

MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE
LA RESISTENCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* A LOS
ANTIMICROBIANOS



VIVIANA DE HOYOS URZOLA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2009

MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE
LA RESISTENCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* A LOS
ANTIMICROBIANOS

VIVIANA DE HOYOS URZOLA

APROBADO

Ingrid Schuler Ph.D Bióloga
Decana Académica

Luz Amparo Maldonado M. Ed
Directora Carrera de Bacteriología

MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE
LA RESISTENCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* A LOS
ANTIMICROBIANOS

VIVIANA DE HOYOS URZOLA

APROBADO

Fredy Gamboa
Bacteriologo. M.S c. Ph.D
Director

Johana Hernandez
Microbióloga médica M.S c
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien, se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

RESUMEN

La tuberculosis es considerada un grave problema de salud pública. En consecuencia, cada día, nos enfrentamos con una situación mucho más grave a causa de la resistencia bacteriana a fármacos. Debido a factores demográficos y socioeconómicos, a la escasa atención prestada al control de la tuberculosis en muchos países y por la epidemia de VIH, se ha producido un aumento en el número de casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva, que a menudo queda sin diagnosticar y sin tratar.

La metodología convencional de identificación de *M. tuberculosis* se basa en una identificación preliminar mediante el tiempo de crecimiento, los aspectos morfológicos y la producción de pigmentos de las colonias. Después de haber hecho esta identificación se realizan diferentes pruebas bioquímicas para llegar a una identificación específica. Pero estos métodos no permiten identificar una tuberculosis resistente. Es por eso, que se han desarrollado nuevas técnicas para la detección fenotípica y genotípica de cepas multidrogorresistentes, las cuales permiten una detección temprana de la resistencia que estas cepas tienen ante los antimicrobianos ^(7, 14)

Este trabajo fue realizado con el objetivo de brindar una información actualizada, rápida y de fácil acceso de los métodos utilizados para la identificación de resistencia a los fármacos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
1	INTRODUCCIÓN	8
2.	JUSTIFICACIÓN	10
3	OBJETIVO	11
3.1	OBJETIVO GENERAL	11
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4	METODOLOGÍA	12
5	GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS	13
5.1	ETIOLOGÍA	13
5.2	TRANSMISIÓN	14
5.3	PATOGENIA	15
5.4	IMPORTANCIA CLÍNICA	16
5.5	MANIFESTACIONES CLINICAS	16
5.6	DIAGNOSTICO E IDENTIFICACIÓN	17
5.6.1	IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE BAAR	18
5.6.1.1	TINCIÓN ZIEHL NEELSEN	19
5.6.1.2	TINCIÓN CON AURAMINA (FLUORESCENTE)	20
5.6.2	CULTIVOS	21
5.6.2.1	MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS/SEMISÓLIDOS	22
5.6.3	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	22
5.6.3.1	PRUEBA DE NIACINA	22
5.6.3.2	PRUEBA DE LA CATALASA	23
5.6.3.3	REDUCCIÓN DE NITRATOS	23
5.7	TRATAMIENTO	24
5.7.1	MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS BÁSICOS	24
5.7.1.1	ISONIACIDA O HIDRACIDA DEL ÁCIDO ISONICOTÍNICO	24
5.7.1.2	ETAMBUTOL	24
5.7.1.3	ESTREPTOMICINA	24
5.7.1.4	RIFAMPICINA	24
5.7.1.5	TIOACETAZONA	25
5.7.2	MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSIS DE SEGUNDA LÍNEA	25
5.7.2.1	AMINOCLUCÓSIDOS	25
5.7.2.2	TIOAMIDAS	25
5.7.2.3	FLUOROQUINOLONAS	25
5.7.2.4	ÁCIDO PARAAMINOSALICÍLICO (PAS)	25
6	RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	26
7	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
7.1	MÉTODO DE LAS PROPORCIONES MÚLTIPLES	28
7.2	MÉTODO MGIT (TUBO INDICADOR DE CRECIMIENTO MICOBACTERIANO)	29
7.3	MÉTODO DE MTT	29
7.4	MÉTODO MODS	30
7.5	MÉTODO GIESS	30
7.6	MÉTODOS DE CULTIVOS AUTOMATIZADO	30
7.6.1	BACTEC TB- 460	30
7.6.2	BACTEC MGIT 960	31
8	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
8.1	INNO-LIPA	32
8.2	MÉTODO INNO-LIPA RIF TB	32

8.3	RIFOLIGOTYPING	32
8.4	GENOTYPE (DETECCIÓN DIRECTA)/GENOTYPE Mycobacterium GENOTYPE MTBDR PLUS	33
8.5	SONDAS DE ÁCIDOD NUCLEICOS	33
8.6	PCR EN TIEMPO REAL	34
8.7	TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN	35
8.8	TÉCNICAS COMERCIALES	35
8.8.1	BDPROBE TEC TE	35
8.8.2	GEN-PROBE AMPLIFIED MTD	36
	DISCUSIÓN	
	BIBLIOGRAFÍA	

1 INTRODUCCIÓN

La tuberculosis en la actualidad es un problema de salud pública, nacional y mundial, ya que un tercio de la población mundial está infectada por el bacilo de la tuberculosis. Esta enfermedad se transmite por vía aérea, al igual que el resfriado común; solo transmiten la infección las personas que padecen tuberculosis pulmonar activa. Las personas al toser y/o estornudar, expulsan pequeños bacilos ácido alcohol resistentes que son los responsables de la enfermedad. Basta solamente inhalar una pequeña cantidad para contagiarse. Sin embargo, no todos los sujetos infectados necesariamente desarrollan la enfermedad, pues todo depende del estado inmunológico de la persona. ^(27, 28, 33)

La tuberculosis ha sido la responsable de más muertes que ninguna otra enfermedad en la historia. Son varios los trabajos que lo demuestran, entre los datos más fidedignos sobre la existencia de tuberculosis se encuentran los de las épocas más antiguas, habiéndose podido demostrar la presencia de ADN microbiano de *Mycobacterium tuberculosis* en momias egipcias de entre 2050 y 500 años a.C. ^(39, 48)

El siglo XIX fue considerado como el mal siglo. Solo hasta entonces se comienza a pensar en la tuberculosis como una enfermedad contagiosa. Ya con el conocimiento de la naturaleza de la tuberculosis y el modo de transmisión del bacilo tuberculoso se toman medidas preventivas y la historia cambia dramáticamente con la aplicación de los agentes antimicrobianos. ⁽³⁹⁾

El tratamiento farmacológico comenzó con la estreptomina y el ácido paraaminosalicílico (PAS), esta combinación fue muy eficaz, pero después llegó un tercer fármaco, la isoniacida, que fue añadida a la combinación, mejorando la eficacia del tratamiento. Después el PAS fue sustituido por el etambutol, ya que este fármaco reducía el tiempo del tratamiento, pero aun no contentos con los largos meses de tratamiento para la tuberculosis, introdujeron a la combinación terapéutica la rifampicina, el cual acortó a solo pocos meses el tratamiento. ^(27, 28)

La terapia combinada es un éxito, pero en los últimos tiempos se ha observado que el bacilo de la tuberculosis es resistente a los antimicrobianos; las limitaciones que presentan los métodos tradicionales utilizados en el proceso de diagnóstico de infecciones por micobacterias han creado la necesidad de implementar nuevas estrategias para el aislamiento e identificación de *M. tuberculosis*. ⁽²⁷⁾

En la actualidad es necesaria la implementación de nuevos métodos en el laboratorio clínico para la detección rápida de *M. tuberculosis* en muestras biológicas como medios de cultivo no radiométricos y técnicas moleculares, las cuales son útiles no solo en la identificación rápida a partir de muestras clínicas, sino que además permiten la detección de la susceptibilidad o resistencia antimicrobiana de la micobacteria en estudio. ^(27, 28)

El objetivo de esta Monografía es presentar los métodos de laboratorio para la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

2 JUSTIFICACIÓN

El problema del resurgimiento de la tuberculosis se debe entre otros, a la constante movilización de las personas, el bajo manejo de programas de prevención, la resistencia antimicrobiana de *Mycobacterium tuberculosis* al tratamiento tradicional, la infección del VIH/SIDA, entre otros factores.

En la última década se ha observado, tanto en Colombia como en el resto del mundo, que el número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* farmacorresistentes ha incrementado. La resistencia a las drogas de primera línea, utilizadas en el esquema de tratamiento estreptomycin (SM), isoniacida (INH), rifampicina (RMP), etambutol (EMB) hace que los pacientes infectados sean difíciles de curar y además representa un gasto económico- social para la comunidad y para los programas de control. Es por esto que se han desarrollado nuevas técnicas para la detección fenotípica y genotípica de cepas multifarmacorresistentes, las cuales permiten una detección temprana de la resistencia que estas cepas tienen ante los antimicrobianos.

La detección temprana de la resistencia es importante porque cualquier demora en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* conducirá, inevitablemente, a un retraso en la iniciación de una terapia efectiva para el paciente y aumenta la probabilidad de una diseminación de casos de tuberculosis multirresistente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Presentar información actualizada de los métodos utilizados para la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica de los métodos para la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Resaltar la importancia de las técnicas utilizadas en el aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Investigar los factores que influyen en la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos.
- Establecer las ventajas y desventajas de los nuevos métodos para la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

4. METODOLOGÍA

Esta monografía está basada en la recopilación de información de libros y artículos publicados dentro de los diez últimos años, la búsqueda se realizó en inglés y en español. Las palabras más utilizadas para la búsqueda de los artículos fueron:

- Micobacterias
- *Mycobacterium tuberculosis*
- Tuberculosis
- Genotípico y fenotípico de *Mycobacterium tuberculosis*
- Bacilos ácido alcohol resistentes
- Resistencia antimicrobiana
- Técnicas fenotípicas
- Técnicas genotípicas

5. GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS

5.1 Etiología

La tuberculosis es una enfermedad transmisible y contagiosa, causada por especies del género *Mycobacterium*. Entre las especies agrupadas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* se encuentran: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microtti*. Siendo el *M. tuberculosis* el agente etiológico más frecuente de la enfermedad. ⁽⁴⁷⁾

Es un bacilo de 3 a 5 µm de longitud, curvo, inmóvil, con abundantes gránulos citoplasmáticos, es aerobio estricto que tiene como características ser ácido-alcohol resistente, sensible a la luz solar, luz ultravioleta, calor y algunos desinfectantes, contenido de bases de guanina más citosina en la molécula de ADN de 62 a 70 moles %. ^(49, 50)

Una de las principales características de la pared celular de *M. tuberculosis* es su alto contenido de lípidos (hasta el 60% de peso seco de la bacteria, esta característica hace impermeable a los agentes hidrofílicos, por lo tanto no se tiñe adecuadamente con los reactivos utilizados en la coloración de Gram y por esta razón no pueden ser clasificados como Gram positivos o Gram negativos. Esta bacteria es teñida adecuadamente por los métodos de Ziehl-Neelsen (Tinción Ácida rápida) que utiliza como solución decolorante una mezcla de etanol y ácido clorhídrico. Una vez coloreados son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica y por eso se denominan Bacilos Ácido Alcohol Resistentes **(BAAR)**. ^(47, 50)

Contiene una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica, Por encima de esta membrana se encuentra peptidoglicano, que contiene N-glucosilmurámico. Por medio de una unión fosfodiéster, el peptidoglicano está unido covalentemente al arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa. En la porción más distal y externa de los arabinogalactanos se hallan fijados los ácidos micólicos que tienen cadenas carbonadas largas (C60 a C90). ^(47, 50, 46)

Los glucolípidos son un grupo de compuestos (micolatos de trealosa, sulfolípidos, micósidos, etc.) que se encuentran asociados no covalentemente a los ácidos micólicos y se ubican periféricamente en la pared. También se encuentran lipoarabinomanano (LAM), el cual está anclado a la membrana citoplasmática y es de gran importancia porque provoca la respuesta antimicrobiana en macrófagos. ^(47, 50, 46)

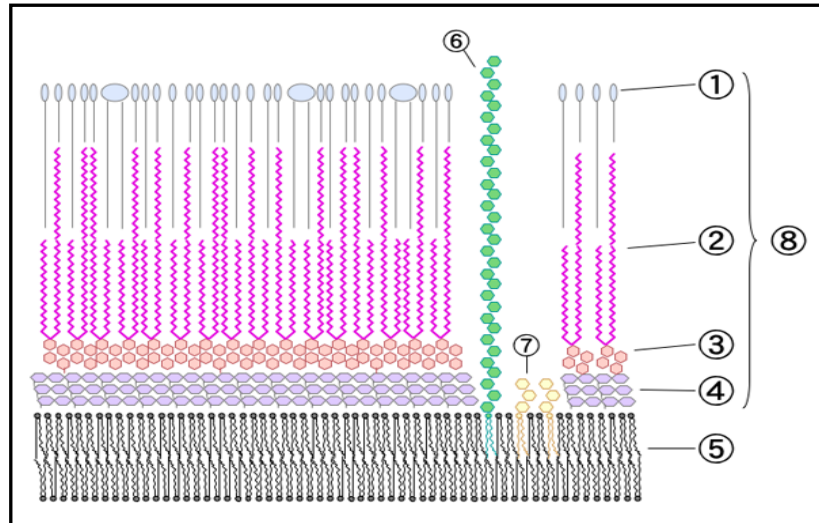


FIGURA 1. Envoltura celular de una Eubacteria Ácido-alcohol resistente.
<http://www.territorioscuola.com/wikipedia/es.wikipedia.php?title=Mycobacterium>.
 24 Enero 2007.

1. Glucolípidos
2. Ácidos micólicos
3. Arabinogalactano. Polisacáridos.
4. Peptidoglicano
5. Membrana citoplasmática
6. Lipoarabinomano (LAM)
7. Fosfatidil inositol manósidos
8. Envoltura celular

5.2 Transmisión

La tuberculosis es transmitida de persona a persona, a través de las gotitas frescas de saliva que se eliminan al aire, al toser, estornudar o hablar; la transmisión tiene lugar desde el enfermo bacilífero, con baciloscopia o cultivo de esputos positivos, al sujeto susceptible. ⁽¹¹⁾

Los núcleos goticulares de tamaño menor a 10 micras son los que resultan infecciosos, ya que los de mayor tamaño se eliminan por el sistema mucociliar de defensa del epitelio respiratorio. ⁽⁵²⁾

Después de un contacto estrecho con un paciente bacilífero, el riesgo de infección dependerá de la cantidad de bacilos eliminados por el paciente, de la duración del período infeccioso del paciente, determinado por la iniciación de tratamiento, de la concentración de bacilos en el aire, favorecida por una ventilación inadecuada, también de las características inmunológicas del sujeto susceptible y de la presencia de enfermedades como la diabetes, gastrectomía, silicosis, alcoholismo, también por adicción a drogas por vía intravenosa, inmunodeficiencia por enfermedad maligna o fármacos, y principalmente por el impacto de la pandemia de VIH. ^(27 17, 33)

5.3 Patogenia

Cuando una persona inhala la bacteria en el aire y estas llegan a los alvéolos comienza la infección. Una vez que están en los alveolos, son fagocitados por los macrófagos alveolares, los cuales están inactivos, estos comienzan a multiplicarse y a liberar citoquinas para llamar a otros macrófagos y atraer a los monocitos, que de nuevo vuelven y fagocitan los bacilos, logrando así una acumulación de monocitos y bacilos intracelulares. Posteriormente se produce una necrosis tisular que hace del medio un medio desfavorable para la multiplicación de los bacilos. ^(12,14)

La destrucción por mecanismos bactericidas y proteolíticos a cargo de los macrófagos generan péptidos y antígenos micobacterianos de naturaleza proteica, los cuales son acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I (MCH I) y presentados a los linfocitos T CD8⁺ o acoplados al complejo de histocompatibilidad tipo II (MCH II) y presentados a los linfocitos T CD4⁺. ^(10,12, 14)

Al sensibilizar a los linfocitos CD4, estos producen la liberación de linfoquinas que activan los macrófagos, al estar los macrófagos ya activos son capaces de destruir los bacilos; parte de estos macrófagos activos van a vía linfática, llegan a los ganglios, vía hematógica y al resto del organismo. La infección puede ser controlada o puede progresar a enfermedad rápidamente, algunos factores o circunstancias aumentan el riesgo de que la infección progrese a enfermedad. ^(6, 10, 12)

La infección por VIH es el principal factor de riesgo para el desarrollo de tuberculosis, ya que debilita el sistema inmunitario, facilitando la multiplicación de la bacteria. Una persona VIH-positiva tiene muchas más probabilidades de enfermar de tuberculosis que alguien VIH-negativo. La tuberculosis es una importante causa de mortalidad en la población VIH-positiva. En África, la infección por el VIH es el factor aislado que más ha contribuido al aumento de la incidencia de tuberculosis desde 1990. ^(6, 14, 47)

Una vez se produce la infección, esta puede evolucionar a una de estas situaciones:

- Que la infección se resuelva por sí misma.
- Que en las siguientes semanas o meses se desarrolle una tuberculosis activa.
- Que la infección se mantenga asintomática a lo largo de un tiempo (infección durmiente, latente o silente) y se active más tarde causando tuberculosis cuando se debilite el sistema inmunitario a causa de la edad o de otras enfermedades (reactivación). ⁽⁴⁷⁾

5.4 Importancia clínica

La tuberculosis es un problema de salud pública reemergente que ha tenido un gran impacto mundial. El resurgimiento de la enfermedad, su interacción con otros padecimientos, como el SIDA y la aparición de cepas multirresistentes han activado la alarma de emergencia mundial. ⁽⁵²⁾

Hay pocas enfermedades capaces de afectar tantos órganos como la tuberculosis. La infección inicial suele ser asintomática o mejor dicho la sintomatología es muy poca y puede confundirse con una infección de las vías respiratorias superiores. ⁽⁵²⁾

Las lesiones pulmonares incipientes por lo general se curan no dejan alteraciones residuales, excepto calcificación ocasional de los ganglios linfáticos pulmonares o traqueobronquiales. De 90 a 95% de las personas infectadas inicialmente entran a esta fase de latencia, a partir de la cual existe el peligro permanente de reactivación. En alrededor de 5% de los huéspedes al parecer normales, y hasta en 50% de las personas con infección por VIH avanzada, la infección inicial puede evolucionar de manera directa hasta culminar en tuberculosis pulmonar, o por la diseminación linfohematógena del bacilo, causar infección pulmonar, miliar, meníngea o de localización extrapulmonar. En las personas inmunosuprimidas, es más frecuente que la infección inicial tenga consecuencias y pronóstico graves. ^(7,14, 46)

Algunas personas permanecen asintomáticas durante años y más tarde sufrirán, una reactivación de la enfermedad (tuberculosis secundaria o de reactivación), que suele cursar como una enfermedad crónica debilitante en la que predominan con frecuencia los síntomas generales. La enfermedad puede quedar localizada en el pulmón o manifestarse en cualquier otro órgano. ^(7,14)

5.5 Manifestaciones clínicas

La tuberculosis es una enfermedad que puede afectar muchos órganos al mismo tiempo; los signos y síntomas pueden ser de predominio sistémico, o predominar la sintomatología pulmonar, los signos y síntomas de otros órganos afectados, o ser una combinación de todos ellos. ⁽⁴¹⁾

Hay diferencia entre infección tuberculosa y enfermedad tuberculosa, que cabe aclarar. La infección tuberculosa es cuando la persona a estado en contacto con el bacilo tuberculoso, con respuesta positiva a la tuberculina, pero sin ningún signo de la enfermedad y la enfermedad tuberculosa es cuando la persona presenta síntomas o signos radiológicos de la enfermedad y puede

sucedir durante la primo infección (tuberculosis primaria) o durante la fase de reactivación de la infección (tuberculosis secundaria).^(3, 41, 42)

La tuberculosis primaria suele ser asintomática y se detecta debido a una historia de exposición, a la prueba positiva de la tuberculina y a una radiología que muestra una neumonitis inespecífica que afecta los lóbulos pulmonares, pero cuando la población bacilar es significativa se produce una reacción sistémica, con síntomas inespecíficos como fiebre, escalofríos, astenia, pérdida de apetito y sudoración nocturna, si la respuesta inmune de la persona responde adecuadamente a la infección por el bacilo, estos síntomas pueden ser ignorados, ya que la infección quedara limitada y el paciente permanecerá asintomático. En caso contrario se desarrollaran síntomas (tuberculosis primaria) en forma de progresión local pulmonar o general.^(3, 42)

En algunas personas permanecerá asintomática durante años y más tarde sufrirán, a partir de estos focos primarios de infección, una reactivación de la enfermedad, que suele cursar con una enfermedad crónica, la enfermedad puede quedar localizada en el pulmón (tuberculosis pulmonar) o manifestarse en cualquier otro órgano (tuberculosis extrapulmonar), siendo los más afectados los ganglios linfáticos, sistema nervioso central, pericardio, el sistema genitourinario, los huesos, las articulaciones y el peritoneo.^(3, 42)

5.6 Diagnóstico e identificación

El diagnóstico se basa en una primera prueba, la prueba de tuberculina que se hace para ver si la persona estuvo en contacto con el bacilo tuberculoso, esta prueba es conocida también como PPD (Derivado de proteína purificada). Esta prueba se realiza aplicando una sustancia que se llama tuberculina en el antebrazo de la persona. Si la prueba da positiva, indica que la persona estuvo o está en contacto con el bacilo de la tuberculosis, por lo que a la persona se le indica un segundo examen, la baciloscopia, si esta prueba es positiva muestra los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) presentes en la muestra de esputo del paciente, lo que indica que la persona tiene la infección causada por el bacilo de la tuberculosis y si la baciloscopia sale negativa, hay que proceder hacer una tercera prueba que es el cultivo.^(7, 13)

En aquellos casos en los cuales no se puede demostrar bacteriológicamente la tuberculosis se debe utilizar métodos diagnósticos complementarios, Como, la historia clínica del paciente, radiología y la epidemiología.⁽⁷⁾

Si la persona presenta tos con expectoración con más de 15 días de evolución se debe sospechar de tuberculosis pulmonar, pero si se sospecha de una tuberculosis extrapulmonar se debe tener en cuenta los signos y síntomas de otros órganos como: adenopatías, hematuria, diarrea persistente.etc.^(7, 9)

La radiología es un apoyo diagnóstico de gran importancia, pero se debe correlacionar con la historia clínica del paciente y la epidemiología, ya que al estar en contacto con un caso bacilífero hace mayor la probabilidad de tener la enfermedad. ⁽⁹⁾

5.6.1 Identificación y aislamiento de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR).

Un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado, son un control esencial para la transmisión de la infección. Las medidas de control de la infección varían según la especie, por lo que es muy importante la identificación rápida y exacta del agente etiológico de la enfermedad. ⁽⁷⁾

La metodología convencional se basa en una identificación preliminar mediante el tiempo de crecimiento, los aspectos morfológicos y la producción de pigmentos de las colonias. Después de haber hecho esta identificación se realizan diferentes pruebas bioquímicas para llegar a una identificación específica. ^(7, 14)

El tiempo de crecimiento de las micobacterias es lento, por lo tanto demoran la identificación varias semanas siendo, en muchos casos, imposible realizar la identificación de la especie. ⁽²⁶⁾

Los aspectos morfológicos se llevan a cabo por medio de la baciloscopia, técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de la tuberculosis, se busca microscópicamente mediante la coloración de Ziehl Neelsen, bacilos ácido alcohol resistente (BAAR). ^(3, 26)

Procedimiento:

- Se marca una lámina por cada muestra.
- Destapar con cuidado el envase
- Tomar un aplicador y partirlo por la mitad, con la intención de que queden las puntas ásperas.
- Tomar el aplicador y extender la muestra con movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en el centro de la lámina sin tocar los bordes, dibujando un círculo de 2 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho. La capa de la muestra no debe estar ni muy gruesa ni muy delgada, ya que si queda muy delgada puede generar un falso negativo y si es muy gruesa, la muestra puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos ácido alcohol resistente.

- Dejar secar la lámina a temperatura ambiente, ya que si la secamos en el mechero, el calor puede alterar la estructura de los bacilos y su posterior tinción; además puede generar aerosoles.
- Colocar la lámina en una superficie plana para proceder con la coloración

En la actualidad se utilizan dos técnicas específicamente. La coloración de Ziehl- Neelsen y la variante de tinción de fluorocromo. ⁽²⁶⁾

Las micobacterias tienen una propiedad muy importante, la alta concentración de lípidos en su membrana le permite captar en su pared los colorantes como la fucsina fenicada y la auramina (amarillo fluorescente) y retenerla aun con la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol, lo cual los hace bacilos ácido- alcohol resistentes. Esta propiedad no es específica del bacilo de la tuberculosis, sino que la tienen todos los bacilos del género *Mycobacterium*. ^(3, 26)

5.6.1.1 Tinción de Ziehl- Neelsen

Es una tinción diferencial. Se denomina ácido- alcohol resistente y es específica para una serie de bacterias con estructura de pared particular, como lo es la de las micobacterias. La mayoría de las bacterias tienen en su pared peptidoglicano, como las bacterias Gram negativas y Bacterias Gram positivas, pero las micobacterias poseen ácidos micólicos. Esta característica las hace resistente a la decoloración con ácido y alcohol que no se produce en casi ningún otro tipo de bacterias. ^(13, 26)

Proceso de tinción:

- Colocar las láminas fijadas con calor sobre un soporte y cubrirla totalmente con fucsina fenicada.
- Calentar lentamente la lámina durante 10 minutos, pasándolo por debajo de la lámina hasta que produzca vapor, sin que hierva la fucsina .
- Cuando el vapor desaparezca, volver a calentar.
- Cuando se completen los 10 minutos, lavar la lámina y Cubrir el extendido con alcohol-ácido durante 1 minuto. Lavar lámina.
- Cubrir el extendido con azul de metileno durante 2 minutos y lavar.
- Limpiar la lámina por la parte posterior, para retirar residuos de colorante que puedan interferir con la lectura.
- Dejar secar a temperatura ambiente en posición vertical. ⁽²⁶⁾

Realizar la lectura y determinar si hay BAAR o no hay bacilos ácido- alcohol resistente. Si hay BAAR, informarlo de esta forma:

Tabla 1. Promedio de BAAR por campo

PROMEDIO DE BAAR ENCONTRADOS	NÚMERO MINIMO DE CAMPOS ÚTILES A EXAMINAR
Ninguno	100
Menos de 1 campo	100
1 a 10 campos por campo	50
Más de 10 por campo	20
De 1 a 9 en todo el extendido	100

Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Organización panamericana de la salud. 2008.

Tabla 2. Resultado informe de la tinción de Ziehl- Neelsen.

RESULTADO DEL EXAMEN MICROSCOPICO	INFORME
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácidoalcohol Resistentes
Se observa menor a 1 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Organización panamericana de la salud. 2008.

5.6.1.2 Tinción con Auramina (fluorescente)

Los ácidos micólicos de las paredes celulares de las micobacterias poseen afinidad para los fluorocromos auramina y rodamina. Estos colorantes se fijan a las bacterias, que aparecen de color amarillo o naranja brillante contra un fondo verdoso. El permanganato de potasio, empleado como contraste, evita la fluorescencia inespecífica. Todos los microorganismos ácido-alcohol

resistentes, incluyendo los esporozoarios parásitos, se tiñen con estos colorantes. Un aspecto importante de ésta coloración es que luego los frotis pueden ser reteñidos con la coloración de Ziehl-Neelsen o Kinyoun directamente sobre la tinción con el fluorocromo, si se elimina antes el aceite de inmersión. De esta forma, los resultados positivos pueden ser confirmados con las coloraciones tradicionales, que además permiten la diferenciación morfológica. ^(54, 13, 10)

Para observar los BAAR se utiliza un microscopio de fluorescencia con luz halógena y un sistema especial de filtros. Se observa en objetivo de 40x, lo que permite observar una superficie mayor en poco tiempo. ⁽²⁶⁾

Proceso de tinción

- Realizar un extendido fino (Más fino que para la tinción con Ziehl-Neelsen).
- Cubrir el extendido con solución de auramina- O y dejar actuar el colorante 15 minutos. Lavar la lámina con agua destilada, porque el agua de la llave contiene cloro y esto puede interferir en la fluorescencia.
- Decolorar con alcohol- ácido durante 2 minutos. Lavar la lámina (agua destilada).
- Cubrir la lámina con permanganato de potasio y dejar actuar durante 2 minutos y lavar.
- Dejar secar la lámina a temperatura ambiente y observar en el microscopio lo más rápido posible porque se puede perder la fluorescencia.

Para realizar la correspondiente lectura e informar se utilizan las mismas tablas para la coloración de Ziehl- Neelsen. ⁽²⁶⁾

5 .6. 2 Cultivos

Mediante el cultivo es posible hacer multiplicar los bacilos presente en las muestras de los pacientes in vitro, hasta ser visibles, formando colonias en el medio, o por medio de turbidez o por medio de fluorescencia cuando el bacilo consume O₂ y genera en consecuencia CO₂. ⁽³¹⁾

Las micobacterias pueden crecer utilizando glicerol (metabolizan el glicerol a piruvato) como fuente de carbono, aspargina e iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes. Otro componente clave para el desarrollo de las micobacterias es la albúmina, habitualmente incorporado en los medios de cultivo con el agregado de huevos de gallina o seroalbúmina bovina. Existen medios sólidos y líquidos. Los medios sólidos permiten la visualización de las colonias pequeñas características de las micobacterias y pueden ser

inspeccionadas por lupa o microscopio, lo que adelanta la detección de cultivos positivos. En cambio, cuando se utiliza un medio líquido es necesario verificar por medio de una baciloscopia si se trata de BAAR, porque visualmente es muy difícil distinguir el desarrollo del bacilo de la contaminación bacterémica o fúngica. ^(3, 23, 31)

5.6.2.1 Medios de cultivo sólidos /semisólidos

Dentro de los medios sólidos se encuentra el medio de Lowenstein-Jensen, es el método tradicional más utilizado, también se encuentra el medio Petraghani, el cual se utiliza para recuperar las micobacterias en medios muy contaminados. Dentro de los medios de cultivo sintéticos se encuentran los de tipo 7H10 Y 7H11 de Middlebrook, los cuales deben incubarse en una atmósfera de CO₂ 5-10%. Con esta técnica un cultivo se debe dar negativo después de 6-8 semanas de incubación a 37°C. ^(3, 31)

Los medios de cultivo líquidos son más rápidos y sensibles, pero con la desventaja de presentar dificultad para reconocer crecimiento único de micobacterias, ya que puede haber crecimiento mixto, pero estos medios permiten cuantificar la producción de CO₂ en equipos como el BACTEC y el MB Bact. ⁽³¹⁾

Un paso a seguir es la decontaminación de la muestra, el cual es necesario, ya que la mayor parte de la muestra clínica contiene gran cantidad de microorganismos de la flora comensal que crecen con mayor rapidez que *M. tuberculosis*. Por lo que es necesario eliminar estos microorganismos contaminantes que impedirán el desarrollo de las micobacterias. Algunos métodos utilizados para la decontaminación son: NALC-NaOH (N-acetil-L-cisteína-hidroxido de sodio, Método Kudoh Ogawa modificado, método Tacquet-Tison (Método del lauril sulfato de sosa). ^(3, 31)

5.6.3 Pruebas bioquímicas

La identificación de *M. tuberculosis* puede realizarse mediante pruebas bioquímicas sencillas. Son niacina positiva, reducen nitratos a nitritos y poseen catalasa. ⁽³⁾

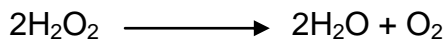
5.6.3.1 Prueba de Niacina

Las micobacterias producen Niacina (ácido nicotínico) en las reacciones de oxidación- reducción que ocurre en su metabolismo normal. *M. tuberculosis* acumula grandes cantidades de niacina y su determinación es utilizando como diagnóstico definitivo, aunque algunas otras especies de micobacterias pueden

ser niacina positiva. La acumulación de niacina puede ser evidente después de 3-4 semanas de la aparición de las colonias y cuando el desarrollo es abundante. ^(3,13, 31)

5.6.3.2 Prueba de la catalasa

Es una enzima que tienen algunos microorganismos para defenderse. Convierten el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. ⁽¹³⁾



5.6.3.3 Reducción de Nitratos

El *M. tuberculosis* tiene una enzima unida a la membrana celular que rápida y activamente reduce el nitrato a nitrito. Esta actividad enzimática es muy estable y otorga una herramienta que ayuda a la identificación de distintas especies.

Otras pruebas son: Prueba de la hidrólisis del Tween 80. Consiste en la capacidad de las micobacterias de liberar ácido oleico contenido en el Tween 80. Prueba de la Arisulfatasa, pone de manifiesto si la micobacteria posee esta enzima. La prueba tiene dos variantes según la lectura se haga a los 3 días (para rápidos crecedores) o a las 2 semanas, 8 para lentos crecedores). ^(13, 31)

Las micobacterias también se pueden clasificar por el pigmento que producen.

TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS POR LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS E IMPORTANCIA PATOLÓGICA.

CLASIFICACIÓN	ESPECIE	PATOLOGIA
Fotocromógenos de crecimiento lento	<i>M. kansasii</i> <i>M. asiaticum</i>	Pulmonar, ganglionar, meníngea, generalizada, osteoart., urogenital
II. Escotocromógenos de crecimiento lento	<i>M. scrofulaceum</i>	Ganglionar, pulmonar, osteoarticular
III. No cromógenos de crecimiento lento	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. avium-intracellulare</i>	Pulmonar, renal, etc. Cutánea, ganglionar Ganglionar, pulmonar, osteoarticular, generaliz
IV. Fotocromógenas de crecimiento rápido	<i>M. marinum</i>	Cutánea, articular.
V. Escotocromógenas de crecimiento rápido	<i>M. vaccae</i>	
VI. No cromógenas de crecimiento rápido	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>	Cutánea, pulmonar, osteoarticular, ocular, meníngea

5.7 Tratamiento

5.7.1 Medicamentos antituberculosos básicos

5.7.1.1 Isoniacida o hidracida del ácido isonicotínico: Tiene un energético efecto bactericida contra los bacilos tuberculosos en su multiplicación. La función de la isoniacida es inhibir la síntesis de los ácidos micólicos que son componentes de la pared micobacteriana. Se une fuertemente a la subunidad β de la polimerasa de RNA dependiente del DNA bacteriano, inhibiendo la síntesis de RNA. ⁽²⁶⁾

Se absorbe rápidamente y se difunde con la facilidad en todos los tejidos. La vida media en el plasma está determinada genéticamente. En su mayor parte se elimina por la orina en un plazo de 24 horas, principalmente en forma de metabolitos inactivos. ^(7, 26)

5.7.1.2 Etambutol: Tiene acción bacteriostática contra el *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración entre 0,2-2 mcg/mL, después de la administración se difunde a las células de Mycobacterium en crecimiento activo donde parece inhibir la síntesis de una o más metabolitos causando fallas metabólicas, detenimiento de la multiplicación celular y muerte de la célula. Es un compuesto sintético, hidrosoluble, incrementa la actividad de los fármacos lipofílicos como la rifampicina y la ofloxacin. ^(7, 18, 26)

5.7.1.3 Estreptomina: Antibiótico aminoglucosido derivado de *Streptomyces griseus* (microorganismo de suelo). Se administra por vía intramuscular y su acción bactericida depende del pH del sitio donde están localizados los bacilos. La acción principal es actuar contra los bacilos extracelulares, mientras que los otros fármacos actúan intracelularmente. No penetra a través de las paredes celulares o de las membranas biológicas normales, tales como las meninges o la pleura, a menos que se hayan producido cambios inflamatorios en los tejidos. Se elimina casi por completo por la orina. ^(18, 28, 47)

5.7.1.4 Rifampicina: Derivado semisintético de la rifampicina, antibiótico macrocíclico complejo que inhibe la síntesis del ácido ribonucleico en una amplia gama de microbios patógenos. Tiene acción bactericida y ejerce un potente efecto de esterilización contra los bacilos tuberculosos tanto en localizaciones celulares como extracelulares. Es liposoluble, se absorbe rápidamente y se distribuye por todos los tejidos y humores orgánicos. Como la resistencia aparece rápidamente, la rifampicina debe administrarse siempre en combinación con otros agentes micobacterianos eficaces. ^(18, 26, 27)

5.7.1.5 Pirazinamida: Este medicamento se administra en combinación con otros medicamentos, porque tiene un efecto bactericida débil contra *M. tuberculosis*, pero posee un efecto esterilizante especial en los organismos que proliferan con mucha lentitud debido al pH ácido del medio, por ejemplo dentro de los macrófagos. Así, la pirazinamida puede matar bacilos tuberculosos que no podrían ser atacados por otros medicamentos corrientes. Se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y se distribuye rápidamente por todos los tejidos y humores. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan a las dos horas y la vida media en el plasma es de unas 10 horas. Se metaboliza principalmente en el hígado y se elimina por la orina. ^(18, 26, 47)

5.7.1.6 Tioacetazona: Agente bacteriostático de baja potencia, se utiliza en la quimioterapia antituberculosa para inhibir la aparición de resistencia a la isoniacida. Se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal. ⁽²⁷⁾

5.7.2 Medicamentos antituberculosos de segunda línea

Los medicamentos antituberculosos de segunda línea son de utilidad en el tratamiento de la tuberculosis multirresistente sospechosa o comprobada. ⁽²⁷⁾

5.7.2.1 Aminoglucósidos: Son utilizados en los casos de resistencia confirmada o muy probable a la estreptomina: Kanamicina, amikacina y capreomicina. ^(26, 27)

5.7.2.2 Tioamidas: La etionamida y la protionamida son dos presentaciones diferentes de la misma sustancia activa, dotada de efectos bactericidas. La protionamida se tolera a veces mejor que la etionamida en ciertos grupos de población. ^(26, 27)

5.7.2.3 Fluoroquinolonas: La ofloxacina y la ciprofloxacina son dos medicamentos diferentes, pero presentan resistencia cruzada completa en el interior del grupo. Estos fármacos tienen una actividad bactericida baja y resultan útiles en asociación con otros. La farmacocinética de la ofloxacina es mejor que la de la ciprofloxacina. Conviene evitar la esparfloxacina a causa de sus graves efectos secundarios en la piel (fotosensibilización). No debe usarse la norfloxacina, ya que no produce concentraciones séricas suficientes. ^(7, 26, 27,53)

5.7.2.4 Ácido paraaminosalicílico (PAS): Es eficaz para evitar la aparición de gérmenes resistentes a la isoniacida, cuando se usa en combinación con esta, lo cual ha determinado la importancia del PAS en el tratamiento de la tuberculosis. Se elimina rápidamente, por lo que es necesario administrar una dosis elevada combinada con otros medicamentos, para mantener los niveles alto en la sangre. ^(7,28)

El tratamiento farmacológico comenzó en la historia con la estreptomina y el ácido paraaminosalicílico (PAS), esta combinación fue muy eficaz, pero después llegó un tercer fármaco, la isoniacida, que fue añadida a la combinación, mejorando la eficacia del tratamiento. Después el PAS fue sustituido por el etambutol, ya que este fármaco reducía el tiempo del tratamiento, pero aun no contentos con los largos meses de tratamiento para la tuberculosis, introdujeron a la combinación terapéutica a la rifampicina, el cual acortó a solo pocos meses el tratamiento. ^(9, 11, 28)

Estos medicamentos deben cumplir con tres propiedades fundamentales, que tengan capacidad bactericida, capacidad esterilizante y la capacidad de prevenir la resistencia. ⁽²⁸⁾

6. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Conocer el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* es de gran importancia ya que nos permite decifrar el comportamiento que tiene ante los antibióticos y así conseguir nuevos medicamentos para tratar la enfermedad, que está aumentando cada vez más en todo el mundo; también puede ser muy útil para obtener una vacuna capaz de erradicar el bacilo tuberculoso, aunque existe una vacuna actualmente esta solo tiene una eficacia del 50% y al ser aplicada produce sensibilidad a la tuberculina, afectando la identificación de casos nuevos de tuberculosis. ^(41, 55)

Algunas características explican la capacidad que tiene *Mycobacterium tuberculosis* para evadir los antibióticos, algunas de ellas es que puede infectar a una persona y permanecer dentro de su cuerpo durante años sin que este de manifiesto de su presencia, otra característica es la capacidad de producir ciertas enzimas que son capaces de producir y decomponer la grasa, esta puede ser una de las causas por la cual la bacteria puede permanecer por largo tiempo en forma latente. ^(27, 55)

Por otro lado se han descubierto genes que producen proteínas capaces de desviar la acción de los linfocitos, estas dos familias de proteínas son: Las PE (pro-glu a nivel del extremo N-terminal) y las PEE (pro-pro-glu), que se caracterizan por ser ricas en glicina. La familia PE esta compuesta por 90 proteínas que comparten su dominio N-terminal, con 110 aminoácidos que dan lugar a una estructura global. El extremo C-terminal varía en secuencia, longitud y número de repeticiones. ⁽⁵⁵⁾

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* es rico en DNA repetitivo, con inclusiones repetitivas como la IS6110, que se utiliza como marcador genético del microorganismo. ⁽⁵⁵⁾

El fenómeno de la resistencia se detectó poco después de la introducción de la estreptomina para el tratamiento de la tuberculosis humana. Cuando se empezaba el tratamiento con estreptomina el paciente mejoraba y el número de bacilos disminuía, pero al paso de los días el paciente recaía y el número de bacilos aumentaba y el paciente volvía a recaer. Se encontró que los bacilos aislados del esputo de pacientes que habían recibido un tratamiento de varios meses con estreptomina solamente eran resistentes a dicho producto, es decir, los bacilos, en lugar de morir, continuaban proliferando in vitro en presencia de concentraciones altas del medicamento.^(27,43, 46)

Esta resistencia es atribuida a mutaciones genéticas que alteran los sitios de acción del antibiótico, es cromosómica e irreversible; existen 3 tipos de resistencia: La resistencia primaria, es cuando los pacientes que no han recibido ningún tratamiento previo con medicamentos antituberculosos, presentan resistencia bacteriana. Si, una vez efectuado el examen clínico, es dudoso que el paciente no haya recibido algún tratamiento anterior, se habla de resistencia inicial y en los pacientes en que hay constancia de un tratamiento anterior, de más de un mes de duración la resistencia bacteriana se denomina resistencia adquirida.^(7, 46)

Como todas las demás formas de resistencia medicamentosas, el fenómeno de la tuberculosis multirresistente es enteramente producto del ser humano. Los bacilos farmacorresistentes aparecen a consecuencia de un error humano, errores médicos, error en el suministro de medicamentos y también por causa de monoterapias sucesivas.⁽⁷⁾

Los resultados de análisis genéticos y moleculares sugieren que las bacterias usualmente adquieren resistencia a los medicamentos antimicrobianos mediante la modificación de la estructura química del fármaco, mutación o sobre producción de la diana respectiva. La multidrogorresistencia en *M. tuberculosis* resulta, en primera instancia, de la acumulación de mutaciones en los genes que sirven como dianas (ellos o sus productos) de un compuesto en particular. (Ver tabla 4).

Las nuevas técnicas moleculares permiten determinar mutaciones puntuales, inserciones o deleciones en los genes blancos de los antibióticos antituberculosos, como por ejemplo, la resistencia a la rifampicina se debe a mutaciones en dominios críticos del gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis*, esta región es llamada región *hot spot* o región determinante de resistencia a rifampicina.^(46, 47)

Tabla 4. Dianas de los medicamentos antituberculosos de primera línea

MEDICAMENTOS	MECANISMO DE ACCIÓN	BASE GENETICA DE MUTANTES RESISTENTES	%
RIFAMPICINA	Inhibe la transcripción	rpoB	96-98%
ISONIACIDA	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	katG inhA	42-58% 21-34%
ESTREPTOMICINA	Inhibición de la síntesis de proteínas	rpsL rrs	52-59% 8-21%
PIRAZINAMIDA	“ Efecto esterilizante “	pncA	72-97%
ETAMBUTOL	Inhibición de la síntesis de arabinogalactano y lipoarabinomanano (pared celular)	EmbCAB	47-65%

Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. Salvador Said-Fernández, Pola Becerril-Montes. *Enf Emerg* 2005; 7(1):13-19

Se han desarrollado nuevas técnicas para la detección fenotípica y genotípica de cepas multidrogorresistentes, las cuales permiten una detección temprana de la resistencia que estas cepas tienen ante los antimicrobianos, ya que cualquier demora en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* conducirá, a un retraso en la iniciación de la terapia del paciente. ^(22, 30)

7. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA DE *M. TUBERCULOSIS*

7.1 Método de las proporciones múltiples

Es el método más utilizado tradicionalmente en los laboratorios de países en vía de desarrollo, propuesta por Canetti y adoptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), este método determina la relación entre el número de bacilos que crecen en medio sólido con antibióticos y el número de bacilos que crecen en medio libre o sin antibiótico, determinando así la concentración de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos en una población determinada. Por su validez y seguridad, este método es considerado como el método de referencia para pruebas de sensibilidad en tuberculosis. Las ventajas de este método son la alta reproducibilidad, la elevada correlación clínica y su bajo costo. Su desventaja principal radica en la demora en la obtención de resultados: 60 a 90 días a partir de aislamientos primarios de *M. tuberculosis* y 28 días después de la obtención de primocultivos. ⁽³⁵⁾

$$\frac{\# \text{ de colonias cc}}{\text{Media del control}} \times 100 = 1 \% \geq \text{CEPA RESISTENTE}$$

7.2 MGIT (tubo indicador de crecimiento micobacteriano)

Este medio contiene caldo middlebrook 7H9 modificado y posee un compuesto fluorescente embebido en silicona en la parte inferior del tubo, el compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. La concentración inicial del oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Los microorganismos al respirar consumen el oxígeno disuelto en el medio lo que permite observar la fluorescencia que es proporcional al número de bacterias presentes. La fluorescencia se puede descubrir manualmente con lámpara de Wood a 365 nm de luz ultravioleta. Este método se convierte en una alternativa para países en desarrollo porque permite descubrir cepas resistentes a antibióticos en menor tiempo y a un menor costo. ^(23, 42)

Este método constituye una alternativa rápida en el diagnóstico de cepas multirresistentes, además es simple, fácil de utilizar y es una alternativa costo efectiva para un aislamiento más rápido de micobacterias en laboratorios, comparados con otros sistemas, debido a que no necesita materiales radioactivos ni equipos costosos. La desventaja de este medio es que requiere una mayor manipulación, ya que se le debe añadir los antibióticos y otros nutrientes. ⁽²³⁾

7.3 Método de MTT (Metil Tiazol Tetrazolium)

Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, el cual es un indicador que detecta crecimiento y viabilidad celular. El MTT es un reactivo de óxido-reducción realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que en condiciones de disminución de la concentración de oxígeno, como las generadas durante la actividad metabólica bacteriana, cambia de color: del amarillo (estado oxidado) al púrpura (estado reducido). Al reducirse, su solubilidad en medio acuoso disminuye y se produce la precipitación de cristales del reactivo. Las micobacterias sensibles a las drogas y las no viables no producirán el viraje del indicador. La sensibilidad y la especificidad de la resistencia a isoniazida y rifampicina es del 89% al 100%.

Las ventajas de esta técnica, son, por lo tanto, permitir la lectura visual de la reacción, lo que facilita la determinación de la concentración de antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano, es fácil de efectuar y proporciona resultados rápidos y consistentes. ⁽³⁶⁾

7.4 Método MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility)

Es un método rápido que permite la detección de susceptibilidad directa a drogas de primera línea y se basa en el principio que el *M. tuberculosis* crece más rápido en medios líquidos en comparación con medios sólidos; la morfología del *M. tuberculosis* en cultivo líquido es característica, consiste en que la bacteria forman una serie de cordones y por medio de un microscopio de luz invertida se observan las placas del medio Meddlebrook 7H9, debidamente sembradas con el esputo decontaminado, de esta manera el *M. tuberculosis* se puede detectar antes que sea visible a simple vista. Tiene una sensibilidad y especificidad de 97,8% y 99,6% respectivamente.

Las ventajas de este método son su bajo costo y su rapidez para detectar micobacterias multirresistentes (a los 7 días) y sus desventajas, es la necesidad de tener un microscopio invertido y el entrenamiento que hay que tener para reconocer la formación de cordones. ⁽²⁵⁾

7.5 Método Griess

El reactivo de Griess (HCl+ sulfanilamida + n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride). Se basa en la determinación de la actividad de reducción de nitrato en el cultivo de *M. tuberculosis* en medio sólido L-J conteniendo NaN_3 (1 g/l) con y sin droga. En un resultado negativo no se observa cambio de color y se interpreta como sensible. Y un resultado positivo, se observa cambio de color de rojo o violeta intenso y se interpreta como resistente. Este método tiene una sensibilidad y una especificidad para la detección de resistencia a INH de 99.1% y 100%. Para RMP, la sensibilidad y especificidad es del 93.5% y 100% respectivamente. ⁽²⁵⁾

7.6 Métodos de cultivo automatizados

Por muchos años la idea de un medio líquido para el crecimiento rápido de Micobacterias se vio obstaculizado por la alta tendencia a la contaminación por Bacterias Gram positivos, Bacterias Gram negativas y por los hongos, pero el uso de combinaciones antimicrobianas logró la inhibición del crecimiento de otros microorganismos diferentes a las micobacterias.

7.6.1 BACTEC TB-460

Este sistema fue por muchos años el primero y el único sistema automatizado utilizado para el crecimiento de micobacterias. Detecta la cantidad de CO_2 radioactivo que se genera dentro del frasco de cultivo cuando las Micobacterias consumen nutrientes de carbono (ácido palmítico) con sustitución del C con su isótopo: el C^{14} . El producto final del metabolismo bacteriano será el $^{14}\text{CO}_2$. El incremento en los niveles de este gas puede ser medido por un contador de isótopos y determinar si un cultivo es positivo. Este sistema está

definitivamente probado y se le considera de referencia como otros medios convencionales. ^(35, 36)

Las ventajas de éste sistema son, Los resultados rápidos; En 11 días arroja los resultados positivos y los resultados negativos a los 14 días, resulta fácil la recuperación de Micobacterias ya que contiene un medio específico para su crecimiento y la posibilidad de realizar pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos. Además es un método mas sensible que el cultivo convencional (70-95% vs 60-80% respectivamente).

Entre las desventajas se encuentran, que es un método laborioso, hay un mayor porcentaje de contaminación por lecturas manuales, emplea radioisótopos, el costo del equipo, reactivos y mantenimiento, es alto, existe potencial formación de aerosoles, necesita de una infraestructura adecuada y el método no es totalmente automatizado.

Aunque el método BACTEC TB-460 es el mejor sistema para la rápida detección de micobacterias, este puede ser remplazado por métodos no radiométricos, dado que no presentan problemas asociados con el mantenimiento y la eliminación del material radioactivo. ⁽³⁵⁾

7.6.2 BACTEC MGIT960

Es un método no radiométrico, automatizado que utiliza el medio MGIT y sensores que detectan la fluorescencia la cual es visualizada e interpretada por la versión manual de MGIT. Este método contiene 960 tubos plásticos, los cuales son continuamente monitoreados. Está basado en el sistema BACTEC TB-9000, pero este método utiliza tubos de proceso que son menos engorrosos de manejar a diferencia de las botellas originales. Un estudio realizado por Tortoli, donde hace una comparación del rendimiento del método BACTEC TB-460 con el método radiométrico BACTEC TB- 960 estudiando 133 cepas. En este estudio encontró una concordancia del 96.7% entre los dos métodos, pero el método BACTEC MGIT 960 determinó un mayor número de cepas resistentes que el BACTEC TB- 460. Mostró que MGIT TB- 960 tenía un tiempo más corto en dar resultados positivos (13.3 días), tanto que para BACTEC TB-460 fue de 14.8 días. Sin embargo, el mejor desempeño fue para BACTEC TB-460, el cual obtuvo 201 aislamientos, mientras que MGIT TB-960 fue 190 aislamientos. En esta comparación MGIT TB-960 presentó también la contaminación más alta (10%) comparada con los otros medios radiométricos. ^(31, 35)

8. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA DE *M. TUBERCULOSIS*

Los métodos moleculares han sido una importante herramienta para la detección rápida de resistencia. Las pruebas más utilizadas en el mercado son:

8.1 INNO-LIPA

Es una metodología que permite la detección de resistencia a RMP y la comprobación de la identidad como *Mycobacterium tuberculosis*, gracias a la presencia de una sonda específica para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, la cual inicia 82 pb río arriba de la región determinante de resistencia a RMP (RDRR) y además las sondas de tipo silvestre (S1 al S5), cubren la región relevante del gen. Cuando una mutación está presente será revelada por la falta de hibridización con una o más de tales sondas, bajo las condiciones aplicadas. Dicha mutación particular puede ser evidenciada por la señal de hibridización con alguna de las cuatro sondas que tienen un cambio puntual en la secuencia. Tiene una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100%. Los resultados pueden ser obtenidos en lapso de 6 horas. ⁽²⁵⁾

8.2 El método INNO.LIPA RifTB Line probe assay

Esta prueba hace parte de la tecnología de sonda de línea y a diferencia de otros métodos no utiliza sondas específicas para micobacterias, sólo es utilizada para la identificación del complejo tuberculoso y para mutaciones dadas por resistencia a fármacos. ⁽²⁵⁾

La técnica posee 10 sondas de oligonucleótidos de los cuales una es específica para el complejo tuberculoso, cinco son sondas libres (S1-S5) y las cuatro sondas ® restantes son utilizadas en la detección de mutaciones frecuentes que causan la resistencia a la rifampicina (RMP). Cuando se presenta una ausencia de hibridación de una o varias de las sondas de S es indicativa de una mutación que puede ser identificada por una de las sondas (R). Las sondas R usadas son: R2: Asp516Val, R4: His526Tyr, R4b: His526Asp, R5: Ser531Leu.

La sensibilidad y la especificidad del método es de 69.5 y 98.4% respectivamente, la sensibilidad en muestras positivas es muy alta (92%) y en muestras negativas es del 47%; de igual manera para muestras respiratorias se observa una sensibilidad del 47% y en muestras extrapulmonares es de 49%. En estudios realizados este método fue comparado con BACTEC TB-460 y se encontró que fue mucho más rápido en el análisis de las muestras.

Las desventajas de este método son el alto costo de equipamiento e insumos, y que requiere un laboratorio de alta complejidad para ser realizada. ⁽²⁵⁾

8.3 Rifoligotyping

Se basan en la hibridización reversa del producto de amplificación biotinilado, a partir de la región determinante de resistencia a RMP (RDRR) del gen *rpoB*, a una serie de oligonucleótidos con secuencias tanto silvestres como mutantes,

Fijados sobre una membrana o tira. Si la cepa es silvestre dicho producto solo hibridará con los oligonucleótidos silvestres, mientras que si contiene mutaciones dejará de hibridar con algún oligo silvestre y lo hará con su complementario en el respectivo oligo mutante. Este método emplea una membrana con seis oligonucleótidos silvestres y seis complementarios a diferentes mutaciones puntuales, siendo la detección llevada a cabo por quimioluminiscencia. Tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad del 76%.⁽²⁵⁾

8.4 Genotype (Detección directa)/ Genotype Mycobacterium/Genotype MTBDR plus

El método de detección directa para micobacterias Genotype es un método basado en la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), aplicado a la tecnología de tiras de ADN. Según la casa comercial, el ensayo tiene tres pasos. El primer paso consiste en el asilamiento de 23 rRNA, el segundo paso incluye la amplificación de ARN por el método NASBA y el tercer paso implica la hibridación inversa de los productos amplificados sobre tiras de la membrana que usan un sistema automatizado. El ensayo tiene la capacidad para la detección simultánea de *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense* y micobacterias tuberculosas. En estudios realizados el método es útil, confiable y rápido, con la sensibilidad y la especificidad del 92% y el 100%, respectivamente.^(6, 12)

Por otro lado se presenta una tecnología de sondas de línea en donde se utiliza la PCR, la hibridación inversa con diversas sondas DNA específicas, estas sondas son fijadas en tiras y analizadas colorimétricamente en equipos automatizadas. La banda marcada indica la especie aislada. El tiempo de análisis es de más o menos cinco horas. En esta tecnología se presenta dos tipos de ensayo el InnoLiPA Mycobacteria v2 y el GenoType *Mycobacterium*. El GenoType *Mycobacterium* incluye en su proceso una PCR múltiple y una hibridación inversa, este método está en tres formas de identificación las cuales son:

- Genotype MTBC para identificar a los miembros del complejo tuberculoso; el cual está basado en el polimorfismo de gyrB.
- GenoType *Mycobacterium* CM para la identificación de micobacterias comunes.
- Genotype *Mycobacterium* AS que es para micobacterias no tuberculosas.

8.5 Sondas de ácidos nucleicos

Una sonda es un reactivo biológico constituido por un fragmento de ADN que posee una secuencia de bases complementaria a la del genoma de un

microorganismo. Las sondas están marcadas con diversos indicadores como isótopos radiactivos o sustratos cromógenos. Cuando se libera el ácido nucleico de un microorganismo y después se desnaturaliza el ADN liberado (se separan las dos hebras que forman la molécula de ADN por procedimientos físicos [T^a 90 a 140 °C]), la sonda es capaz de fijarse (hibridarse) con su fragmento homólogo, si existe. La hibridación de la sonda a su fragmento homólogo se detecta fácilmente gracias al marcador que se ha incorporado. ^(6, 12)

En los últimos años han aparecido sondas comerciales de DNA (AccuProbe®, GenProbe Inc., San Diego, Estados Unidos) no radiactivas que permiten identificar por hibridación con el RNA ribosómico micobacteriano, de forma rápida (2 h) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, el grupo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae*. Estas sondas se pueden aplicar sobre los cultivos obtenidos tanto en medios sólidos como líquidos. Así mismo, ofrecen la posibilidad de utilizarlos en medios líquidos con contenido hemático, siendo necesario una pequeña preparación previa mediante concentración y lavado con una solución detergente (dodecil sulfato sódico y EDTA). ⁽¹²⁾

8.6 PCR en tiempo real

Este método es un tipo de PCR cuantitativo que mide la cantidad de DNA o de mRNA; se utiliza para determinar la expresión del mRNA de un gen y su expresión. En este método se utilizan sondas marcadas con fluorocromos, estas sondas de hidrólisis son por lo general oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos, al extremo 5' y 3', también tiene una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se quiere amplificar y la ADN polimerasa que se desplaza sobre la cadena de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de ADN que sirve de molde. Al llegar al punto en el que se ha hibridado la sonda, la hidroliza. El fluorocromo del extremo 5' es liberado, entonces, el fluorocromo que está en el extremo 3' no puede absorber la fluorescencia por estar tan separados. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN presente, y la representa gráficamente.

La representación gráfica que da el equipo de la amplificación de ADN en tiempo real permite un cálculo aproximado de la cantidad de copias de la secuencia blanco que se encontraban en la muestra. Si se detectan alelos de resistencia a un medicamento usado, como por ejemplo a la rifampicina, esto lo detecta el PCR en tiempo real porque alteran la temperatura a la cual las sondas se unen al blanco. Las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina se localizan en el gen *rpoB* mediante sondas FRET. Cuando ocurre esto el equipo arroja una gráfica de disociación donde se observa una temperatura en la cual las sondas mutantes se disocian alrededor de 71 °C

mientras que en la cepa de referencia y los aislados silvestres es de alrededor de 75°C .^(6, 12)

Las ventajas es que es una técnica fácil de realizar y muy rápida. Las desventajas es que es una prueba costosa, necesita la capacitación del personal y tener conocimientos de secuencias específicas para poder correlacionar.

8.7 Técnicas de amplificación

Son un grupo de técnicas que requiere la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro sistema, de una zona de DNA concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos o de un posterior análisis postamplificación mediante restricción, hibridación o secuenciación.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica “in vitro” que imita la habilidad natural de duplicar el ADN. Existen múltiples sistemas basados en la amplificación de los ácidos nucleicos de las micobacterias y de igual manera diversos objetivos para amplificar incluyendo fragmentos de DNA o RNA. Por lo general la secuencia más utilizada y amplificada en tuberculosis es IS6110, 16 rDNA, rpoB que codifica para la subunidad B de RNA polimerasa, el recA gen, el gen hsp65, gen dnaJ y 16s-23S rRNA entre otros.⁽³¹⁾

La ventaja de estos métodos es que permiten un diagnóstico en tan solo unas pocas horas. Las pruebas moleculares actualmente en uso en los laboratorios para el diagnóstico de tuberculosis son *Mycobacterium tuberculosis* direct test AMTDT (Gen-probe), basado en la amplificación enzimática del RNA ribosómico, AMPLICOR (*Mycobacterium tuberculosis* PCR test, Roche Diagnostic Systems) basado en la amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el LCx (LCR *Mycobacterium tuberculosis* assay, Abbott laboratories) el cual es un sistema de amplificación que utiliza la reacción de la ligasa.^(6,31)

8.8 TÉCNICAS COMERCIALES

8.8.1 BD ProbeTec ET

Este método fue desarrollado por Becton Dickinson, para la detección de micobacterias tuberculosas en muestras respiratorias. El método está basado en el uso de la polimerasa para el desplazamiento de la cadena amplificada. A veces se requiere la manipulación de la muestra antes de ser introducida en equipos automáticos; cada muestra debe ser primero inactivada a 105°C y luego ser iniciado para extraer el DNA, debe ser transferido rápidamente a

72.5°C y posteriormente amplificado a 54°C. Tiene una sensibilidad de 98.5% al 100% y una especificidad de 0.33% al 100%. ⁽³¹⁾

8.8.2 Amplified MTD

La prueba Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTD), está basada en la amplificación de las secuencias liberadas de rRNA de una célula blanco. La detección se obtiene de la hibridación de los ácidos nucleicos. Esta detección tiene lugar mediante una sonda específica de ADN marcada con éster de acridina quimioluminiscente. La prueba de protección de la hibridación (HPA) Y un proceso químico selectivo permite distinguir las sondas hibridadas sin utilizar métodos físicos de separación complejos. El resultado final es una prueba de sensibilidad superior al cultivo y especificidad, que no requiere instalaciones o instrumentaciones sofisticadas y que puede llevarse a cabo en la rutina de la mayoría de laboratorios clínicos. Esta técnica tiene una sensibilidad del 91, 7 % hasta un 100% y una especificidad de 65.5% a 92.9%. ⁽³¹⁾

DISCUSIÓN

El uso de nuevos métodos rápidos para diagnóstico e identificación de *M. tuberculosis* multirresistente y que además de efectivos sean económicos son necesarios para países en desarrollo como Colombia que no cuentan con los recursos para la implementación de métodos muy costosos.

El diagnóstico de tuberculosis por la observación de *M. tuberculosis* es uno de los métodos más usados en bacteriología. La tinción de Ziehl Neelsen y la tinción con fluorocromos, son técnicas convencionales que se han venido utilizando por años para el diagnóstico de tuberculosis. La tinción de Ziehl Neelsen tiene una sensibilidad del 75% para la detección de micobacterias y la tinción con auramina-rodamina es mucho más sensible, tiene una sensibilidad del 96.5% y una especificidad del 98% y se puede observar en un menor aumento lo que hace una lectura más rápida, pero la desventaja de esta tinción es que debe ser observada en un microscopio de fluorescencia lo que resulta más costoso.

Los medios de cultivo son indispensables para la identificación y recuperación de micobacterias, los cuales pueden ser sólidos o líquidos, Siendo los medios Líquidos los más sensibles y rápidos para el crecimiento de micobacterias.

El método de referencia para pruebas de susceptibilidad, es el método de las proporciones múltiples (PM). Las ventajas de este método son la alta reproducibilidad, la elevada correlación clínica y su bajo costo, la desventaja es que requiere de mínimo 3 a 4 semanas de incubación para obtener resultados. Por otro lado está el BACTEC TB 460, que se empezó a utilizar a partir de 1980 y es ahora el método de referencia a nivel mundial mejor validado, comparado con el método PM es un método más rápido (11 días), ya que tiene un medio específico para el crecimiento de las micobacterias. Las desventajas es que es un método laborioso, hay un mayor porcentaje de contaminación por lecturas manuales, emplea radioisótopos, el costo del equipo, reactivos y mantenimiento, son muy altos, existe potencial formación de aerosoles y necesita de una infraestructura adecuada.

Actualmente se encuentran disponibles métodos automatizados no radiométricos como el BACTEC MGIT 960 y el MGIT AST SIRE manual. En el BACTEC MGIT 960 se utiliza el medio MGIT y sensores que detectan la fluorescencia la cual es visualizada e interpretada por la versión manual de MGIT. Este método contiene 960 tubos plásticos, los cuales son continuamente monitoreados. Está basado en el sistema BACTEC TB-9000, pero este método utiliza tubos de proceso que son menos engorrosos de

manejar a diferencia de las botellas originales. El medio MGIT contiene caldo middlebrook 7H9 modificado y posee un compuesto fluorescente embebido en silicona en la parte inferior del tubo, si hay presencia de micobacterias la fluorescencia se puede observar por medio de una lámpara de Wood a 365 nm de luz ultravioleta. La ventaja de esta método es que es simple, fácil de utilizar y es una alternativa costo efectiva para un aislamiento más rápido de micobacterias en el laboratorio.

El método MODS es una técnica rápido que permite la detección de susceptibilidad directa a drogas de primera línea y se basa en el principio que el *M. tuberculosis* crece más rápido en medios líquidos en comparación con medios sólidos. Las ventajas de este método son su bajo costo y su rapidez para detectar micobacterias multirresistentes y su desventaja, es la necesidad de tener un microscopio invertido, lo cual aumenta el presupuesto, por ser un microscopio más costoso que el habitual.

Por otro lado están las técnicas directas de detección de microbiología molecular, como el método de INNO-LIPA, Método de INNO- LIPA RifTB, Genotype MTBDR PLUS, *Spoligotyping* etc. Que nos han aportado numerosas posibilidades, técnicas de amplificación genética de las que existen numerosas variantes, como la PCR, las sondas genéticas. Las ventajas de estas técnicas, es que son técnicas rápidas, pero tienen un inconveniente y son su elevado costo, su complejidad técnica en comparación con la simple microscopía; por eso estas técnicas se reservan para centros con alta experiencia y amplitud económica.

En conclusión estamos buscando métodos simples y rápidos de alta sensibilidad y especificidad en la identificación de resistencia de cepas de *M. tuberculosis*, que puedan ser aplicables en países de bajos ingresos. Uno de los métodos que cumple con estos parámetros y que está recién validado por el instituto Nacional de salud, es el ensayo colorimétrico de nitrato reductasa (método Griess). Debido a su alta sensibilidad y especificidad y rápido procesamiento, e método Griess usa reactivos simples y económicos y requiere un mínimo espacio en el laboratorio y de experticia técnica, proporcionando entonces una herramienta ideal de tamizaje para contextos de pobres recursos con altas tasas de TB – MDR. El otro método es el medio MGIT este método constituye una alternativa rápida en el diagnóstico de cepas multirresistentes, porque es simple, fácil de utilizar y es una alternativa costo efectiva para un aislamiento más rápido de micobacterias en laboratorios, comparados con los otros sistemas, debido a que no necesita materiales radioactivos ni equipos costosos. La desventaja que se ve en este medio es que requiere una mayor manipulación, ya que se le debe añadir los antibióticos y otros nutrientes. ⁽²³⁾

BIBLIOGRAFÍA

1. **ANGREU MARTIN NURIA.** Estudio de la implicación de los genes Rv0576- Rv0577 en la tinción con rojo neutro y la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. universidad autónoma de Barcelona. departamento de genética y microbiología. 2007.
2. **CALDERON ROGER,** Asencio Luis S, Quispe T Neyda. Detección rápida de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-SSCP Y PCR- heteroduplex. Rev Perú Med Salud Pública 2003; 20(2).
3. **CAMINERO LUNA JOSÉ,** Sauret Jesús, Ausina Vicente. Diagnóstico de la tuberculosis. Recomendaciones SEPAR.
4. **CAPCHA LUIS,** Uribina Martha, Vasquez Lucy. perfil genético (is6110) y patrones de resistencia en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. lima sur, Perú Med Exp Salud Pública 2005.
5. **CASTILLEJOS LOPEZ MANUEL,** Pérez Padilla Rogelio. Implicaciones de los polimorfismos de un solo nucleótido en *Mycobacterium tuberculosis* y humanos en el manejo clínico de la tuberculosis. Rev Inst nal resp Mex. Vol. 19. No 1. Enero-Marzo 2006.
6. **CORTES ELIZABETH.** Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias atípicas en el laboratorio clínico.
7. **CROFTON JOHN.** Directrices para el tratamiento de la tuberculosis, farmacorresistente. OMS 1997.
8. **DE LA IGLESIA A,** Morbidoni H. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. Revista Argentina de Microbiología (2006) 38: 97-109.
9. **DORLAND.** Dorland diccionario enciclopédico ilustrado de medicina. dorland edición 30. esleiver españa, 2005.
10. **BALDEVIANO CHRISTIAN,** Neyda Quispe T, Cesar Bonilla A, Perfiles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del callao, Perú. Rev Perú Med Exp Salud Publica 2003: 20(2).
11. **FLORES RAMIREZ CARLOS.** Lineamientos para la formulación de los protocolos de vigilancia epidemiológica. Guatemala 09-02-2001

12. **GAMBOA, Fredy.** Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. May 1998, p 1324-1329
13. **GARZON MARIA, Naranjo Olga, Sierra Claudia.** Bacteriología de *Mycobacterium tuberculosis* y de micobacterias no tuberculosas. Manual de procedimientos. 2001
14. **GENNARO L.** Immunological diagnosis of tuberculosis. Clin Infect Dis 2000; 30 (supl.3):243-6.
15. **GONZALEZ PATRICIA.** Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos. Rev chilena infect (2002); 19 (supl. 2).
16. **GUERRERO MARTHA,** León Clara. Situación de la tuberculosis en Colombia, 2002. Biomédica 2004; 24(supl):102-14.
17. **HERNANDEZ JOHANA,** Martha I. Murcia, De la Hoz Fernando. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Bogotá en aislados clínicos obtenidos durante 11 años. Rev. Salud pública. 10 (1): 126-136, 2008.
18. **KURT TOMAN.** Tuberculosis detección de casos, tratamiento y vigilancia: preguntas y respuestas. OPS 2006.
19. **LOPEZ MARIN LUZ,** Díaz Otero Fernando, Vallecillo Maza Antonio Javier. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. Vol. 48. No. 2. Abril-junio. 2006. Pp. 173-178.
20. **MANCILLA MARCOS.** Martínez H Alexis. Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la x región de Chile. Rev chil infect. 2006; 23(3): 220-225.
21. **MENDEZ ECHEVARRÍA A,** Peña Mj, García Miguel. Tuberculosis. Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Infectología Pediátrica 2008.
22. **MIRANDA JORGE,** Ríos Rodrigo, Clavijo Andrea. Estudio preliminar de la susceptibilidad antimicrobiana y variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en un área del Caribe colombiano. Colombia Médica. Vol37 No 4. 2006 (octubre-diciembre).
23. **MIRANDA JORGE,** Ríos Rodrigo. Concordancia de métodos para susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Montería, Córdoba: tubo indicador de crecimiento micobacteriano vs. método de las proporciones múltiples. Vol. 39 N° 2, 2008 (Abril-Junio).

24. **NOEL CORTINAS MARÍA**, Fernández Marina. Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. *Rev Med Uruguay*. 2002; 18: 230-238.
25. **OLIVEIRA MARTHA**, Cohen Ingrid. Comparación de métodos moleculares útiles en la detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis multirresistente (MTB-MRD)*. *Vol 5-4 2001*.
26. **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD (OPS)**. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. 2008
27. **ORGANIZACIÓN MUNDIAS DE SALUD (OMS)**. Tratamiento de la tuberculosis, directrices para los programas nacionales.
28. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD (OMS)**. Contribución de la comunidad a la atención de la tuberculosis: una perspectiva latinoamericana. 2002
29. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**. Control mundial de la tuberculosis- informe mundial OMS 2009.
30. **PALERMO DOMINGO**, Ritacco Viviana, Ambroggi Marta. Tuberculosis multirresistente en pacientes con sida a comienzos del milenio. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 399-4004.
31. **PALOMINO JUAN C**, Ritacco Viviana. Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. 2007
32. **PATEK AMY**, Sanjay tyagi. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Biotechnology*. Vol. 16 1998.
33. **PEREZ LUIS JOSÉ**, Peláez Oscar. Situación actual y perspectivas clínicas de la tuberculosis. *Problemas terapéuticos. Enf emeg* 2005; 7(1):6-11.
34. **PIATEK AMY**, Kramer Fred. Molecular beacon sequence an analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Biotechnology vol 16 Abr. 1998*.
35. **PIFFARDI SILVANA**, Luna Andrea, Lepe rosario. Evaluación comparativa del método automatizado Bactec MIGIT 960 con el método de las proporciones para determinar susceptibilidad a drogas antituberculosas en chile. *Rev Chil Enf Respir* 2004; 20: 139-143.
36. **PONTINO M**, Fernandez C. Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a *mycobacterium tuberculosis*. *Revista Argentina de Microbiología* (2006) 38: 145-151.

37. **PORRAS TANIA B**, León clara Inés, Guerrero Martha. Evaluación de métodos genotípicos y fenotípicos para la detección de farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica* 2005,25:22-33.
38. **QUIRÓS ROLDÁN**, M. aioldi, F. Moretti, G. Carosi. Base molecular de Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Revista de diagnóstico biológico. Vol. 50. No 4 Madrid oct-dic. 2001.
39. **RANGEL SIFRIDO**, Ostrosky Luis. Tuberculosis de la salud: importancia de los programas de vigilancia y control. salud pública de méxico / vol.42, no.1, enero-febrero de 2000.
40. **RODRIGUEZ DE CASTRO F**, Violán J. Solé, Rodríguez Gallego J.C. Variabilidad genética en la susceptibilidad y en la gravedad de la neumonía. 2005.
41. **SIERRA CLAUDIA**. Sánchez Edgar. Determinación de la susceptibilidad a drogas de primera línea en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* por la técnica del tubo indicador de crecimiento micobacteriano. Rev. Fac. Med 2008 Vol. 56 No. 1.
42. **SIERRA CLAUDIA**, Sánchez Morales Edgar, Henao Riveros Sandra. Determinación de la susceptibilidad a drogas de primera línea en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* por la técnica del tubo indicador de crecimiento micobacteriano. Rev.Fac.Med 2008 Vol. 56 No. 1.
43. **SIFUENTES JOSÉ**, L Alfredo Ponce de león. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. Rev. Inv. Clin. Col. 47- No 4 Jul- Ago 1995 PP. 273-281.
44. **UGARTE GIL CÉSAR**, Ponce Álvarez mario, Moore David. Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. Acta med Per 25(3) 2008.
45. **URBINA MARTHA**, Vásquez C, Asencios Luis. Perfiles genéticos (IS6110) y patrones de resistencia en aislamientos de *M. Tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. Rev Perú Med Exp Salud publica 22(1). 2005
46. **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Servicio de microbiología. hospital se la santa creu i sant pau. 2003. Departamento de genética y microbiología.
47. **WILSON**, walter. Diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. 2002.
48. http://www.diariomedico.com/edicion/diario_medico/entorno/es/desarrollo/629254.html.

49. <http://www.salud.gov.pr/programas/programatuberculosis>.
50. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf>.
51. <http://www.medigraphic.com>.
52. <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/repind61/rcivih/rcivih.html#tran>
53. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>.
54. <http://www.cepis.org.pe/eswww/elnino/enfer10.html>.
55. <http://www.medicosgeneralescolombianos.com/tbc.htm>.