

Resistencia a drogas antituberculosas en Caracas, Venezuela; 2001-2006

Anti-tuberculosis drug resistance in Caracas, Venezuela; 2001-2006

Sandra Fernández Figueiras¹, Jacobus H de Waard², Omaira J Da Mata Jardín^{1,2,3},
Alejandro Angulo Rojas¹, Elsa S Toro Araujo^{1†}, Ninoska N Montilla⁴,
Graciela Maggi⁵, Juana Papatzikos⁶, Graciela Ramírez⁷

RESUMEN

Para establecer la sensibilidad de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Caracas, entre 2001 y 2006, fueron probadas utilizando el método colorimétrico para determinar las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM). De las 324 cepas, 46 (14,2%) mostraron resistencia a una o más drogas. Encontramos resistencia de alto nivel (CIM 8 µg/ml) y bajo nivel (CIM 1-4 µg/ml) a Estreptomina en 6 (1,8%) y 25 (7,7%) de las cepas, respectivamente. Se encontró resistencia a Isoniacida de bajo nivel (MIC 0,125 – 0,5 µg/ml) en 8 (2,5%) y de alto nivel (MIC 1,0 µg/ml) en 15 (4,6%) de las cepas estudiadas. Hallamos 13 (4,0%) cepas resistentes a Rifampicina (RIF) (5 µg/ml) y 11 (3,4%) a Etambutol (10 µg/ml). De los 17 (5,2%) aislamientos resistentes a dos o más drogas, 12 (3,7%) fueron resistentes a INH y RIF (definido como multiresistencia, MDR). De las 12 cepas MDR, 11 fueron aisladas a partir de esputo y una de líquido pleural. Este estudio muestra un incremento en la prevalencia de la resistencia a las drogas anti-tuberculosas en Caracas, especialmente las cepas MDR. Este aumento apunta hacia la necesidad de una encuesta nacional, para evaluar el panorama real de la resistencia.

Palabras clave: Antibióticos, resistencia a antibióticos, resistencia a múltiples drogas, tuberculosis, isoniacida, estreptomina, rifampicina, etambutol.

SUMMARY

To assess drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from 2001 to 2006 in Caracas. Available strains were tested using colorimetric method to determine the Minimal Inhibitory Concentrations (MIC). Of 324 strains, 46 (14,2%) showed resistance to one or more drugs. High-resistance (8 µg/ml) and low-resistance (1-4 µg/ml) to Streptomycin was found in 6 (1,8%) and 25 (7,7%) strains, respectively. Isoniazid (INH) low-resistance (MIC 0.125 – 0.5 µg/ml) were found in 8 (2,5%) and high-resistant (MIC at 1.0 µg/ml) in 15 (4,6%), Rifampicin resistance (RMP) (5 µg/ml) in 13 (4%), and Ethambutol resistance (10 µg/ml) in 11 (3,4%) of the strains. Of the 17 (5,2%) isolates resistant to two or more drugs, 12 (3,7%) were resistant to INH and RMP (defined as multidrug resistance, MDR). Of these 12 MDR strains, 11 were isolated from sputum and one from pleural fluid. This study shows an increased prevalence of resistance to anti-tuberculosis drugs in Caracas, especially the prevalence of MDR strains, raises an urgent need of a proper nationwide survey to evaluate the true picture of resistance.

Key words: Antibiotics, antibiotic resistance, multi drug resistance, tuberculosis, streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol.

- ¹ Laboratorio de Diagnósticos Especiales, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ciudad Universitaria de Caracas, apartado postal 60412, oficina del este, Caracas, Venezuela. Teléfono: 58-212-2666416, Fax: 58-212-6934551. Correo electrónico: sfernandez@inhrr.gov.ve
- ² Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina.
- ³ Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar.
- ⁴ Laboratorio de Microbiología, Hospital General del Este "Dr. Domingo Luciani", Instituto Venezolano de los Seguros Sociales.
- ⁵ Laboratorio de Bacteriología, Hospital General de Niños "Dr. J.M. de los Ríos".
- ⁶ Laboratorio Central, Hospital de Clínicas Caracas.
- ⁷ Laboratorio de Bacteriología, Clínica Santa Sofía.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, la incidencia de tuberculosis (TB) desde el 2004 es estable y alrededor de 25/100.000 (1). A pesar de que es una de las enfermedades más antigua, la TB es un problema mundial en aumento. La resistencia a drogas en pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, emergió tan pronto como se introdujeron los agentes antituberculosos (2, 3). Sin embargo, no fue sino hasta los primeros años de la década de los noventa, cuando fueron reportados brotes de TB resistente a múltiples drogas, en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en Estados Unidos y Europa (4, 5), cuando el problema recibió atención internacional.

Las mutaciones que conducen a la resistencia a drogas en *M. tuberculosis* ocurren raramente, y los regímenes de múltiples drogas deberían prevenir la emergencia de resistencia clínica (6). El problema de la resistencia resulta de tratamientos inadecuados, usualmente debido a suministros irregulares de drogas o abandonos de la terapia. La resistencia a drogas es una amenaza potencial a los programas de control de la TB a nivel mundial (7). Los pacientes infectados con cepas resistentes a múltiples drogas son más difíciles de curar (8), particularmente si existe co-infección con VIH, y el tratamiento adecuado es más tóxico y costoso que la terapia habitual para pacientes con organismos sensibles (9). Así, realizamos este estudio para evaluar la prevalencia de la resistencia en *M. tuberculosis* en Caracas. Los resultados que se presentan fueron presentados en parte en el primer Congreso Internacional de Micobacterias, Bogotá, Colombia, 2008.

MÉTODOS

Las muestras de los pacientes fueron procesadas por el método de Ogawa-Kudoh (OK) e incubadas a 37 °C por 8 semanas (10). Las colonias de *M. tuberculosis* fueron identificadas por la morfología típica en medio de cultivo y la apariencia microscópica en extendidos coloreados con Zielh-Neelsen. Todos los aislamientos fueron identificados como *M. tuberculosis* mediante pruebas bioquímicas que incluyeron; producción de niacina, actividad catalasa, reducción de nitrato y tasa de crecimiento. Fueron incluidos en el estudio los aislamientos obtenidos de pacientes que tuvieron cultivos positivos para *M. tuberculosis* desde enero 2001 hasta diciembre 2006. De

cada paciente se utilizó un único aislamiento, en caso de que un paciente tuviera múltiples cepas, sólo fue utilizado el primer aislamiento.

Se procesaron un total de 324 aislamientos a partir de 324 pacientes, durante los 6 años del estudio. Estos aislamientos se obtuvieron a partir de diversas muestras clínicas, incluyendo; 260 (80,2%) muestras respiratorias, 9 (2,8%) a partir de líquidos o biopsias pleurales, 23 (7,0%) de muestras de tejido blando, 13 (4,0%) de muestras de nódulos linfáticos, 11 (3,3%) obtenidas de líquidos corporales, y el resto de otras muestras (tabla 1). Las muestras procedían de diferentes parroquias de la Ciudad de Caracas (tabla 2).

Tabla 1
Tipos de muestras procesadas

Tipo de muestra	Número	%
Aspirado gástrico	10	3,1
Espuito	216	66,7
Lavado bronquio alveolar	4	1,2
Lavado bronquial	25	7,7
Secreción bronquial	5	1,5
Biopsia pulmonar	2	0,6
Líquido pleural	7	2,2
Pleura	2	0,6
Absceso	6	1,9
Biopsia	2	0,6
Plastrón	2	0,6
Pus	2	0,6
Secreción	9	2,8
Tejido	2	0,6
Ganglio	13	4,0
Líquido articular	3	0,9
Líquido pericárdico	1	0,3
Líquido cefalorraquídeo	6	1,9
Líquido	1	0,3
Médula ósea	2	0,6
Orina	2	0,6
Sangre	1	0,3
Cepa	1	0,3
Total	324	100

Tabla 2
Frecuencia de resistencia de cada droga antituberculósica según la procedencia

Parroquia	Total	SM	INH	RIF	EMB	TR	MDR	SM+INH+ RIF+EMB
Petare	156	15	14	10	7	25	8	4
El Cafetal	16	3	1	1	1	4	1	1
Chacao	6	1				1		
Baruta	3							
San Bernardino	68	4	5	2	2	7	2	2
San Pedro	32	4	1		1	4		
San José	10	2				2		
El Recreo	8	1				1		
El Valle	7		1			1		
23 de Enero	5							
Antímano	3							
Catedral	2							
La Pastora	2							
San Juan	2							
Santa Rosalía	2	1	1	1		1	1	

SM; estreptomicina; INH, isoniácida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol; TR, total de cepas resistentes; MDR, resistentes al menos a RIF y INH

Para determinar las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) para Estreptomicina (SM), Isoniácida (INH), Rifampicina (RIF) y Etambutol (EMB) se utilizó la prueba colorimétrica de microplaca con azul de alamar (11, 12). Todos los antibióticos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.). La solución Madre de 1 mg/ml de cada antibiótico se esterilizó por filtración y almacenó a -20 °C. Las soluciones de trabajo se prepararon con una concentración cuatro veces mayor que la concentración más alta probada, en caldo 7H9-S (Middlebrook 7H9 suplementado con 10% OADC [ácido oleico, albumina, dextrosa, y catalasa]; Becton-Dickinson). Las concentraciones probadas para cada droga fueron: INH, de 1 a 0,031 µg/ml; RIF, de 2 a 0,062 µg/ml; SM, de 8 a 0,25 µg/ml; y EMB, de 32 a 1 µg/m. Cada aislamiento fue subcultivado por tres semanas en medio de Lowestein-Jensen antes de realizar la prueba de forma de obtener suficiente crecimiento. El inóculo fue preparado en agua destilada estéril y ajustado a una turbidez igual al tubo No 1 del estándar de McFarland, posteriormente fue diluido 1:25 en 7H9-S. La prueba se realizó como se describió previamente (12).

En resumen, se dispensó 100 µl del caldo 7H9-S en cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano, y se realizaron diluciones dobles seriadas de cada droga directamente en la placa. Se añadió 100 µl del inóculo en cada pozo. En cada prueba fueron incluidos tres pozos control de crecimiento y uno de esterilidad. Se añadió agua a todos los pozos exteriores de la placa para evitar la desecación durante la incubación. Las placas fueron selladas, colocadas en bolsas plásticas e incubadas a 37 °C bajo atmosfera normal. Después de 5 días de incubación, se agregó 32 µl de la solución de azul de alamar (20 µl de azul de alamar [Biosource, Invitrogen Corporation] y 12 µl de Tween 80 al 20% [Merck]), y la placa fue re incubada hasta el día siguiente. Un cambio del color azul inicial a rosado indicó crecimiento de la bacteria. Se definió la CIM como la concentración más baja del antibiótico que fue capaz de prevenir el cambio de color. Se utilizó la cepa H₃₇Rv (ATCC 27294) como control. Las cepas con resistencia simultanea a por lo menos INH y RIF fueron definidas como resistencia a múltiples drogas (MDR) (1). Los puntos de corte para determinar la resistencia a SM

fueron; alto nivel CIM $>8 \mu\text{g/ml}$ y de bajo nivel CIM 1 - 4 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de la INH las cepas fueron divididas en tres grupos; (i) sensible ($\text{MIC} \leq 0,062 \mu\text{g/ml}$), (ii) baja resistencia ($\text{MIC} 0,125 - 0,5 \mu\text{g/ml}$) y (iii) alta resistencia ($\text{MIC} \geq 1,0 \mu\text{g/ml}$). Las cepas fueron consideradas resistentes a RIF de bajo nivel (CIM a 0,5 $\mu\text{g/ml}$) y alta resistencia (CIM $\geq 1 \mu\text{g/ml}$). En el caso de EMB, fueron consideradas resistentes con CIM $\geq$ de 8 $\mu\text{g/ml}$. Tomando en consideración la variabilidad de la prueba, sobre todo en el caso de EMB, cada cepa en la que se observó algún tipo de resistencia, o una CIM a una dilución del punto de corte fue probada una segunda oportunidad para confirmar el resultado, siempre partiendo de un sub-cultivo de la cepa original congelada (13).

Debido a que, en la mayoría de los pacientes, no obtuvimos información sobre tratamiento previo, no nos fue

posible separar la resistencia primaria de la resistencia adquirida, y sólo se presenta la resistencia combinada. Los resultados se expresan como frecuencias absolutas y porcentajes en las variables cualitativas y promedios en las variables cuantitativas.

RESULTADOS

El análisis de la edad de los pacientes mostró que 89 (21,4%) de los aislamientos provenían de pacientes con edad menor de 25 años, 120 (29,4%) pacientes entre 25 a 45 años, 74 (22,8%) pacientes entre 46 a 65 años, mientras 41 (12,7%) provenían del grupo etario de mayores de 65 años (tabla 3). La media de edad de los pacientes fue $38,1 \pm 2,1$ años.

De las 324 cepas analizadas, 278 (85,8%) aislamientos fueron sensible a las cuatro drogas de primera línea

Tabla 3
Frecuencia de resistencia de cada droga antituberculósica según edad y género

	Total	SM	INH	RIF	EMB	TR	MDR	SM+INH+ RIF+EMB
total (años)	324	31	23	14	11	47	12	7
< 25	89	5	3	0	0	8	0	0
25-45	120	11	7	4	3	17	3	3
46-65	74	11	11	8	6	17	8	3
>65	32	3	1	2	1	4	1	1
desconocido	9	0	1	0	1	1	0	0
masculino (años)	186	17	16	10	9	27	9	6
< 25	40	0	2	2	0	2	0	0
25-45	72	9	5	4	3	12	3	3
46-65	49	5	8	4	5	10	5	2
>65	23	3	3	1	1	3	1	1
desconocido	2	0	0	0	0	0	0	0
femenino (años)	138	14	7	4	3	20	3	1
< 25	49	4	1	0	0	5	0	0
25-45	48	2	2	0	1	5	0	0
46-65	25	6	3	3	1	7	3	1
>65	9	1	0	1	0	2	0	0
desconocido	7	1	1	0	1	1	0	0

SM; estreptomicina; INH, isoniácida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol; TR, total de cepas resistentes; MDR, resistentes al menos a RIF y INH

probadas, y 46 (14,2%) fueron resistente por lo menos a una droga (tabla 4). La resistencia en SM (9,6%) e INH (7,1%) es mayor que la observada en RIF (4,3%) o EMB (3,4%). Sin embargo, los niveles de resistencia no se mantienen estables. Se puede observar, que la resistencia a SM es la que se detecta más frecuentemente (31 casos), con un máximo del 23,8% de los casos en el año 2003 y un mínimo con 5,7% en el año 2006 (tabla 5). En segundo lugar, la resistencia a INH declinó desde un valor de 10,7% en 2001 a 0% en los años 2002 y 2003, pero este descenso no fue persistente, debido a un aumento al 12,6% en 2006. En el caso de RIF, el valor máximo de resistencia, 7,1%, se observó en el año 2001, el cual se desplomó a 0% los próximos dos años, pero continuó con una tendencia al incremento en los años 2004, 2005 y 2006. Algo similar ocurrió con EMB (tabla 5). Casi la totalidad de las resistencias a los antibióticos fueron detectadas en cepas aisladas de muestras pulmonares. Entre las 56 cepas obtenidas de muestras extra-pulmonares, 55 fueron sensibles a todos los antibióticos, sólo una de las cepas presentó monorresistencia a EMB.

La proporción general de resistencia fue mayor en pacientes masculinos (27/187, 14,4%), que en femeninos (19/137, 13,9%), aunque la diferencia no fue significativa. Así mismo, fue mayor en aquellos pacientes con edades entre 46 a 65 años (23,0%), comparado con aquellos de edades <25 años (9,0%), 25 a 45 años (14,2%) y >65 años (9,4%), pero de nuevo, las diferencias no fueron significativas (tabla 3).

Entre los 324 aislamientos, la media de la monorresistencia fue 10,6%, con un rango de 3,6% a 23,8%. La media de monorresistencia para SM, INH, RIF y EMB fue de 8,7%, 1,5%, 0,3% y 0,3%, respectivamente. La resistencia sólo a RIF o EMB fue muy baja. La resistencia a RIF sin que la acompañe la resistencia INH se encontró sólo en dos pacientes. La resistencia a cualquiera de las cuatro drogas probadas no fue uniforme a lo largo de los años, con un rango de 11,3% (en 2004) a 23,8% (en 2003), con un valor medio de 14,8%. La resistencia a todas las drogas probadas fue en promedio el 1,9% de los casos, con un rango de 0% a 3,8%. La media de MDR fue de 3,3%, con un rango de 0% (en 2002 y 2003) a 7,1% (en 2001). La media de la prevalencia de la polirresistencia (resistencia a dos o más drogas, pero distinta a la resistencia conjunta de INH y RIF) fue del 1,3%, con un rango de 0% a 3,6% (tabla 4).

Encontramos 12 (3,7%) casos de TB con cepas MDR, el número de casos por año también varió entre, ningún caso en los años 2002 y 2003 a un máximo de 5 casos en el año 2006 (5,7% de los aislamientos de ese año) (tabla 5). De las 12 cepas MDR identificadas; 11 fueron aisladas de esputo y una de líquido pleural. De estas 12 cepas MDR 7 fueron resistentes a todas las drogas probadas; una fue aislada de un paciente femenino, las 6 restantes de pacientes masculinos, de los cuales dos eran pacientes VIH +. Sólo se encontraron 2 pacientes con resistencia exclusiva a INH + RIF, uno de los cuales tenía cuatro meses de tratamiento anti-TBC al momento de la toma de muestra. De los dos pacientes con resistencia a INH+RIF+SM, una, era una enfermera que tenía contacto con pacientes con TB. El único paciente con resistencia a INH+RIF+EMB era un paciente masculino.

Aunque se incluyeron cepas provenientes de diversas parroquias de la ciudad, la mayoría de ellas provenían de Petare 156 (48,2%) y en segundo lugar de San Bernardino 68 (21,0%), coincidiendo este orden en la detección de cepas MDR (tabla 2). La media de la edad de los pacientes con cepas MDR fue de 49, comparado con la media de 38 años para los pacientes con aislamientos no MDR (tabla 3). Las CIMs de los antibióticos en las cuales el 50 por ciento (MIC_{50}) y el 90 por ciento (MIC_{90}) de los aislamientos fueron inhibidos, así como los rangos observados, se muestran en la tabla 6.

DISCUSIÓN

En el año 2006, ocurrieron 9,2 millones de nuevos casos de TB y murieron 1,7 millones en todo el mundo (14). El control de la TB continúa siendo uno de los mayores retos de la salud mundial. El programa de monitoreo de la prevalencia de la resistencia es uno de los aspectos más importantes de un programa de control de la TB. La emergencia y dispersión de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a las drogas es una amenaza seria para el programa de control de TB, porque, los pacientes con bacilos resistentes a drogas responden menos a la terapia que aquellos que tienen bacilos sensibles, resultando en una propagación preferencial de los bacilos resistentes entre la comunidad.

La SM ha sido una droga importante para el tratamiento de la TB desde su descubrimiento en el año

Tabla 4
Patrones de Resistencia de *M. tuberculosis* a las cuatro drogas antituberculosas de primera línea según el año de diagnóstico

Droga antituberculosas	Año						Total	Promedio
	2001	2002	2003	2004	2005	2006		
SM	1	4	5	3	5	2	20	
%	(3,6)	(11,8)	(23,8)	(5,7)	(5,0)	(2,3)	(6,2)	(8,7)
INH					3	5	8	
%					(3,0)	(5,7)	(2,5)	(1,5)
RIF					2		2	
%					(2,0)		(0,6)	(0,3)
EMB					1		1	
%					(1,0)		(0,3)	(0,2)
INH+RIF	1				0	1	2	
%	(3,6)					(1,1)	(0,6)	(0,8)
INH+SM					1		1	
%					(1,0)		(0,3)	(0,2)
INH+EMB						1	1	
%						(1,1)	(0,3)	(0,2)
SM+EMB								
%								
INH+RIF+EMB						1	1	
%						(1,1)	(0,3)	(0,2)
SM+INH+RIF					1	1	2	
%					(1,0)	(1,1)	(0,6)	(0,4)
SM+INH+EMB	1						1	
%	(3,6)						(0,3)	(0,6)
SM+RIF+EMB								
%								
SM+INH+RIF+EMB	1			2	2	2	7	
%	(3,6)			(3,8)	(2,0)	(2,3)	(2,2)	(1,9)
TR	4	4	5	5	15	13	46	
%	(14,3)	(11,8)	(23,8)	(9,4)	(14,9)	(14,9)	(14,2)	(14,8)
MR	1	4	5	3	11	7	31	
%	(3,6)	(11,8)	(23,8)	(5,7)	(10,9)	(8,0)	(9,6)	(10,6)
MDR	2			2	3	5	12	
%	(7,1)			(3,8)	(3,0)	(5,7)	(3,7)	(3,3)
PR	1				2	2	5	
%	(3,6)				(2,0)	(2,3)	(1,5)	(1,3)
Total	28	34	21	53	101	87	324	

INH, isoniácida; RIF, rifampicina; SM, estreptomicina; EMB, etambutol; TR, total de cepas resistentes; MR, monorresistencia; MDR, multi-drogo resistencia, resistencia a INH y RMP; PR, polirresistencia, resistencia a dos drogas o mas pero no a INH+RIF; los valores en paréntesis son porcentajes.

Tabla 5
Frecuencia y porcentaje de resistencia de cada droga antituberculósica según el año de diagnóstico

Año	Nº casos	SM	INH	RIF	EMB	Total MDR	Total SM+INH+RIF+EMB
2001	28	3	3	2	2	2	1
%		(10,7)	(10,7)	(7,1)	(7,1)	(7,1)	(3,6)
2002	34	4	0	0	0	0	0
%		(11,8)					
2003	21	5	0	0	0	0	0
%		(23,8)					
2004	53	5	2	2	2	2	2
%		(9,4)	(3,8)	(3,8)	(3,8)	(3,8)	(3,8)
2005	105	9	7	5	3	3	2
%		(8,6)	(6,7)	(4,8)	(2,9)	(2,9)	(1,9)
2006	87	5	11	5	4	5	2
%		(5,7)	(12,6)	(5,7)	(4,6)	(5,7)	(2,3)
Total	324	31	23	14	11	12	7
%		(9,6)	(7,1)	(4,3)	(3,4)	(3,7)	(2,2)

SM; estreptomicina; INH, isoniácida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol; MDR, resistentes al menos a RIF y INH, los números entre paréntesis son porcentajes.

1944. Pero, en estos momentos, numerosas cepas de *M. tuberculosis* son resistentes a SM. En nuestro trabajo, 31 (9,6%) de los aislamientos fueron resistentes a SM (6 [1,8%] con alta resistencia y 25 [7,7%] con bajo nivel de resistencia). Este resultado es equivalente a lo reportado para la región de las Américas (AMR) de 9,6% (3,5 – 15,6%), pero se encuentra por debajo de Guatemala (31,6%), República Dominicana (22,45%) y Perú (20,7%). Sin embargo, la resistencia a SM en nuestro estudio es mayor que lo reportado previamente en la última encuesta nacional del año 1999 (15). La INH es una de las drogas anti-TB de primera línea medular, que junto con RIF y pirazinamida, son la base del tratamiento acordado directamente observado (DOTS) ampliamente utilizado en la lucha contra la TB (16). En nuestro estudio, encontramos bajo nivel de resistencia a INH en 8 (2,5%) y de alto nivel en 15 (4,6%) de las cepas (resistencia total 7,1%), justo por encima del rango inferior reportado para AMR (9,9% [7,0 – 12,9%]), y mucho menor que lo reportado para la República Dominicana (24,5%), Guatemala (15,6%) y Perú (14,7%) (15). Nuestro resultado es ligeramente más alto que lo reportado en la en-

cuesta nacional (6,2%), pero la diferencia no fue significativa. La droga clave usada en el tratamiento de la TB es la RIF, esta droga de primera línea es activa contra los bacilos tanto en fase logarítmica como estacionaria de crecimiento. Este estudio revela resultados de resistencia equivalentes a lo reportado para la AMR, de 5,3% (2,2 – 8,3%), pero menores que lo encontrado en República Dominicana (20,5%), Ecuador (12,1%) y México (9,5%) (15). El EMB es un análogo de la arabinosa, con actividad bactericida y forma parte de las drogas de primera línea para el tratamiento de la TB. El EMB es utilizado habitualmente, junto con INH, RIF y pirazinamida, como alternativa a la SM, y forma parte del esquema actual de tratamiento en Venezuela desde el año 2005. Los datos globales de los patrones de resistencia demuestran que, la resistencia a EMB en los casos nuevos y en los tratados previamente, es mucho menor que la resistencia a SM. La prevalencia de la resistencia a EMB en la AMR es generalmente baja, con un promedio general de 0,2 a 3,9%, pero varía en diferentes países, desde 0,0% en Cuba a 10,1% en Guatemala (15). La prevalencia de la resistencia a EMB en el presente estudio fue más o

Tabla 6
Concentración inhibitoria mínima (CIM) a los antibióticos antituberculosos, CIMs de los antibióticos en las cuales el 50 por ciento (MIC₅₀) y el 90 por ciento (MIC₉₀) de los aislamientos fueron inhibidos

SM (µg/ml)	Nº	%	% A	INH (µg/ml)	Nº	%	% A	RIF (µg/ml)	Nº	%	% A	EMB (µg/ml)	Nº	%	% A
≤0,25*	218	67,3	67,3	≤0,031*	205	63,3	63,3	≤0,062*	280	86,4	86,4	≤1	80	24,7	24,7
0,5**	75	23,1	90,4	0,062**	96	29,6	92,9	0,125**	27	8,3	94,8	2*	162	50,0	74,7
1	11	3,4	93,8	0,125	6	1,9	94,8	0,25	3	0,9	95,7	4**	71	21,9	96,6
2	8	2,5	96,3	0,25	2	0,6	95,4	0,5	1	0,3	96,0	8	4	1,2	97,8
4	6	1,9	98,1	0,5	0	0,0	95,4	1	0	0,0	96,0	16	3	0,9	98,8
8	3	0,9	99,1	1	1	0,3	95,7	2	2	0,6	96,6	32	4	1,2	100,0
>8	3	0,9	100,0	>1	14	4,3	100,0	>2	11	3,4	100,0	>32	0	0,0	100,0

INH, isoniacida; RIF, rifampicina; SM, estreptomycin; EMB, etambutol; % A, porcentaje acumulado, *, CIM₅₀; **, CIM₉₀

menos en el mismo nivel (3,1%) que lo reportado para la AMR, sin embargo, mostró una proporción ligeramente mayor cuando se compara con la resistencia reportada en la encuesta del año 1999 (1,8%), pero de nuevo la diferencia no fue significativa (15).

Como lo reportado previamente, la mayoría de los aislamientos resistentes a EMB fueron resistentes también a INH (11/10), sugiriendo un alto nivel de asociación entre la resistencia a EMB + INH. Contrariamente, una gran parte de las cepas resistentes a INH no fueron resistentes a EMB (23/13), insinuando que la resistencia simultánea a EMB + INH, debe tener menos significado estructural y más significado epidemiológico (17). Los aislamientos resistentes a EMB fueron predominantemente entre los pacientes con cepas MDR (11/8), este dato es muy significativo, debido a que EMB es una droga importante para la terapia anti-TB en los pacientes sin antecedente de tratamiento previo. El 85,7% (12/14) de los aislamientos resistentes de RIF también fueron resistentes a INH, similar a lo reportado previamente (18). Cepas con resistencia a RIF, pero sensible a INH, tales como las cepas con monorresistencia a RIF o con resistencia adicional de SM o EMB, fueron raras. Este resultado es un monitor importante para el estudio, pues la resistencia a RIF sin resistencia a INH, es tan rara, que es un buen indicador del laboratorio. Un resultado de resistencia a RIF que no sea MDR mayor del 3% puede sugerir errores en las pruebas de sensibilidad (15). En este

trabajo, la resistencia a RIF que no es MDR fue de tan sólo del 0,6%. En el presente estudio, 65,2% (15/23) de las cepas resistentes a INH fueron resistentes a otra de las drogas. Esto es muy revelador, pues, se ha demostrado un incremento del riesgo de falla de tratamiento en áreas con altos niveles de resistente a INH, además, una alta proporción de casos resistentes a INH pueden desarrollar resistencia a RIF durante el tratamiento (19).

El conocimiento de las verdaderas tasas de resistencia en cada región o país es esencial para el desarrollo de estrategias de tratamiento apropiadas. De acuerdo a los resultados de la última encuesta nacional realizada en el año 1999, la prevalencia de la resistencia combinada para cualquiera de las drogas fue del 10,3% (15). Sin embargo, en este estudio, el promedio de la resistencia a cualquiera de las drogas fue del 14,8%, mayor que lo reportado por el programa de control de TB. Este valor es menor que lo reportado por otros países como República Dominicana (43,8%), Guatemala (38,6%), Bolivia (28,3%), Perú (26,3%) y Ecuador (24,5%) (15). Por otra parte, en los últimos 3 años estudiados, 2,9% - 5,7% de los aislamientos de *M. tuberculosis* fueron MDR. Esta prevalencia fue similar a la tasa media de MDR en la AMR (4,0%) (15). Este puede ser el resultado de la estricta implementación de la terapia directamente observada que el programa de control de la TB lleva en nuestro país y a la no disponibilidad de drogas anti-TB para la prescripción por médicos privados.

Tabla 7
Porcentaje de resistencia a drogas de la primera línea notificada en todos los casos en la Región de las Américas (15)

Región / País	Año	TR	INH	RIF	EMB	SM	MDR
AMR		16,7 (8,4 – 23,4)	9,9 (7,0 – 12,9)	5,3 (2,2 – 8,3)	2,0 (0,2 – 3,9)	9,6 (3,5 – 15,6)	4,0 (1,7 – 6,3)
Argentina	2005	12,5	7,8	5,0	1,3	7,4	4,4
Bolivia	1996	28,3	10,2	8,3	5,5	10,7	1,8
Brasil	1996	10,2	7,4	2,5	0,2	4,1	2,1
Canadá	2006	8,8	7,3	1,3	1,0	2,7	1,0
Chile	2001	12,9	6,2	2,1	1,0	9,9	1,5
Costa Rica	2006	7,0	3,5	2,1	4,9	0,0	1,8
Cuba	2005	10,6	1,5	1,0	0,0	9,6	0,5
Rep. Dominicana	1995	43,8	24,5	20,5	6,2	22,4	10,2
Ecuador	2002	24,5	14,5	12,1	2,0	13,0	8,5
El Salvador	2001	8,0	2,8	2,8	0,7	4,5	1,3
Guatemala	2002	38,6	15,6	8,9	10,1	31,6	7,4
Honduras	2004	15,7	8,5	4,7	2,5	9,2	3,2
México	1997	20,6	13,4	9,5	5,7	10,0	7,3
Nicaragua	2006	18,7	12,1	2,8	31,1	10,9	2,4
Paraguay	2001	12,6	7,3	4,9	2,4	4,9	2,4
Perú	2006	26,3	14,7	9,2	3,2	20,7	8,3
Puerto Rico	2005	3,2	2,1	0,0	1,1	2,1	0,0
Uruguay	2005	2,7	1,6	0,8	0,3	0,5	0,5
EUA	2005	11,9	7,9	1,6	1,2	6,4	1,2
Venezuela	1999	10,3	6,2	3,1	1,8	6,0	2,1
Este estudio		14,2	7,1	4,3	3,4	9,6	3,7

AMR, Región de las Américas; SM; estreptomycin; INH, isoniácida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol; TR, total de cepas resistentes; MDR, resistentes al menos a RIF y INH, EUA; Estados Unidos de América.

Usualmente, la TB en infantes y niños constituye el 15-20% del número total de casos en los países en desarrollo. La TB en la población infantil es un reflejo de la prevalencia de la enfermedad entre los adultos y representa un reservorio potencial para la infección. Asimismo, estudios previos han reportado una asociación entre la TB con cepas MDR y la edad menor de 45 años

(20-22). En Venezuela, el 40% de la población es menor de 17 años, pero, en nuestro estudio sólo 32 (9,9%) de los pacientes tiene edades menores de 15 años, este resultado puede explicarse, en parte, por las dificultades para la obtención de muestras para cultivo en pacientes pediátricos y su baja sensibilidad. Por otra parte, todos los casos de TB MDR tienen edades superiores a 34

años, con una media de 49 años. Este resultado revela que los pacientes jóvenes han adquirido la infección por bacilos sensibles circulantes, mientras que los pacientes de mayor edad con cepas MDR son producto de abandono del tratamiento que puede generar la emergencia de bacilos resistentes.

La determinación de la CIM mínima resulta útil para micobacterias con niveles intermedios de sensibilidad o "sensibilidad moderada" y en casos en los que se requiera ajustar las dosis terapéuticas de los medicamentos teniendo en cuenta las concentraciones séricas y la farmacocinética de cada uno, aspectos cruciales en el momento de tratar a los pacientes (23). La INH es una droga de primera línea muy importante. *M. tuberculosis* es altamente sensible a INH con CIM de 0,03–0,06 µg/ml (24). En el presente estudio para INH el CIM₅₀ y CIM₉₀ fue de ≤ 0,031 µg/ml y 0,062 µg/ml, respectivamente. La mayoría de las cepas mostraron resistencias >1 µg/ml de INH, con un rango de 0,125 µg/ml a > 1 µg/ml. La RIF es reconocida como la droga esterilizante mas importante del régimen acortado actual. Sin embargo, RIF tiene una vida media relativamente corta 2-4 h (25). En este trabajo se detectaron CIM₅₀ (<=0,062 µg/ml) y CIM₉₀ (0,125 µg/ml). La CIM para EMB de los 74,7% de los aislamientos fue de 2 µg/ml o menos, una concentración que es aproximadamente igual al pico que se alcanza en sangre y el epitelio de los pacientes (26, 27).

Aunque este trabajo tiene algunas limitaciones, tiene también varias fortalezas. Primero, la prueba de sensibilidad fue realizada en cada caso nuevo. Por lo tanto, no es posible sobre estimar la resistencia. Segundo, cada paciente se incluyó una sola vez y siempre el primer aislamiento, debido a esto, evitamos que se incluyeran los casos con mayor duración de cultivos positivos, que conducirían a una mayor representación de la TB MDR, debido que ésta condición, está mayormente asociada con casos de larga duración de cultivos positivos, que los casos de TB sensible. Por otra parte, las diferencias observadas con los resultados de la última encuesta nacional del año 1999 se pueden deber a varias razones; el método utilizado, la procedencia de las muestras ensayadas, las cuales son, en una gran proporción, provenientes de la zona de Petare y el período de tiempo analizado. Adicionalmente, los mayores niveles de resistencia observados en el presente estudio pudieran

deberse en parte a la inclusión de casos de fallas de tratamiento o abandonos, los cuales fueron referidos de varias partes de la ciudad a nuestro centro.

CONCLUSIÓN

A pesar de la limitaciones de este estudio, debido a que los aislamientos utilizados no forman parte de un muestreo representativo y la dificultad de distinguir entre resistencia primaria y adquirida, nuestro estudio provee información de la prevalencia de la resistencia a drogas en Caracas y la proporción de casos que son resistentes a las drogas anti-tuberculosas ofrece una guía valiosa en la efectividad del tratamiento de primera línea. Varias recomendaciones se pueden derivar de los resultados de este proyecto. Primero, los pacientes con TB MDR, debe ser identificados tan pronto como sea posible, pues, la resistencia a drogas puede estar presente en el episodio original y contribuir a la falla de tratamiento sin la necesidad de abandono del mismo. Segundo, es necesario que se haga una encuesta de carácter nacional prontamente, para determinar las tendencias actuales de las resistencias en Venezuela. Finalmente, nuestros resultados muestran una prevalencia de aislamientos de *M. tuberculosis* con resistencia a drogas, especialmente MDR, en el área de estudio. La transmisión de TB con cepas MDR dentro de la comunidad es una situación emergente que debe ser abordada prontamente para determinar los factores de riesgo que impulsan la transmisión de la TB-MDR en nuestros entornos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Agradecemos a Belquis Pinto, Patricia Chacón y Eneida López por todo su apoyo a este estudio.

REFERENCIAS

- (1) WHO report 2008: Global tuberculosis control. Geneva: World Health Organization; 2008 [citado el 05 septiembre 2008]. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/annex_3/en/index.html.
- (2) Crofton J, Mitchison D. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *BMJ* 1948;2:1009-1015.
- (3) Canetti G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1965;92:687-703.

- (4) Frieden TR, Sterling T, Pablos-Méndez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med*. 1993 Feb 25;328(8):521-526.
- (5) Multidrug-resistant tuberculosis outbreak on an HIV ward-Madrid, Spain, 1991-1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1996 Apr 26;45(16):330-333.
- (6) Cohn ML, Middlebrook G, Russell WF, Jr. Combined drug treatment of tuberculosis. I. Prevention of emergence of mutant populations of tubercle bacilli resistant to both streptomycin and isoniazid in vitro. *J Clin Invest*. 1959 Aug; 38(8):1349-1355.
- (7) Kochi A, Varelzdis B, Styblo K. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. *Res Microbiol*. 1993 Feb; 144(2): 104-110.
- (8) Goble M, Iseman MD, Madsen LA, Waite D, Ackerson L, Horsburgh CR, Jr. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med*. 1993 Feb 25;328(8):527-532.
- (9) Mahmoudi A, Iseman MD. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. Common errors and their association with the acquisition of drug resistance. *JAMA*. 1993 Jul 7;270(1):65-68.
- (10) Jaspe RC, Rojas YM, Flores LA, Sofia Toro E, Takiff H, de Waard JH. Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas. *Trop Med Int Health*. 2009 Apr;14(4):468-471.
- (11) Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep; 33(9):2324-2327.
- (12) BIOLAC. Nuevas tecnologías para el diagnóstico y pruebas de susceptibilidad a drogas de *Mycobacterium tuberculosis* para países en vías de desarrollo. In: RELACTB, editor. La paz: INLASA; 1998.
- (13) Leonard B, Coronel J, Siedner M, Grandjean L, Caviedes L, Navarro P, et al. Inter- and intra-assay reproducibility of microplate Alamar blue assay results for isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, ciprofloxacin, and capreomycin drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2008 Oct;46(10):3526-3529.
- (14) World Health Organization. Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing: WHO report 2008. Geneva: World Health Organization; 2008 [citado el 05 septiembre 2008]. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/fullreport.pdf.
- (15) World Health Organization. Anti-Tuberculosis drug resistance in the world. Fourth Global Report. Geneva: WHO Press; 2008 [citado el 05 septiembre 2008]. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf.
- (16) World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. World Health Organization, Geneva, Switzerland.; 2003 [citado el 8 septiembre]. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/cds_tb_2003_313/en/.
- (17) Gupta P, Jadaun GP, Das R, Gupta UD, Srivastava K, Chauhan A, et al. Simultaneous ethambutol & isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res*. 2006 Feb;123(2):125-130.
- (18) Sam IC, Drobniewski F, More P, Kemp M, Brown T. *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2006 May;12(5):752-759.
- (19) Storla DG, Rahim Z, Islam MA, Plettner S, Begum V, Myrvang B, et al. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in the Sunamganj District of Bangladesh. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(2):142-145.
- (20) Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax*. 2006 Feb;61(2):158-163.
- (21) Djuretic T, Herbert J, Drobniewski F, Yates M, Smith EG, Magee JG, et al. Antibiotic resistant tuberculosis in the United Kingdom: 1993-1999. *Thorax*. 2002 Jun;57(6): 477-482.
- (22) Kordy FN, Al-Thawadi S, Alrajhi AA. Drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004 Aug;8(8):1007-1011.
- (23) Schaaf HS, Willemse M, Cilliers K, Labadarios D, Maritz JS, Hussey GD, et al. Rifampin pharmacokinetics in children, with and without human immunodeficiency virus infection, hospitalized for the management of severe forms of tuberculosis. *BMC Med*. 2009;7:19.
- (24) Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992 Aug 13;358(6387):591-593.
- (25) Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(5):327-341.
- (26) Vestal AL. Procedures for isolation and identification of mycobacteria. US Department of Health EaW, editor. CDC Atlanta, Georgia: Centers for Diseases Control; 1977.
- (27) Inderlied CB, Salfinger M. Antimicrobial agents and susceptibility test. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Mycobacteria - Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1995. p. 1385-1404.

Recibido: 16 de marzo de 2009 / Aprobado: 24 de febrero de 2010