursos y donde existe una alta prevalencia de casos de tuberculosis resistentes (Montoro *et al.*, 2005).

La determinación de resistencia a fármacos de primera línea, en especial a rifampicina e isoniacida, ha sido la base del diseño de técnicas de susceptibilidad, dada la importancia que estos dos medicamentos tienen dentro del esquema de tratamiento y en la actualidad se sabe que las cepas resistentes a la rifampicina lo son generalmente a la isoniacida, lo que se conoce como multirresistencia, por tal motivo la importancia que tiene la detección de resistencia a rifampicina para predecir multirresistencia (Porras *et al.*, 2005).

En este estudio se empleó el método nitrato reductasa como método alternativo para la rápida detección de susceptibilidad a las drogas antituberculosas de primera línea y el tiempo promedio que se requirió para obtener los resultados fue de 10 días en 12 cepas y de 14 días en 34 cepas, en comparación con el método de proporciones en donde se requirió de 42 días para reportar los resultados. El método de nitrato reductasa permitió de esta forma acortar notablemente el tiempo de obtención de los resultados. Estos datos se asemejan a los aportados por Lemus *et al.* (2006), quienes señalan que el tiempo promedio requerido para obtener los resultados con el uso de nitrato reductasa es de 10 días.

Sin embargo, se observó cierta divergencia para la estreptomicina, en donde 3 cepas que resultaron resistentes por el método de las proporciones, la prueba de nitrato reductasa solo detectó resistencia en una de estas cepas. Al respecto, Angeby *et al.* (2002) en su estudio donde emplearon la prueba de nitrato reductasa, señalan la dificultad que se les presentó al evaluar la especificidad (83%) de resistencia a la estreptomicina y la sensibilidad (75%) en la detección de resistencia al etambutol. Lemus *et al.* (2006), al utilizar la prueba de nitrato reductasa obtuvieron una sensibilidad de 91,7%; 96,5%; 88,0% y 93,9% para isoniacida, estreptomicina, etambutol y rifampicina, respectivamente y acotan que los resultados de su estudio son prometedores 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 (2000) y

Lazlo *et al.* (2002), señalan que es difícil determinar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a estreptomycin y etambutol cuando se usan métodos convencionales.

Telenti *et al.* (1993), señalan que la resistencia a rifampicina puede ser usada como un marcador para la detección de *M. tuberculosis* MDR. Yuen *et al.* (1999), encontraron que el 91% de las cepas estudiadas fueron resistentes a rifampicina y a isoniazida. De igual forma, Agapito *et al.* (2002) 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 en estas cepas fue de 98% (49/50). De acuerdo a estos resultados, los 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 el presente estudio se pudo observar que la única cepa resistente a rifampicina también lo fue a isoniazida.

Lemus *et al.* (2006), Barrera y Montoro (2007), plantean que la prueba nitrato reductasa constituye una herramienta útil para la detección de resistencia 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, es fácil de realizar y no se requieren equipos sofisticados.

Es importante destacar la demanda que tienen una pronta identificación, aislamiento y detección de resistencia en los individuos enfermos, en especial en aquellos pacientes crónicos, en casos de recidivas y fracaso de tratamiento, ya que existe el riesgo de diseminación en la población general. Aunque en esta investigación se halló una baja prevalencia de resistencia, los resultados obtenidos mostraron buena concordancia entre la prueba de nitrato reductasa y el método de las proporciones, para la determinación de resistencia a las drogas isoniazida, rifampicina y etambutol. En tal sentido, contar métodos rápidos de determinación de susceptibilidad a las drogas antituberculosas es de gran importancia, ya que permitiría cambiar el tratamiento y se podría disminuir la probabilidad de contagio de la población de cepas resistentes.

En nuestra experiencia, la prueba de nitrato reductasa, ha demostrado ser un método sencillo, los resultados se obtienen en un tiempo relativamente corto y la buena concordancia obtenida al ser comparada con el método de las proporciones, ponen a 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.

Hay que resaltar que el empleo de nuevas técnicas de detección de susceptibilidad a las drogas antituberculosas que puedan sustituir en un futuro a los métodos convencionales, requiere de estudios de reproducibilidad y de la obtención de resultados de sensibilidad y especificidad aceptables. Para alcanzar tal sensibilidad y especificidad, consideramos que es necesario realizar estudios con mayor cantidad de aislamientos y pruebas con diferentes concentraciones críticas del medicamento que permitan obtener resultados más confiables.

La resistencia a drogas en *M. tuberculosis* se debe predominantemente a alteraciones en la secuencia de nucleótidos en genes blancos de antibióticos, a diferencia de otras bacterias, en *M. tuberculosis* no se han reportado mecanismos de adquisición de genes de resistencia vía plásmidos o transposones (Riska *et al.*, 2000).

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, representado estos, los puntos calientes dentro de esta región determinante de resistencia a rifampicina (Ramaswamy & Musser, 1998; Zhang & Telenti, 2000). Spindola *et al.* (2001) y Van Rie *et al.* (2001), señalan que las mutaciones en los codones Ser 531 e His 526 dentro de la región hipervariable de 81pb del gen *rpoB* son las más frecuentes 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 *et al.* (1993), observamos mutaciones en los codones 516, 526, 531 de las cepas BELG, CCS y CNA, respectivamente, y de acuerdo a la literatura 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 *et al.* (2001), 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), CAC-TGC (His-Cys) y para el codon 531, el cambio fue TCG-TTG (Ser-Leu) y TCG-TGG (Ser-Trp). Agapito *et al.* (2002), 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 *et al.* (2004), hallaron en el 90% de los aislados resistentes a rifampicina una mutación en el codon 531 TCG-TTG (Ser-Leu). Ozturk *et al.* (2005), demostraron la existencia de mutaciones en los codones 516 GAC-GTC (Asp-Val) y 531 TCG-TTG (Ser-Leu). En Venezuela, Aristimuño *et al.* (2006), encontraron la misma mutación reportada previamente por Karahan *et al.* (2004) y la reportada en el codon 516 por Ozturk *et al.* (2005).

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 (531 TCG-CAG, Ser-Gln), 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 en nuestra región.

En 1991, se alcanzaron los primeros éxitos en la obtención de secuencias repetitivas en el genoma de *M. tuberculosis* (Van Soolingen *et al.*, 1991), siendo éste el punto de partida que ha permitido comparar las huellas genéticas de los distintos aislamientos y por consiguiente establecer diferencias entre diversas cepas. Al diferenciar las cepas aisladas, ha sido posible obtener nueva información sobre la epidemiología de la enfermedad (Glynn *et al.*, 1999). Jasmer *et al.* (1999), destacan la utilidad que tiene la epidemiología molecular para evaluar los resultados de los programas de control de la tuberculosis, tal como se observó en la ciudad de San Francisco entre 1991 y 1997, que un descenso del número de casos asociados en clusters hizo pensar que las medidas de control adoptadas habían permitido disminuir la diseminación de la tuberculosis.

El surgimiento de cepas resistentes a fármacos antituberculosos y de mayor virulencia, así como el aumento en el desplazamiento y en la edad promedio de la población, exigen la incorporación de técnicas moleculares que otorguen mayor sensibilidad y poder discriminatorio; además de la aplicación de estrategias adecuadas para el registro y trazabilidad de las muestras, lo que permitirá asociar cada perfil genético de *M. tuberculosis* a una localidad geográfica determinada (Mancilla *et al.*, 2006).

Los resultados de este trabajo, utilizando el spoligotyping, arrojaron una distribución de 46 aislados en 15 patrones o espiligotipos diferentes, lo que representa una diversidad de un 33% (15/46) en la zona estudiada. La familia que presentó mayor frecuencia fue LAM5 (23,9%), seguida de LAM2 (19,6%) y LAM2* (13,0%), lo que quiere decir que los genotipos representados por estas familias son los responsables del 56,5% de los casos de tuberculosis de los pacientes muestreados. No se observó tendencia alguna por una familia en particular a estar presente exclusivamente en una de las regiones muestreadas.

Al comparar esta investigación con la realizada por Toro *et al.* (2001), quienes fueron los primeros en iniciar un estudio de epidemiología molecular de la tuberculosis en Venezuela, específicamente en la ciudad de Caracas, en donde encontraron la existencia de 51 patrones diferentes y una diversidad local de un 80% (51/64) y con el estudio realizado por Abadia (2008), en diferentes regiones de Venezuela (Caracas, Valencia, Delta Amacuro Puerto Ayacucho, Apure, Cumaná y Maracay), quien halló la existencia de 300 espoligotipos diferentes, una diversidad global de 23% (300/1 298) y una diversidad en la ciudad de Cumaná de 39% (21/54). Podríamos señalar, que los nuestros son similares a los obtenidos por Abadia, ya que gran parte de los genotipos aislados por él en Cumaná (67,4%), se observaron también en éste estudio. En cuanto al trabajo de Toro *et al.* (2001), se puede señalar que la gran diversidad encontrada corresponde a que el muestreo realizado fue muy pequeño en comparación con el número de casos reportados, otro factor que podría explicar la gran diversidad encontrada por este autor fue el empleo una técnica con mayor poder discriminatorio IS6110-RFLP.

Los patrones obtenidos (LAM1*, LAM2* y LAM9*) y que no han sido reportados en SpolDB4, se tratan de reservorios de nuevos tipos, es decir, variantes nuevas de los espoligotipos circulantes o espoligotipos emergentes (evolución). Al respecto, Abadia (2008), señala de que existe la posibilidad de que se trate de artefactos, o sea, que el patrón no exista como cepa única y que sea el resultado de la superposición de dos o más cepas producto de una infección mixta que ha generado un patrón desconocido o no reportado.

El patrón 605 (familia U) hallado, corresponde a una cepa MDR, que fue la única aislada en el estudio. En este sentido, existen evidencias que apuntan hacia una menor patogenicidad de las cepas multiresistentes; en Holanda, trabajos realizados con técnicas de epidemiología molecular indican una menor agrupación de las cepas multiresistentes, lo cual indicaría una menor transmisibilidad de estas cepas (Telenti, 1998). De igual forma, García & Rodríguez (2005), señalan que las cepas resistentes a fármacos se

transmiten en menor proporción que el resto de las cepas. Murray & Nardel (2002), proponen varias razones que explicarían por qué los clusters de tuberculosis con resistencia a uno o más fármacos pueden ser menores que los clusters de los casos sensibles: los pacientes con tuberculosis multirresistente son menos accesibles a los sistemas de salud en muchos países, pueden tener menos contactos sociales o éstos pueden haber estado expuestos al germen con mayor frecuencia.

De acuerdo a los registros de SpolDB4, se encuentra una cepa reportada en Estados Unidos y 19 en Venezuela con el patrón 605 (U), o sea que pareciera ser una cepa con amplia distribución en nuestro país. Situación reportada por Abadia (2008), quien reveló que el 7,2% de los aislados de su estudio pertenecían a esta familia, ocupando el tercer lugar en la frecuencia de los espoligotipos hallados.

Cuando se evaluaron las variables clínicas y epidemiológicas de los pacientes (edad, sexo, positividad de la baciloscopia y contacto con pacientes con tuberculosis), estas no estuvieron asociadas estadísticamente con los espoligotipos hallados, por lo que no representaron factores relacionados con la condición de los pacientes a ser portadores de una cepa con un patrón determinado o que existan ciertas condiciones en los pacientes que faciliten la diseminación de las cepas en la población. Lo que si es notable es que la frecuencia de la tuberculosis en hombres (65,2%) fue mayor que en las mujeres (34,8%), antes reportado por varios autores como un posible factor de riesgo de esta enfermedad (Pelczer *et al.*, 1982; Fitzgerald *et al.*, 2003; Salim *et al.*, 2004 & Abadia, 2008).

Es de suma importancia que se sigan realizando trabajos de este tipo que contribuyan con el conocimiento de la biodiversidad de los aislados clínicos que circulan en nuestras regiones.

CONCLUSIONES

La prueba de nitrato reductasa, ha demostrado ser un método sencillo y la buena concordancia obtenida al ser comparada con el método de las proporciones, la colocan 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.

La baja prevalencia de resistencia a las drogas antituberculosas obtenida, demuestran una disminución en la circulación de cepas resistentes en la zona estudiada, lo que pudiera indicar la aplicación de un programa adecuado de tratamiento de la tuberculosis en el Estado.

El aislamiento de una nueva mutación en el gen *rpoB* de la cepa resistente a rifampicina demuestra que la selección por antituberculosos actúa en mutaciones que ocurren a nivel regional.

La presencia de distintos genotipos de *M. tuberculosis* en las poblaciones estudiadas no evidencian la ocurrencia de focos infecciosos, sino más bien, la transmisión de cepas de manera continua, propia de zonas endémicas.

BIBLIOGRAFÍA

Abadia, E. 2008. Biodiversidad de aislados clínicos venezolanos de *M. tuberculosis* analizada por espilogotipaje (Spologotyping). Implicaciones epidemiológicas y evolutivas. Tesis de Grado. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. 304 pp.

Abbas, A.; Lichtman, A. & Pober, J. 2002. Inmunología Celular y Molecular. Cuarta Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 557 pp.

Agapito, J.; Neyra, V.; Castro, J.; Accinelli, R.; Rodríguez, I. & Espinoza, J. 2002. Caracterización de las mutaciones en el gen *rpo B* asociadas a la resistencia a rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. Rev. Perú. Med. Exp. Salud. Public., 19 (3): 117-123.

Angeby, K.; Klintz, L. & Hoffner, S. 2002. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J. Clin. Microbiol., 40 (2): 553-555.

Aristimuño, L.; Armengol, R.; Cebollada, A.; España, M.; Guilarte, A.; Lafoz, C.; Lezcano, M.; Reville, m.; Martín, C.; Ramírez, C.; Rastogi, N.; Rojas, J.; Vásquez A.; Sola, C. & Samper, S. 2006. Molecular characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the first national survey of antituberculosis drug resistance from Venezuela. BCM. Microbiol., 6: 471-483.

Balandrano, S.; Anzaldo, G.; Peña, G. & Betancourt, X. 1996. Manual de Procesamientos INDRE/SAGAR: Tuberculosis. Editado por la Secretaría de Salud, Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México, D.F. 98 pp.

Brudey, K., Gordon, M.; Moström, P.; Svensson, L.; Bodil, J.; Sola, C.; Ridell, M. & Rastogi, N. 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Sweden. J. Clin. Microbiol., 42 (7): 3046-3051.

Calderón, R.; Asencios, L.; Quispe, N.; Custodio, W. & Montoya, I. 2003. Detección rápida de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-SSCP y PCR-Heteroduplex. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pub. 20 (2): 65-71.

Canetti, G.; Rist, N. & Grosset, J. 1963. Mésure de la sensibilité du bacile tuberculeux aux drogues antibacillaires pour la méthode des proportions. Rev. Tuberc. Paris., 27: 217-272.

Casal, R. 1990. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (tuberculosis, lepra y micobacteriosis). Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba, España.

Cole, S. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology. 178: 2919 – 2928.

Cole, S. & Telenti, A. 1995. Drug resistente in *Mycobacterium tuberculosis*. Eur. Res. J., 8: 1130-1135.

Coll, P. 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 21 (6): 299-308.

Cooksey, R.; Morlock, G.; Glickman, S. & Crawford, J. 1997. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. J. Clin. Microbiol., 35: 1281-1283.

Cousins, D.; Bastida, R.; Cataldi, A.; Quse, V.; Redrobe, S.; Dow, S.; Duinan, P.; Murray, A.; Dupont, C.; Ahmed, N. & Collins, D. 2003 Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium pinnipedii* sp. Int. J. Sys. Evol. Microbiol., 53: 1305-1314.

Dale, J.; Brittain, A.; Cataldi, A.; Cousins, D.; Crawford, J.; Driscoll, J.; Heerma, H.; Lillebaek, T.; Quitugua, T.; Rastogi, N.; Skuce, R.; Sola, C.; Van Sooligen, D. & Vicent, V. 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardized nomenclature. Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 5: 216-219.

De La Parte, M.; Hurtado, M. & Rivera, M. 2001. Tuberculosis en el nuevo milenio. Rev. Facult. Med., 24 (2): 104-119.

Drobniewski, F. & Wilson, S. 1998. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* a molecular story. J. Med. Microbiol., 47: 189-196.

Espinal, M.; Laszlo, A.; Simonsen, L.; Boulabal, F.; Jae Kim, S.; Reniero, A.; Hoffner, S.; Rieder, H.; Binkin, N.; Dye, C.; Williams, R.; & Raviglione, M. 2001. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. N. Engl. J. Med., 344: 1294-1303.

Felmlee, T.; Liu, Q. & Whelen, A. 1995. Genotypic detection of *M. tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. J. Clin. Microbiol., 33: 1617-1623.

Filliol, I.; Ferdinand, S., Negroni, L., Sola, C. & Rastogi, N. 2000. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. J. Clin. Microbiol., 38: 2520-2524.

Filliol, I.; Driscoll, J.; Van Soolingen, D.; Kreiswirth, B.; Kremer, K. & Valetudie, G. 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. J. Clin. Microbiol., 41: 1963-1970.

Fitzgerald, J.; Fanning, A.; Hoepfner, V.; Hershfield, E. & Kunitomo, D. 2003. The molecular epidemiology of tuberculosis in western Canada. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 7: 132-138.

García, L.; Alonso, M.; Rebollo, M.; Tercero, J. & Chaves, F. 2001. Mutations in the *rpo B* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR enzyme-linked immunosorbent assay. Clin. Microbiol., 39 (5): 1813-1818.

García, E. & Rodríguez, J. 2005. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. Arch. Bronconeumonol., 41 (11): 618-624.

Glynn, J.; Bauer, J.; De Boer, A.; Borgdorff, M.; Fine, P. & Godfrey, P. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 3: 1055-1060.

Goble, M.; Iseman.; Madsen, L.; Waite, D.; Ackerson, L. & Hobsburg, C. 1991. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. N. Engl. J. Med., 328: 527-532.

Guilarte, A. 2001. Programa Nacional de Tuberculosis. Act. Cient. Ven., 52: 2-4.

Hirano, K.; Abe, C. & Takahashi, M. 1999. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J. Clin. Microbiol., 37: 2663- 2666.

Jasmer, R.; Hahn, J.; Small, P.; Daley, C.; Behr, M. & Moss, A. 1999. A molecular epidemiology analysis of tuberculosis trends in San Francisco. Ann. Intern. Med. **130**: 971-978.

Kamerbeek, J.; Schouls, A.; Kolk, M.; Van Agterveld, D.; Soolingen, S.; Kuijper, A.; Bunschoten, H.; Molhuizen, R.; Shaw, M.; Goyal, A. & Van Embden, D. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol., **35**: 907-914.

Kapur, V.; Li, L.; Iordanescu, S.; Hamrick, M.; Wanger, A.; Kreiswirth, B.; & Musser, J. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene *rpoB* encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J. Clin. Microbiol., **32** (4): 1095-1098.

Karahan, Z.; Atalay, F.; Uzun, M.; Erturan, Z.; Atasever, M. & Akar, N. 2004. Sequence analysis of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. Microb. Drug. Resist., **10**: 325-333.

Kato, M.; Maeda, M. & Small, P. 2000. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. Est. J. Med., **172**: 256-259.

Kato, M.; Rhee, J.; Gingeras, T.; Salomon, H.; Drenkow, J.; Smittipat, N. & Small, P. 2001. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Res., **11**: 547-554.

Kremer, K.; Van Gorkom, T. & Van Embden, J. 2000. Research laboratory for infectious diseases: Spoligotyping. National Institute of Public Health and Environment.

Lado, F.; Garcia, R., Pérez, M.; Ferreiro, M.; Maceda, S. & Tuñez, V. 2004. Tuberculosis resistente a fármacos. An. Med. Intern., 21 (4): 190-196.

Landis J. & Koch, G. The measurement of observer agreement for categorical data. 1977. Biometrics., 33: 159-174.

Laslo, A.; Rahman, M.; Espinal, M.; Raviglione, M. & WHO/IUATLD. 2002. Quality assurance progame for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: Five rouds of proficiency testing. Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 6: 748-756.

Lemus, D.; Montoro, E.; Echemendia, M.; Martin, A.; Portaels, F. & Palomino, J. 2006. Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low-resource laboratories. J. Clin. Microbiol., 55: 861-863.

Mahmoudi, A. & Iseman, M. 1993. Pitfalls in the careo f patients with tuberculosis: common errors and their association with the acquisition of drug resistente. JAMA., 270: 65-68.

Mancilla, M.; Martínez, A.; Palavecino C.; Rehren, G.; Lucero P.; León, G. & Zárraga, A. 2006. Variantes genéticas de *Mycobaterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xª Región de Chile. Rev. Chil. Infect., 23: 220-225.

March, A. 1994. Transmisión de resistencia de *Mycobaterium tuberculosis* en infectados por el VIH. Clin. Med. Barc., 102: 98-100.

Martínez, L.; Lara, M. & Torres, M. 2001. Estabilidad de tabletas de rifampicina 300 mg. Rev. Cub. Farm., 35 (1): 18-22.

Montoro, E.; Echernendía, M.; Lemus, D.; Marrero, A.; Llanes, M. & Valdivia, J. 2004. Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas en Cuba, 1995 – 1998. Biomédica., 24: 80-84.

Montoro, E.; Lemus, D.; Echemendía, M.; Martin, A.; Portaels, F. y Palomino, J. 2005. 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., 55: 500-505.

Möstrom, P.; Gordon, M.; Sola, C.; Ridell, M. & Rastogi, N. 2002. A survey of methods used in molecular epidemiology of tuberculosis. Clin. Microbiol. Infect., 8: 694-704.

MSAS. 1996. Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis: El Laboratorio. Caracas, Venezuela. 19 pp.

MSDS. 1998. Protocolo de la investigación de resistencia inicial y secundaria a las drogas antituberculosas en Venezuela. Caracas.

MSDS. 2000. Informe de evaluación anual del programa integrado de control de la tuberculosis en Venezuela. Caracas.

MSDS. 2002. Informe de evaluación anual del programa nacional integrado de control de la tuberculosis en Venezuela. Caracas.

MSDS. 2006. Programa nacional integrado de control de la tuberculosis en Venezuela. Caracas.

MSDS. 2007. Programa nacional integrado de control de la tuberculosis en Venezuela. Caracas.

Murray, M. & Nardell, E. 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis. Achievements and challenges to current knowledge. Bull. World. Health. Organ.; 80: 477-482.

Musser, J. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin. Microbiol. Rev., 8: 496-514.

Narayanan, S. 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis. Indian J. Med. Res., 120: 244-247.

OMS. 2001. Progress in tuberculosis control in high-burden countries. Ginebra. 35 pp.

Ozturk, C.; Sanic, A.; Kaya, D. & Ceyhan, I. 2005. Molecular analysis of isoniazid, rifampin and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Düzce, Turkey. Jpn. J. Infect. Dis., 58: 309-312.

Pelczer, M.; Reid, R. & Chain, E. 1982. Microbiología. 4^a Ed. Editorial Mc Graw-Hill. Mexico, D.F. 821 pp.

Porras, T.; León, C.; Guerrero, M.; Martín, A.; Portaels, F. & Palomino, J. 2005. Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Biomed., 25: 22-33.

Quirós, E.; Airoidi, M.; Moretti, F. & Carosi, G. 2001. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev. Diag. Biol., 50 (4): 1126-1129.

Ramaswamy, S. & Musser, J. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber. Lung. Dis., 79: 3-29.

Rastogy, N., Legrand, E. & Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20: 21-54.

Riska, E.; Waard, J. & Allan, D. 2000. Molecular determinants of drugs resistance in tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 42: 4-10.

Salim, H.; Declercq, E.; Deun, V. & Saki, K. 2004. Gender differences in tuberculosis: a prevalence survey done in Bangladesh. Int. Tuberc. Lung. Dis., 8: 952-957.

Scarpellini, P.; Braglia, S.; Carrera, P.; Cedri, M.; Cichero, P.; Colombo, A.; Crucianelli, R.; Gori, A.; Ferrari, M. & A. Lazzarin. 1999. Detection of of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis. Antimicrob. Agents. Chemother. 43: 2550-2554.

Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Rev. Clin. Microbiol., 6 (3): 463-496.

Somoskovi, A.; Parsons, L.; & Salfinger, M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir. Res. 2: 164-168.

Spindola, S.; Kritski, A.; Fillol, I.; Habitat, C.; Panteix, G. & Drovet, E. 2001. Mutations in the *rpo B* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolates in Brazil and France. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 96 (2): 247-250.

Telenti, A. 1998. Genetics of drug resistant tuberculosis. Thorax. 53: 793-797.

Telenti, A.; Imboden, P.; Marchesi, F.; Lowrie, D.; Cole, S.; Colston, M.; Matter, L.; Schopfer, K. & Bodmer T. 1993 Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 341: 647-650.

Telenti, A.; Honoré, N.; Bernasconi, C.; March, J.; Ortega, B.; Heym, B.; Takiff, H. & Cole, S. 1997. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in

Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level. J. Clin. Microbiol. 35: 719-723.

Toro, S.; Armengol, R.; Convit, J.; De Salas, A.; Takiff, H. & De Waard, J. 2001. The molecular epidemiology of tuberculosis in Caracas, Venezuela with IS6110 DNA fingerprinting. Act. Cient. Venez.,52: 33-35.

Tortoli, E.; Benedetti, M.; Fontanelli, A. & Simonetti, M. 2002. Evaluation of automated BACTEC 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. J. Clin. Microbiol., 40: 607-610.

Van Rie, A.; Warren, R.; Mshanga, I., Jordan A.; Vander S. & Richardson, M. 2001. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. J. Clin. Microbiol. 39 (2): 636-641

Van Soolingen, 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J. Intern. Med., 249: 1-26.

Van Soolingen, D.; Hermans, P.; De Haas, P.; Soll, D. & Van Embden, J. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol., 29: 2578-2586.

Vargas, L.; Quintero, O.; Ulloa, I.; Giraldo, E.; León, C.; Naranjo, N.; Bernal, M.; Guerrero, M. & Camargo, D. 1990. Tuberculosis. Tercera edición. Ministerio de Salud e Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 55 pp.

Vitol, I.; Driscoll, J.; Kreiswirth, B.; Kurepina, N. & Bennett, K. 2006. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strains families using spoligotyping. Infect. Genet. Evol., 6: 491-504.

Watterson, S.; Wilson, S.; Yates, M. & Drobniowski, F. 1998. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 36 (7): 1969-1973.

World Health Organization. 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva.

World Health Organization. 2004. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva.

Williams, D.; Waguespack, C.; Eisenach, K.; Crawford, J.; Portaels, F. & Salfinger, M. 1994. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. Agents Chemother., 38: 2380-2386.

Williams, D.; Spring, L.; Collins, L.; Miller, P.; Heifets, B.; Gangadharam, P. & Gillis, P. 1998. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents. Chemother. 43: 1853-1857.

Yuen, L.; Leslie, D. & Coloe, P. 1999. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. J. Clin. Microbiol. 37 (12): 3844-3850.

Zhang, Y. & Telenti, A. 2000. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, p. 235-254. In: F. Hatfull and Waard, J. (ed). Molecular genetics of mycobacteria. ASM Press, Washington, D.C.

ANEXO
ANEXO 1
REGISTRO DE PACIENTES

Código	Región	Fecha	Nombre	Edad	Sexo	Dirección	Ocupación	Tipo de caso	BK	Tto recibido	Contacto con pacientes con TB	Consumo de alcohol, drogas,. Fumador.

ANEXO 2

AUTORIZACIÓN

El uso de las muestras y datos obtenidos en este estudio son de uso exclusivo para investigación. Los datos de los participantes no podrán ser usados en perjuicio de los mismos.

Yo, _____, portador de la C.I: _____, autorizó a los responsables del trabajo de investigación titulado **ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD DE *Mycobacterium tuberculosis* A DROGAS ANTITUBERCULOSAS EN POBLACIONES ENDÉMICAS DEL ESTADO SUCRE**, realizado por la Lcda. Rosmy Mendoza y coordinado por el Dr. Marcos De Donato, para utilizar mis datos y muestras de esputos.

En Cumaná a los _____ días del mes de _____ de 200 .

Firma

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Mendoza G., Rosmy del V.	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , antituberculosas, drogas, epidemiológico-molecular

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de Ciencias Postgrado en Biología Aplicada	Microbiología Aplicada

Resumen (abstract):

Se evaluó la susceptibilidad a isoniacida (INH), rifampicina (RIF), estreptomycin (STR) y etambutol (EMB) y las características epidemiológicas-moleculares de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en poblaciones endémicas del estado Sucre. Para ello, se recolectaron muestras de esputos tomadas por expectoración, de pacientes con sintomatología respiratoria procedentes del servicio de tuberculosis del Hospital Dr. Julio Rodríguez de Cumaná (municipio Sucre), del Hospital Dr. Luís Daniel Beauperthuy de Cumanacoa (municipio Montes) y del Hospital Santos Aníbal Dominici de Carúpano (municipio Bermúdez), durante el periodo de agosto 2005 – diciembre 2006. Las muestras con baciloscopia positiva y cultivo positivo fueron incluidas en el estudio y en una hoja de registro se recopilaban los datos epidemiológicos de los pacientes. De un total de 54 muestras, 46 cultivos resultaron viables, a los cuales se les realizó las pruebas de susceptibilidad empleando el método de proporciones de Canetti y de nitrato reductasa. Se realizó la extracción, purificación y secuenciación del ADN de las cepas que resultaron resistente a rifampicina en este estudio, así como de 2 cepas controles positivos y 1 cepa H₃₇RV sensible (control negativo). A las 46 cepas aisladas, se les realizó la caracterización molecular, empleando la técnica de Spoligotyping. Los resultados mostraron un 6,3% de resistencia primaria y 14,3% de resistencia adquirida. Una cepa fue considerada multidrogaresistente (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 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 Ser->Gln (TCG->CAG), lo cual representa un nuevo tipo de mutación para esta región. Al comparar estos resultados con los encontrados 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. Los resultados del Spoligotyping revelaron un total de 15 grupos (clusters) con perfiles de espilgotipos diferentes, el perfil con mayor frecuencia correspondió al espilgotipo 93 (23,9%), seguidos de los espilgotipos 17 (19,6%), 42 (8,6%), 134 (6,5%), 64 (6,5%), 216, 60, 880, 167 53, 905 y 605 (2,2%), pertenecientes a las familias biogeográficas LAM2, LAM9, Haarlem3, LAM6, LAM9, LAM4, T1, T1, T1, U y U, respectivamente. Las variables clínicas y epidemiológicas de los pacientes (edad, sexo, positividad de la baciloscopia y contacto con pacientes con tuberculosis), no estuvieron asociadas estadísticamente con los espilgotipos hallados, por lo que no representaron factores relacionados con la condición de los pacientes a ser portadores de una cepa con un patrón determinado o que existan ciertas condiciones en los pacientes que faciliten la diseminación de las cepas en la población. Solo la condición de tratamiento previo arrojó un valor de $p= 0,05$ y $OR= 4,05$ para el espilgotipo 93, que corresponde a la familia LAM5. Consideramos de suma importancia que se sigan realizando trabajos de este tipo que contribuyan con el conocimiento de la biodiversidad de los aislados clínicos que circulan en nuestras regiones.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Dr. Marcos De Donato	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes día

2008	05	
------	----	--

Lenguaje: SPA _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
P.G- mendozar.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: _____ **(Opcional)**

Temporal: _____ **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo: Magíster Scientiarum En Biología Aplicada,
Mención Microbiología Aplicada

Nivel Asociado con el Trabajo: Magister Scientiarum

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Martínez*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolaños Cuvales
JUAN A. BOLANOS CUALES
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

Mendoza G., Rosmy del V.

Autor

Dr. Marcos De Donato

Asesor