

Original

La estreptomycin como fármaco de segunda línea en la quimioterapia de la tuberculosis

P. Ruiz, F. Rodríguez-Cano, F.J. Zerolo y M. Casal

Centro de Referencia de Micobacterias, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, España

RESUMEN

La estreptomycin fue el primer antibiótico utilizado frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Se empleó durante años en regímenes monoterápicos que determinaron la aparición de resistencias, relegando por ello su utilización. Ante las resistencias detectadas frente a los fármacos actualmente utilizados, se ha renovado el interés por este agente. Su mecanismo de actuación se centra en el ribosoma, inhibiendo la síntesis proteica de la micobacteria. La resistencia aparece cuando se producen mutaciones en los genes codificadores de rRNA 16S y de la proteína S12. Hemos estudiado 899 cepas de *M. tuberculosis* frente a la estreptomycin, de las cuales 713 eran pulmonares y 186 extrapulmonares. El método utilizado ha sido el sistema BACTEC 460 TB inicialmente y el sistema ESP II. Se usaron como control las cepas patrón ATCC27294 (sensibles a la estreptomycin, la rifampicina, el etambutol y la isoniazida) y ATCC35820 (resistente a la estreptomycin). Los resultados obtenidos mostraron una resistencia del 2,1%, secundaria en todos los casos. En 12 cepas se observó multiresistencia.

Palabras clave: Estreptomycin - *Mycobacterium tuberculosis* - Resistencia

Streptomycin as second-line chemotherapy for tuberculosis

SUMMARY

Streptomycin was the first antibiotic to be used against Mycobacterium tuberculosis. It was used for years in monotherapy regimens, thereby resulting in the appearance of resistance and the relegation of its use. The resistance detected against drugs currently employed has led to a renewed interest in streptomycin. Its mechanism of action is centered on the ribosome, inhibiting the protein synthesis of the microbacteria. Resistance appears when mutations in the genes codifying for rRNA 16S and for protein S12 are produced. We studied the use of streptomycin against 899 M. tuberculosis strains, 713 of which were from pulmonary and 186 from extrapulmonary isolates. The BACTEC 460 TB system was initially employed as was the ESP II system. As controls, the ATCC27294 pattern strains (susceptible to streptomycin, rifampicin, ethambutol and isoniazid) were used. The results showed 2.1% secondary resistance in all the cases. Multiresistance was observed in 12 strains.

Key words: Streptomycin - *Mycobacterium tuberculosis* - Resistance

INTRODUCCIÓN

La estreptomycinina fue el primer antibiótico que se mostró activo frente al agente etiológico de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), por lo cual se utilizó en los programas de control de esta enfermedad durante años. Sin embargo, a partir de la década de 1960, y como resultado del significativo grado de resistencia surgido cuando se empleaba en regímenes monoterápicos (debido a la aparición de algunos efectos colaterales y, sobre todo, a la aparición de mejores fármacos como la rifampicina y la isoniazida), se produjo una disminución muy significativa del uso de estreptomycinina en los países industrializados (1).

La aparición en Estados Unidos, y más recientemente en otros países, de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a algunos o a todos los fármacos que en un principio desplazaron a la estreptomycinina (2), ha renovado el interés por ésta.

Es un hecho conocido desde hace años que los efectos de la estreptomycinina en relación con su mecanismo de acción se producen en el ribosoma. El fármaco inhibe la síntesis proteica en *M. tuberculosis* por interacción en diferentes pasos del proceso, produciendo errores de lectura que perturban la proliferación proteica en la micobacteria (3).

La estreptomycinina ataca al ribosoma de las células bacterianas sensibles en su subunidad 30S, y para que sea efectiva el ribosoma debe estar en plena operación de lectura del RNA mensajero. El lugar preciso de acción es una de las 15 proteínas que forman parte de dicha subunidad, en concreto la 10, a la cual se une la estreptomycinina y con ello se detiene la lectura del mensaje genético. Sin embargo, este mecanismo no explica la capacidad bactericida del antibiótico, ya que los ácidos nucleicos permanecen activos. También se ha propuesto como otro posible mecanismo de acción la inducción de falsas lecturas, que lleva consigo la producción por la micobacteria de proteínas no funcionales (4).

Podemos concluir señalando que todos los trabajos coinciden en situar el mecanismo de acción de la estreptomycinina sobre el ribosoma micobacteriano, produciendo errores de lectura en la codificación genética e inhibiendo el proceso de síntesis proteica mediante la actuación en diferentes pasos de la iniciación o translocación en el RNAm ribosomal (5).

Otros estudios que han intentado clarificar aspectos relacionados con la resistencia al fármaco por parte de *M. tuberculosis* siguen definiendo con exactitud el mismo mecanismo de acción de la estreptomycinina, sin aportar ningún aspecto distinto a los ya comentados (6-8).

En los últimos años existe un interés creciente en España por conocer la situación de la tuberculosis, motivado

por la escasez de datos obtenidos en décadas anteriores, que nos situaban como uno de los países desarrollados con peor situación epidemiológica (9-11). En este sentido, el propósito de nuestro trabajo ha sido conocer el grado de resistencia a la estreptomycinina observado en las cepas de *M. tuberculosis* recibidas en el Centro de Referencia de Córdoba durante los años 1996 a 2001.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió la sensibilidad *in vitro* a la estreptomycinina de 899 cepas de *M. tuberculosis* recibidas en el Centro de Referencia de Micobacterias de Córdoba, durante los años 1996 a 2001. Las cepas procedían de pacientes de diferentes comunidades autónomas, aunque en su mayoría de Andalucía.

Todas las cepas incluidas en el estudio fueron identificadas por métodos convencionales morfológicos, bacteriológicos, bioquímicos, genéticos (*Accu Probe* y *Genotype*) y cromatográficos (12-14).

Para el estudio de sensibilidad se utilizó el protocolo definido para el sistema BACTEC 460 TB (15). También se empleó el nuevo sistema automatizado ESP II en paralelo con el sistema BACTEC. Utilizando cultivos en fase de crecimiento se preparaba una emulsión con agua destilada estéril ajustándola a una turbidez aproximada al nº 1 de McFarland (aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias por ml) (16). De esta emulsión se inoculaba 0,1 ml en el vial al cual previamente se había incorporado el antimicrobiano, realizando la determinación de sensibilidad para una concentración de estreptomycinina de 6 mg/l. Se procedía a la incubación de los viales a 37 ± 1 °C y se realizaba la lectura diaria (24 ± 2 h) a partir del día de la siembra (17).

En todas las determinaciones se utilizaron viales control de crecimiento y cepas control de sensibilidad conocida (ATCC 27294 y ATCC 35820).

RESULTADOS

La resistencia global determinada en las 899 cepas de *M. tuberculosis* recibidas durante los años 1996 a 2001 fue del 2,1% (18 cepas resistentes a la estreptomycinina).

En la Tabla 1 se detalla el número de cepas sensibles y resistentes a la estreptomycinina, desglosando los resultados por año en valores absolutos y porcentuales, así como los globales de los seis años del estudio.

Las 18 cepas resistentes procedían en su mayoría de la Comunidad Andaluza (una de Almería, una de Cádiz, dos

Tabla 1. Resistencia a la estreptomina.

Año	Nº cepas	Sensibles nº (%)	Resistentes* nº (%)
1996	362	354 (97,8)	8 (2,2)
1997	163	158 (96,9)	5 (3,1)
1998	104	101 (97,1)	3 (2,9)
1999	102	102 (100)	0 (0,0)
2000	82	81 (98,8)	1 (1,2)
2001	86	85 (98,9)	1 (1,1)
Total	899	881 (97,9)	18 (2,1)

*En todos los casos la resistencia fue secundaria.

de Córdoba, ocho de Málaga y una de Sevilla), dos de la Comunidad Canaria (Tenerife) y tres de Castilla-La Mancha (Ciudad Real).

Respecto al tipo de resistencia detectada, debemos manifestar que no hubo ningún caso de resistencia primaria; todas las cepas resistentes correspondían a formas de resistencia secundaria. De las 18 cepas resistentes, dos mostraron resistencia a estreptomina e isoniazida, 15 fueron resistentes a estreptomina, rifampicina e isoniazida, y una presentó resistencia a los cuatro fármacos de primera línea (estreptomina, rifampicina, etambutol e isoniazida). De las 18 cepas que presentaron resistencia a la estreptomina, 16 fueron multirresistentes (resistencia al menos a rifampicina e isoniazida).

DISCUSIÓN

La resistencia a la estreptomina ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado que se produce por un mecanismo de mutación relacionado con el gen de la proteína ribosomal S12, produciéndose alteraciones en la secuencia de sus aminoácidos. Estas alteraciones se han mostrado como unas mutaciones sin sentido que afectan al gen *rpsL* codificador (18).

Otra mutación adicional que confiere resistencia a la estreptomina se ha localizado en el gen 16S RNAr (*rrs*), vinculada en cuanto a su localización a zonas de los nucleótidos 530 y 912 (19). La demostración de que la resistencia a la estreptomina se asocia con mutaciones simples del gen 16S RNAr en diferentes nucleótidos, como 513 (A, Cit) y 516 (C, T), además de los ya comentados, indica que la resistencia de *M. tuberculosis* a la estreptomina está estrechamente relacionada con mutaciones en los genes del DNA ribosomal (genes DNAr) (6).

Se ha observado que en aproximadamente el 75% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la estreptomina, la

resistencia se debe a mutaciones en 16S RNAr o a alteraciones en la proteína S12 (6). No obstante, algunos cultivos de estas micobacterias resistentes mostraban estructuras normales en 16S RNAr y en la proteína S12, lo cual sugiere la posible existencia de otros mecanismos de resistencia (7), tal como han propuesto algunos trabajos que señalan que estas micobacterias podrían presentar en algunos casos modificaciones en otros componentes del ribosoma (5). Esta teoría, según algunos autores, parece más probable que la que propone la existencia de cambios en la permeabilidad de la pared celular de la micobacteria. En este sentido y en relación al mecanismo por el cual se produce la resistencia a la estreptomina, cabe señalar que no se han encontrado transposones ni plásmidos relacionados con ella en *M. tuberculosis* (7).

Los significativos avances que se han producido en el conocimiento de las bases moleculares como causa de la resistencia a la estreptomina en *M. tuberculosis* ratifican que el grado de resistencia depende de mutaciones en los genes que codifican dos componentes del ribosoma, el 16S RNAr y la proteína S12, ya comentados.

La mutación más frecuente asociada con resistencia a la estreptomina en *M. tuberculosis* se localiza en el codón 43 del gen *rpsL*, resultado de la sustitución de arginina por lisina en esta posición en la proteína ribosomal S12. Otras mutaciones en el gen *rpsL* asociadas a esta resistencia corresponden a la sustitución en el codón 43 de lisina por treonina, y en el codón 88 de lisina por arginina (20, 21). También se han observado mutaciones en el codón 88 del gen *rrs* codificador de la 16S RNAr, aunque su significado aún no está claro (6).

En resumen, parece evidente que la resistencia a la estreptomina en *M. tuberculosis* está asociada con mutaciones en *rpsL*, que se concretan en sustituciones de aminoácidos en los codones 43 y 88 de la proteína ribosomal S12. Estas mutaciones se han detectado en el 54% de los casos de resistencia (8). Otras alteraciones en la región 530 o 915 del gen *rrs* se han asociado igualmente como causa de resistencia a este fármaco en *M. tuberculosis* (8, 22), especialmente las mutaciones en las posiciones 491, 512, 513 y 516 y en 904 y 905 (6, 7, 23).

Algunos autores han detectado ambas mutaciones en *rpsL* y *rrs*, y dado que parece que cada mutación en uno de los genes por sí solo se asocia con resistencia al fármaco, el significado de esta doble mutación no está claro (6, 8).

Parece existir cierta concordancia en diferentes trabajos en cuanto al porcentaje cifrado para cada mutación en los diferentes genes: en *rpsL* en torno al 50% a 55%, y en *rrs* aproximadamente el 10% (8, 19). No obstante, algunos au-

tores han identificado cultivos de *M. tuberculosis* resistentes a la estreptomycinina que no presentan alteraciones en estos genes, en algunos casos hasta el 25% a 35%, lo que indica que es razonable pensar en la existencia de un mecanismo adicional que medie en la resistencia a este antibiótico (7).

Estudios sobre cultivos de *M. tuberculosis* resistentes a la estreptomycinina han localizado mutaciones en el nucleótido 128 del gen *rpsL*, en concreto una sustitución de lisina por arginina en la estructura de la proteína ribosomal S12, alteración que no se detecta en los cultivos con bajo grado de resistencia (24). En estos casos sí identifican una sustitución de aminoácidos en 912 del gen *rrs* (C-G 865); así mismo, no se han encontrado mutaciones en 530 de la codificación de este gen (*rrs*), como otros autores han publicado y ya hemos referido. Sí coinciden en sus conclusiones en cuanto a la evidencia de que existen mecanismos alternativos que confieren resistencia a la estreptomycinina en algunos cultivos de *M. tuberculosis* (24).

En el intento de identificar nuevos mecanismos de resistencia, trabajos recientes cuantifican aproximadamente en una tercera parte los cultivos de *M. tuberculosis* resistentes a la estreptomycinina que se manifiestan sin las alteraciones descritas en los genes, confirmando ello que existen mecanismos alternativos. En este sentido, se ha propuesto que cambios en la permeabilidad de la pared celular de la micobacteria, producción de enzimas modificadas de los aminoglucósidos o alteraciones en otras moléculas ribosomales puedan ser causantes de resistencia a la estreptomycinina en *M. tuberculosis* (8).

Todo lo comentado lleva a concluir que existen dos mecanismos de resistencia a la estreptomycinina en *M. tuberculosis*: uno ribosomal que produce resistencia de alto y medio grado, y otro consecuencia de modificaciones en la permeabilidad de la pared celular que puede dar lugar a resistencia de bajo grado, pudiéndose dar ambos mecanismos simultáneamente y potenciando con ello el grado de resistencia (25).

En el presente trabajo hemos determinado cuantitativamente el grado de resistencia de *M. tuberculosis* a la estreptomycinina. Para ello hemos estudiado 899 cepas de *M. tuberculosis* recibidas en el Centro de Referencia de Micobacterias de Córdoba en los años 1996 a 2001. Las cepas analizadas corresponden en su totalidad a cultivos recibidos en este Centro, lo que implica probablemente una diferencia con otros estudios. Por ello, la interpretación de los resultados deberá hacerse con precaución, teniendo presente que pueden estar sesgados al ser un centro de referencia y por tanto casos seleccionados, no comparables con otros resultados obtenidos en el medio hospitalario ni con estudios que se pueden realizar sobre la población general.

Fueron resistentes a la estreptomycinina el 2,1% del total de las cepas de *M. tuberculosis* a las que se realizó antibiograma (899 cepas) durante los años 1996 a 2001, manteniéndose durante los seis años en cifras próximas: 2,2% en 1996, 3,1% en 1997 y 2,9% en 1998. Durante el año 1999 no recibimos ninguna cepa resistente a la estreptomycinina. En los dos últimos años tuvimos una cepa resistente cada año. Esta cifra de resistencia a la estreptomycinina, del 2,1%, es muy parecida a la obtenida en otro estudio realizado durante los años 1993 a 1999, que halló un 2,2% (17).

No detectamos ningún caso de resistencia primaria en las cepas de nuestro estudio, hecho que supone un descenso en relación a lo reflejado durante el periodo 1982-1992 en nuestro centro de referencia, que supuso el 1,2% de resistencia (26). Con relación a este tipo de resistencia, todas las referencias que hemos localizado en la bibliografía consultada han encontrado porcentajes superiores a los detectados por nosotros, aunque con valores dispares. Así, podemos ver cifras que superan el 2% de resistencia (27-29), y cifras algo más altas: 2,6% (30), 28% y 3,6% en un trabajo realizado durante dos quinquenios diferentes sobre resistencia primaria (31), y el 3% reflejado también en un estudio de esta misma resistencia en Galicia (32). Valores aún superiores a éstos son los manifestados en diversos trabajos, con cifras entre el 2,8% y el 3,6% en un estudio realizado en tres periodos diferentes (33), del 4,1% (34), el 6,7% (35) y el 7,1% (36). En otros trabajos extranjeros encuentran porcentajes del 4,1% (37) y el 6,2% (38).

La resistencia secundaria a la estreptomycinina resultante en nuestro estudio ha supuesto el 2,1%, valor muy parecido al obtenido en 1993-1999, que fue del 2,2%, y por debajo del hallado en el decenio previo, que fue del 6,1% (26). Esta resistencia está próxima a los valores reflejados en otros estudios: el 2,1% (35), el 2,2% (36) o el 2,7% (37). Cifras de resistencia secundaria inferiores al 2% se han descrito en diversos estudios (27-29, 34), e igualmente podemos encontrar cifras superiores a las nuestras, como el 4,2% referido en un estudio sobre 337 casos realizado entre los años 1988 y 1992 (32), o el 3,6% reflejado en otro estudio sobre 390 muestras realizado fuera de nuestro país (37).

El porcentaje de resistencia global a la estreptomycinina (2,1%) detectado en nuestro estudio significa una escasa diferencia con el periodo 1993-1999, en que fue del 2,2%, y un descenso cuantitativo con respecto al obtenido en este mismo centro en el periodo de 1982 a 1992, del 8,7% sobre un total de 1696 cepas analizadas (26).

En el medio hospitalario se encuentran tasas de resistencia global del 2% en un estudio sobre 148 casos en Cór-

doba (39), o algo superiores, como el 2,2% detectado en dos trabajos publicados en 1996, uno realizado con 276 cepas en la región de Castilla-La Mancha (29) y otro con 760 muestras recopiladas durante un periodo de cuatro años (28), o el 2,7% en otro estudio en el País Vasco (40). En la Comunidad de Valencia, en dos periodos diferentes se halló una resistencia a la estreptomycin del 2,9% entre 235 muestras, y del 1% en otro estudio realizado entre 1994 y 1996 sobre un total de 100 cepas (41). Cifra igualmente algo más baja es la que se encuentra en el estudio sobre 470 muestras realizado en 1993 por Esteban y cols., con un 1,9% de resistencia (27). La tasa de resistencia obtenida por nosotros es ligeramente inferior a la manifestada en otro estudio realizado en un hospital provincial de Valencia, que la cuantifica en un 3,3% (42).

Trabajos publicados sobre estudios realizados en medio extrahospitalario en España aportan cifras de resistencia a la estreptomycin variables. Así, podemos referir porcentajes del 4,2% en un estudio de 119 casos en la provincia de Castellón (43), del 5,3% en un estudio sobre 228 casos (30), del 5,7% (34), el 7,6% (33) y el 9,4% (36).

Otros estudios publicados fuera de nuestro entorno cuantificaban en un 5,3% el índice de resistencia a la estreptomycin sobre un total de 946 cepas estudiadas procedentes de personas hospitalizadas (44). Se han publicado también estudios con cifras mucho más altas, reflejando resistencias del 9,6% (45), el 19% de un total de 538 muestras en un estudio realizado sobre población general afectada de tuberculosis (46), o más recientemente el 11,8% en Italia (47).

En otros estudios extranjeros podemos encontrar diversos grados de resistencia. En el publicado en 1998 y realizado en Holanda con 1836 cepas se comparan dos grupos de población según su nacionalidad, holandesa o no, reflejando cada grupo un valor de resistencia del 3,6% y el 10,6%, respectivamente (48).

Otras tasas de resistencia que podemos referir de estudios realizados en diversas poblaciones son el 3,3% sobre 332 muestras en un estudio realizado en el medio hospitalario (49), el 6,2% en estudios realizados en Estados Unidos (50), el 7,6% (38) o el 7,7% (37).

Dada la singularidad, ya manifestada con anterioridad, de las muestras que se reciben en un centro de referencia, hemos querido consultar los valores hallados en otros centros que hayan realizado y publicado estudios de resistencia en los países de nuestro entorno. Con relación a la resistencia a la estreptomycin en la totalidad de las cepas, en la bibliografía obtenida encontramos datos dispares: desde nin-

guna resistencia durante el año 1992 en un Centro de Referencia de Escocia (51) hasta el 3,1% obtenido en Suecia (52), y cifras superiores, del 7,5% en Francia y del 13,5% en Portugal (53). Otros centros en diferentes países manifiestan cifras de resistencia variables (54): 2,4% en Alemania, 3% en Croacia, 4% Bélgica, 5,4% en Holanda, 6% en Dinamarca y 6,8% en Grecia.

Podemos concluir que en nuestro Centro la resistencia a la estreptomycin en general ha mantenido valores aproximados desde 1993 a 1996. Durante los años 1997 y 1998 se ha producido un ligero aumento en la resistencia en las cepas recibidas, aunque esta tendencia no se ha mantenido durante 1999, 2000 y 2001, en los que ha habido un descenso significativo.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Proyecto de investigación nº 72 (año 2001).

Correspondencia: Prof. M. Casal, Departamento de Microbiología, Centro de Referencia de Micobacterias, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba. Tel. 957 21 82 84. Fax: 957 21 82 29. e-mail: mi1carom@uco.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Bloom, B.R., Murray, C.S.L. *Tuberculosis: Commentary on a re-emergent killer*. Science 1992; 257: 1055-1064.
2. Snider, D.E., Roper, W.L. *The new tuberculosis*. N Engl J Med 1992; 326: 703-705.
3. Shaila, M.S., Gopinathan, K.P., Ramakrishnan, T. *Protein synthesis in Mycobacterium tuberculosis H37Rv and the effect of streptomycin in streptomycin-susceptible and resistant strains*. Antimicrob Agents Chemother 1973; 4: 205-213.
4. Dámaso, D., Moreno-López, M., Daza, R. *Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico*. Gruteso, Madrid 1984.
5. Moazed, D., Noller H.F. *Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA*. Nature (London) 1987; 327: 389-394.
6. Meier, A., Kirschner, P., Bange, F.C., Vogel, U., Böttger E.C. *Genetic alterations in streptomycin-resistance Mycobacterium tuberculosis: Mapping of mutations conferring resistance*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 228-233.
7. Honoré, N., Cole, S.T. *Streptomycin resistance in Mycobacteria*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 238-242.
8. Sreevatsan, S., Xi Pan, Stockbauer, K.E., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. *Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from diverse geographic localities*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1024-1026.
9. Collaborative Group for the Study of Tuberculosis in Spain. *Epidemiological trends of tuberculosis in Spain from 1988 to 1992*. Tuberc Lung Dis 1995; 76: 522-528.

10. Rey, R., Ausina, V., Casal, M. y cols. *Situación actual de la tuberculosis en España. Una perspectiva sanitaria en precario a los países desarrollados.* Med Clin (Barc.) 1995; 105: 703-707.
11. Caminero Luna, J.A. *Situación actual de la tuberculosis en España.* Arch Bronconeumol 1994; 30: 371-374.
12. Casal, M. *Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias.* Universidad de Córdoba, Córdoba 1991.
13. Ruiz, P., Gutiérrez, J., Zerolo, F.J., Casal, M. *Genotype Mycobacterium assay for identification of Mycobacterial species isolated from human clinical samples by using liquid medium.* J Clin Microbiol 2002; 40: 8.
14. Thibert, L., Lapierre, S. *Routine application of high performance liquid chromatography for identification of mycobacteria.* J Clin Microbiol 1993; 31: 1759-1763.
15. Siddiqi, S.H., Libonati, J.P., Middlebrok, G. *Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol 1981; 13: 908-912.
16. Finegold, S.M., Martín, N.J. *Diagnóstico Microbacteriológico*, 6ª ed. Editorial Panamericana, Buenos Aires 1983; 638.
17. Ruiz, P., Rodríguez Cano, F., Zerolo, F.J., Casal, M. *Investigation of the in vitro activity of streptomycin against Mycobacterium tuberculosis.* Microb Drug Resist 2002; 8: 147-149.
18. Liu, X.Q., Gillham, N.W., Boyton, J.E. *Chloroplast ribosomal protein gene rps 12 of Chlamydomonas reinhardtii. Wild type sequence, mutation to streptomycin resistance, dependence and function in E. coli.* J Biol Chem 1989; 264: 16100-16108.
19. Noller, H. *Structure of ribosomal RNA.* Ann Rev Biochem 1984; 53: 119-162.
20. Heym, B., Honoré, N., Truffot-Pernot, C. y cols. *Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: A molecular study.* Lancet 1994; 344: 293-298.
21. Honoré, N., Marchall, G., Cole, S.T. *Novel mutation in 16S rRNA associated with streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 769-770.
22. Sander, P., Meier, A., Böttger, E.C. *Ribosomal drugs resistance in mycobacteria.* Res Microbiol 1996; 147: 59-67.
23. Douglas, J., Steyn, L.M. *A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates.* J Infect Dis 1993; 167: 1505-1506.
24. Cooksey, R.C., Morlock, G.P., McQueen, A., Glickman, S.E., Crawford, J.T. *Characterization of streptomycin resistance mechanisms among Mycobacterium tuberculosis isolates from patients in New York.* Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1186-1188.
25. Meier, A., Sander, P., Schapper, K.J., Scholt, M., Böttger, E.C. *Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2452-2454.
26. Casal, M., Gutiérrez, J., Linares, M.J., Ruiz, P. *Resultados de la investigación sobre tuberculosis y micobacteriosis en el decenio 1982-1992.* Centro de Referencia de Micobacterias, Consejería de Salud, Junta de Andalucía, Facultad de Medicina, Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba, Monografía nº 220, 1994.
27. Esteban, J., Gegúndez, M., García-Corbeira, P., Soriano, F. *Incidencia de Mycobacterium tuberculosis resistente a tuberculostáticos. Aspectos clínicos e impacto sobre la terapia y evolución.* Enferm Infecc Microbiol Clin 1993; 11: 415-419.
28. Miralles, P., Moreno, S., Parras, F. y cols. *Tuberculosis resistente a fármacos en un hospital general.* Rev Clin Esp 1996; 196: 21-23.
29. Arévalo, M., Solera, J., Cebrián, D., Bartolomé, J., Robles, P. *Risk factors associated with drug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Castilla-La Mancha (Spain).* Eur Respir J 1996; 9: 274-278.
30. Pérez del Molino, M., Pardo, F., Carballo, E., Gutiérrez, M. *Resistencia de M. tuberculosis a fármacos en una área endémica.* Rev Esp Quimioterap 1994; 7: 137-141.
31. Ausina, V., García-Barceló, M., Luquin, M., Belda, F., Fernández, J., Esteban, G. *Estudio de las resistencias bacterianas primarias e iniciales en enfermos tuberculosos de un hospital general durante 1983-1987.* Enferm Infecc Microbiol Clin 1990; 8: 274-277.
32. Álvarez, D., Valle, J., Martino, M., Gordo, P., Carreira, J., Valdés, L. *Estudio de las resistencias primarias a fármacos antituberculosos en Galicia.* Arch Bronconeumol 1994; 30: 297-300.
33. Ausina, V., Riutort, N., Viñado, B. y cols. *Prospective study of drug-resistant tuberculosis in a Spain urban population including patients at risk for HIV infection.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14: 105-110.
34. Peña, J., Ortega, J. *Estudio transversal multihospitalario de tuberculosis y resistencias en Madrid (octubre de 1993-abril de 1994).* Med Clí 1996; 106: 1-6.
35. Caminero, J., González, A., Rodríguez de Castro, F., Juliá, G., Fernández, J., Cabrera, P. *Epidemiología de las resistencias bacilares en la isla de Gran Canaria.* Arch Bronconeumol 1991; 27: 17-22.
36. Nogales, M., Aller, A., Martín, E. *Incidencia de Mycobacterium tuberculosis resistente a tuberculostáticos en un hospital general.* Rev Esp Quimioterap 1995; 8: 51-54.
37. Trébucq, A., Anagonou, S., Gninafon, M., Lambregts, K., Boulahbal, F. *Prevalence of primary and acquired resistance of Mycobacterium tuberculosis to antituberculosis drugs in Benin after 12 years of short-course chemotherapy.* Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3: 466-470.
38. Riantawan, P., Punnotok, J., Chaisuksuwan, R., Pransujarit, V. *Resistance of Mycobacterium tuberculosis to antituberculosis drugs in the Central Region of Thailand.* Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 616-620.
39. Gutiérrez, J., Ruiz, P., Casal, M. *Estudio de resistencias de M. tuberculosis en el Hospital Universitario "Reina Sofía" de Córdoba.* Rev Esp Quimioterap 1994; 7 (Supl. 3): 235-236.
40. Unzaga, M., Sota, M., Melero, P., Berdonces, P., Ezpeleta, C., Cisterna, R. *Estudio de la sensibilidad de Mycobacterium tuberculosis en nuestro medio.* Enferm Infecc Microbiol Clin 1996; 14: 399-400.
41. Rodríguez, J., Celdrán, M., Royo, G. *Mycobacterium tuberculosis: Evolución de las resistencias en nuestro medio.* Arch Bronconeumol 1997; 33: 428-429.
42. Cremades, M., Menéndez, R., Santos, M., Martínez, M., Ferrando, D., Perpiñá, M. *Características de la tuberculosis en un hospital terciario durante los años 1993-1996. Influencia de la coinfección por el VIH.* Arch Bronconeumol 1998; 34: 333-338.
43. Moreno, R., González, F., Pardo, F., Soler, J., Prada, P. *Resistencia de M. tuberculosis en la provincia de Castellón.* Arch Bronconeumol 1996; 32: 118-121.
44. Hirano, K., Kazumi, Y., Abe, C., Aoki, M., Aoyagi, T. *Resistance to antituberculosis drugs in Japan.* Tuberc Lung Dis 1996; 77: 130-135.
45. Tümer, O., Caglayan, B., Kurutepe, M., Ilgazli, A., Hacibekiroglu, A., Kazgöl, N. *Drug resistant tuberculosis in the chest hospital Heybeliada in Turkey.* Tubercle and Lung Disease, 28th World Conference of IUATLD/VICTMR 1994; Suppl. 1: 20.

46. Chanteau, S., Rasolofo, V., Ramarokoto, H. y cols. *Anti-tuberculosis drug resistance in Madagascar in 1994-1995*. Int J Tuberc Dis 1997; 1: 405-410
47. Mazzei, L., Croce, G., Zarzana, A., Biagioli, D., Sposato, B., Pulcinelli, A. *Drug-resistance of Mycobacterium tuberculosis in time*. Eur Rev Med Pharmacol Sci 1998; 2: 21-24.
48. Van Lambregts, C., Jansen, H., Nagelkerke, N., Van Klingeren, B., Veen, J. *National surveillance of drug-resistant tuberculosis in The Netherlands: Rates, risk factors and treatment outcome*. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 288-295.
49. Djuric, O., Panjevic, T., Skodric, V., Pesic, I. *Drug-resistant tuberculosis in hospitalized patients*. Tubercle and Lung Disease, 28th World Conference of IUATLD/VICTMR 1994; Suppl. 1: 14.
50. Moore, M., Onorato, I., McCray, E., Castro, K. *Trends in drug-resistant tuberculosis in United-States, 1993-1996*. JAMA 1997; 278: 833-837.
51. Scottish Mycobacteria Reference Laboratory. Report for 1992. Bacteriology Department, City Hospital, Edinburgh EH10 5SB.
52. Hoffner, S., Romanus, V. *Drug resistant tuberculosis in Sweden 1991-95*. Rev Esp Quimioterap 1997; 10: 134.
53. Pablos-Mendez, A., Raviglione, M., Laszlo, A. y cols. *Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997*. New Engl J Med 1998; 338: 1641-1649.
54. Casal, M.M., Casal, M. *Preliminary multicenter surveillance of tuberculosis drug resistance in some european countries*. En: Casal, M. (Ed.). Clinical Mycobacteriology. Prous Science, Barcelona 1998; 415-419.