



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Mycobacterium tuberculosis*”

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

P. QFB. ERANDI FRUTOS HERNÁNDEZ

ASESOR:

M.C. FRANCLES BLANCO GUILLOT

MORELIA, MICHUACÁN; MARZO 2012



CONTENIDO	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
GLOSARIO	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
3. RESEÑA HISTÓRICA DE LA TUBERCULOSIS	5
4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS	12
5. ASPECTOS CLÍNICOS Y FISIOPATOGENIA	18
6. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO MYCOBACTERIUM	22
7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	25
8. ASPECTOS GENERALES DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS	30
9. DROGAS ANTITUBERCULOSAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
10. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	47
10.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS	47
10.1.1 MÉTODOS COLORIMÉTRICOS	63
10.2 MÉTODOS GENOTÍPICOS	69
11. CONCLUSIONES	84
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, Nicolás Frutos y Yolanda Hernández, pues es a ellos a quienes debo todo lo que soy, me han apoyado en todo momento y nunca han dejado de creer en mí.

Mis más profundos y sinceros agradecimientos al M.C. Francles Blanco, quien ha sido mi guía y mi maestro, cultivó en mí el gusto por la lectura, el raciocinio y la responsabilidad de ser profesionista, a él le debo la culminación de este trabajo y la introducción al fascinante mundo de la tuberculosis. Gracias por su paciencia, apoyo, motivación y las innumerables enseñanzas recibidas.

Agradezco también a la QFB. Gloria Figueroa, Directora del LESP, por permitirme la estancia durante este tiempo en el laboratorio; así como al QFB. Sergio Arellano por aceptarme como practicante y posteriormente tesista en el laboratorio de Micobacterias y alentarme a la realización de mi trabajo.

También doy las gracias a la Doctora Blanca Coyoli, responsable del Programa de Tuberculosis del Estado de Michoacán, por su accesibilidad y cooperación con información necesaria para la realización de esta revisión bibliográfica.

Para todos aquellos que directa o indirectamente han aportado algo a este trabajo, mis agradecimientos.

Muchas gracias.

DEDICATORIA

A mi hermanita, Amairani, mi ángel,
mi inspiración y mi motivo de seguir adelante.

Indice de tablas	Página
Tabla 1. Concentraciones de drogas en medio de Löwenstein-Jensen modificado	49
Tabla 2. Proporción crítica de resistencia antibiótica	50
Tabla 3. Proporción crítica de resistencia de acuerdo a cada concentración de droga	51

Índice de figuras	Página
Figura 1. Sanatorio para pacientes enfermos de tuberculosis	7
Figura 2. Robert Koch	8
Figura 3. Evolución natural y espectro de la tuberculosis	20
Figura 4. Representación esquemática de la pared celular micobacteriana	24
Figura 5. BAAR con tinción Ziehl-Neelsen observados a 100x.	26
Figura 6. Cultivo con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en medio Löwenstein-Jensen modificado	27
Figura 7. Tubos MGIT que muestran una reacción positiva y negativa a cepa resistente.	56
Figura 8. Colonia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> examinadas a 100x a los diez días de edad.	58
Figura 9. Amplificación biológica de fagos para detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y rápida detección de drogorresistencia	60
Figura 10. Placa con zonas de lisis, cepa resistente.	60
Figura 11. Técnica de fagos reporteros de luciferasa	61
Figura 12. Ensayo de la Nitrato Reductasa mostrando cepa sensible y cepa resistente.	64
Figura 13. Microplaca que muestra ensayos de MTT y ensayo de la Resazurina.	66
Figura 14. Proceso de hibridación en el sistema comercial INNOLipa_Rif.TB	74
Figura 15. Mecanismo de la técnica de microarreglos.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMK: Amikacina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ATP: Trifosfato de adenosina

BAAR: Bacilos ácido alcohol resistentes

BK: Bacilo de Koch

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CIM: Concentración mínima inhibitoria

CPM: Capreomicina

DTH: Reacción de Hipersensibilidad Retardada

EMB: Etambutol

ETH: Etionamida

FDA: Food and Drug Administration

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

INH: Isoniacida

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

KNM: Kanamicina

LRP: Fagos Reporteros de Luciferasa

MDR: Multidrogorresistente, traducido literalmente del inglés.

MGIT: Tubo Indicador de Crecimiento Micobacteriano

ml: mililitros

mm: milímetros

MODS: Observación Microscópica de Drogo-Sensibilidad

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio

NRA: Prueba de Nitrato Reductasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud
PAS: Ácido para-aminosalicílico
pb: pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PZA: Pirazinamida
RIF: Rifampicina
RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SSA: Secretaría de Salud
STR: Estreptomicina
TAES: Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
UICTER: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
USD: Dólares estadounidenses
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
XDR: Extremadamente drogorresistente
µg: microgramos

GLOSARIO

Aminoácido: molécula orgánica que contiene un grupo amino y un grupo carboxilo. Los que constituyen los bloques estructurales de las proteínas son aminoácidos alfa, ya que el grupo carboxilo y el grupo amino se hallan sobre el mismo átomo de carbono.

Antibióticos: sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos. Sin embargo, el uso común a menudo ha ampliado el término de antibióticos de modo que incluya antibacterianos sintéticos como las sulfonamidas y las quinolonas que no son sintetizados por microorganismos. Los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción.

CIM: concentración mínima de una sustancia necesaria para inhibir el crecimiento microbiano.

Codón: secuencia de tres nucleótidos de una molécula de ADN o ARNm, que representa la instrucción de incorporar un determinado aminoácido en una cadena polipeptídica en crecimiento.

Cepa salvaje: variedad natural de un determinado organismo y que no procede de colección de cultivos ni de centros de recursos biológicos.

Droga: cualquier sustancia activa (no alimenticia) de origen natural (vegetal, animal o mineral), semisintética o sintética que interactúa con organismos vivos para modificar un proceso o respuesta biológica y producir así, un efecto farmacológico.

Fenotipo: carácter observable de una célula o de un organismo.

Gen: región del ADN que controla una característica hereditaria discreta, habitualmente correspondiente a una sola proteína o un solo ARN. Esta definición abarca la unidad funcional completa, incluyendo las secuencias codificantes de ADN, las secuencias de ADN reguladoras, no codificantes y los intrones.

Genotipo: constitución genética de una célula individual o un organismo.

Lípidos: grupo de compuestos químicamente diversos, que poseen como principal característica la insolubilidad en agua. Las funciones biológicas de los lípidos son tan diversas como su naturaleza química. Las grasas y los aceites son las formas principales de almacenamiento en muchos organismos. Los fosfolípidos y los esteroides son los elementos estructurales mayoritarios de las membranas biológicas. Otros lípidos, aunque presentes en cantidades relativamente pequeñas, juegan papeles cruciales en la célula, como son: cofactores enzimáticos, transportadores de electrones, pigmentos fotosensibles, puentes hidrofóbicos para proteínas, hormonas, mensajeros intracelulares, etc.

Membrana plasmática: estructura que separa el contenido de la célula del medio externo, compuesta por una bicapa lipídica continua y proteínas intercaladas o adheridas a su superficie.

Mutación: alteración del genoma que involucra a uno o más nucleótidos, siendo las más comunes la sustitución de un nucleótido por otro, la pérdida o la inserción de uno o varios nucleótidos en una molécula de ADN. Cualquiera que sea el tipo de mutación, genera un cambio en la información contenida en el gen y lleva a la producción de una proteína distinta de la esperada o a la ausencia de su producción.

Plásmido: pequeña molécula de ADN circular que se replica de forma independiente del genoma.

Proteína: principal constituyente macromolecular de las células. Polímero lineal de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, siguiendo una secuencia determinada.

Resistencia antibiótica: la capacidad adquirida de un microorganismo para crecer en presencia de un compuesto antibiótico, al que habitualmente el microorganismo es sensible.

Topoisomerasa: enzima que hace de forma reversible cortes en una molécula de ADN facilitando la eliminación de nudos o de vueltas excesivamente enrolladas (por ejemplo, la girasa).

-1. INTRODUCCIÓN-

La tuberculosis es una enfermedad muy antigua. Se piensa que el género ***Mycobacterium*** se originó hace más de 150 millones de años. Se han encontrado deformidades esqueléticas características de tuberculosis en momias egipcias de hace miles de años antes de nuestra era (Cardoso y Portaels, 2007).

No fue hasta 1882 que Robert Koch logró aislar al agente causal de esta enfermedad, ***Mycobacterium tuberculosis*** (***M. tuberculosis***); y a más de un siglo del descubrimiento del mismo, la tuberculosis permanece como una de las principales causas de muerte, a nivel mundial, por un solo agente infeccioso y constituye un grave problema de salud pública. Aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con ***M. tuberculosis*** y 10% de estas personas desarrollarán la enfermedad en algún momento de su vida (Varaine et al., 2010). La tuberculosis es la única enfermedad que ha sido declarada como emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Palomino, 2009).

La persistencia de la tuberculosis está asociada a varios factores, entre los que se destacan los problemas socioeconómicos, el descuido de los programas de control, la crisis mundial, el aumento de la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el creciente aumento de la resistencia de ***M. tuberculosis*** a las drogas antituberculosas (Wade y Zhang 2004); en este sentido, la circulación de cepas multidrogorresistentes (MDR), resistentes al menos a la INH y la RIF, las dos drogas más importantes del tratamiento y la reciente aparición de las cepas extremadamente resistentes (XDR), (cepas MDR con resistencia añadida a alguna fluoroquinolona y a una de las tres drogas inyectables de segunda línea: amikacina, kanamicina y capreomicina), vuelven aún más difícil y costoso el control de esta enfermedad, la que pudiera llegar a ser incurable (CDC^a, 2006).

Basados en los datos de vigilancia mundial de drogorresistencia en tuberculosis ofrecidos por la OMS en 2008, se estimó que 3.6% del total de casos de tuberculosis en el planeta (440 000 casos) fueron tuberculosis MDR. Sin embargo, expertos en el tema declararon que estos datos subestiman la carga global real de

la enfermedad, pues en muchos países en vías de desarrollo los sistemas de vigilancia no son capaces de registrar de manera válida y segura la incidencia del problema (IOM, 2011). Los datos sobre la carga de casos de tuberculosis XDR es aún más limitado porque en gran cantidad de naciones se carece de la capacidad de infraestructura y laboratorios necesarios para dar seguimiento a los pacientes con tuberculosis MDR en cuanto a las pruebas de susceptibilidad a drogas de segunda línea (IOM, 2011).

La resistencia en *M. tuberculosis* surge por mutaciones genéticas espontáneas, pero cuando no se prescribe un tratamiento adecuado (monoterapia o incompleto), o el paciente no se apega de manera estricta al tratamiento, se favorece en la población infectante la selección de bacilos mutantes resistentes a la droga empleada (Zhang y Yew, 2009).

El tratamiento de los casos activos de tuberculosis constituye el componente más importante en los programas de control de esta enfermedad en el mundo (IOM, 2011). Es por esto que contar con métodos diagnósticos que brinden resultados confiables de la sensibilidad antibiótica es de gran utilidad para evaluar la calidad del tratamiento antituberculoso (Schluger, 2001). Los métodos de susceptibilidad *in vitro* juegan un papel fundamental en el monitoreo de la resistencia antibiótica de las cepas que circulan y en la selección de la terapia adecuada en pacientes infectados con cepas MDR (Schluger, 2001).

Existen dos clases de métodos para detectar estas cepas, los métodos fenotípicos que utilizan el cultivo microbiológico de la muestra para evaluar la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de antibióticos, destacando el método proporcional de Canetti, el cual es considerado estándar de oro para todas las pruebas de susceptibilidad *in vitro*; y los métodos genotípicos que emplean el ADN de Micobacterias (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).

La introducción del sistema radiométrico BACTEC-460 y su adaptación en los estudios de susceptibilidad *in vitro* en ***M. tuberculosis***, sentó las bases en el desarrollo de métodos más rápidos de detección de resistencia antibiótica (Palomino, 2009). Recientes avances en el campo de la biología molecular y progresos en el estudio de las bases moleculares de la resistencia en ***M. tuberculosis*** proveen las herramientas útiles para la detección rápida de cepas MDR, pero desafortunadamente, debido a los costos que involucra la implementación de estas técnicas moleculares, se hace imposible su empleo en países de limitados recursos económicos, en muchos de los cuales la tuberculosis y su complicación MDR constituyen un importante problema de salud (Palomino, 2009).

-2. OBJETIVOS-

GENERAL

- 1) Revisar las metodologías empleadas en la actualidad para la detección de resistencia antibiótica en ***M. tuberculosis***.

ESPECÍFICOS

- 1) Describir la enfermedad de Tuberculosis desde aspectos históricos, epidemiológicos, clínicos y fisiopatogénicos.
- 2) Resumir los métodos convencionales en el diagnóstico de la Tuberculosis.
- 3) Describir la resistencia antibiótica y su clasificación en ***M. tuberculosis***.
- 4) Analizar la aplicación de los métodos fenotípicos y genotípicos en la detección de resistencia antibiótica en ***M. tuberculosis***.

-3. RESEÑA HISTÓRICA DE LA TUBERCULOSIS-

La historia de la tuberculosis es un tema apasionante. En pocas enfermedades es posible documentar su estrecha relación con la historia de la propia humanidad como en la que nos ocupa (Polanco, 2000).

Se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años. Un temprano progenitor de *M. tuberculosis* fue probablemente contemporáneo y co-evolucionó con los homínidos en África del Este, hace tres millones de años. Los miembros modernos del complejo *M. tuberculosis* se debieron haber originado de un progenitor común hace cerca de 15,000-35,000 años (Cardoso y Portaels, 2007).

En la década de los 50 la hipótesis de co-evolución entre hospederos y especies de micobacterias no parecía tener más probabilidades que la hipótesis alternativa de “introducciones casuales” de varias especies saprófitas dentro de diferentes hospederos. El criterio epidemiológico tradicional de la tuberculosis es que la antroponosis debida a *M. tuberculosis* pudo encontrar su origen en un agente zoonótico, por ejemplo, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Este criterio es todavía sostenido por algunos autores; sin embargo, la genética trajo nuevas pistas dentro del debate. Por ejemplo, la secuenciación del genoma de *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), mostró que menos de la mitad del genoma contiene genes funcionales, lo cual confirma la anterior hipótesis de la historia basada en que *M. leprae* era un patógeno más joven que *M. tuberculosis*. En el caso del complejo *M. tuberculosis*, la genómica comparativa también ha mostrado que el genoma de *M. bovis* es más pequeño que el genoma de *M. tuberculosis*, lo cual abre el camino a un nuevo escenario para la evolución de los bacilos tuberculosos. La reducción genómica de *M. bovis* (pérdida de genes) de hecho sugiere que este patógeno podría ser más joven que *M. tuberculosis* o, en otras palabras, que la enfermedad de tuberculosis humana precede a la enfermedad bovina (Rastogi y Sola, 2007).

La tuberculosis fue documentada en Egipto, India, y China hace 5.000, 3.300 y 2.300 años, respectivamente. Las típicas anomalías esqueléticas, incluyendo

las deformidades de Pott, fueron encontradas en momias egipcias y andinas y fueron también representadas en el arte egipcio y pre-colombino (Cardoso y Portaels, 2007). Debido a que las micobacterias poseen una resistente pared celular rica en lípidos y una alta proporción de guanina y citosina en su ADN, dándole gran estabilidad, su genoma se preserva mejor que el del resto de las bacterias (Donogue et al., 2004). La identificación de material genético de *M. tuberculosis* en tejidos antiguos ha proporcionado una poderosa herramienta para la investigación de la incidencia y propagación de tuberculosis humana en periodos históricos. El ADN micobacteriano fue detectado en lesiones de hueso en la espina de un esqueleto humano masculino de la Edad de Hierro (400-230 antes de nuestra era), encontrado en Dorset, Reino Unido (Taylor et al., 2005); muestras de piel de la región pélvica de momias andinas, fechadas con carbono de 140 a 1.200 después de nuestra era; y restos de pleura calcificada de 1.400 años de edad, encontrada en la Basílica Bizantina en el desierto de Negev (Konomi et al., 2002). Las técnicas de ADN también han demostrado la presencia de ADN micobacteriano, con una baja frecuencia, en huesos con cambios no patológicos, lo que sugiere o diseminación de bacilos de tuberculosis inmediatamente antes de morir o tuberculosis miliar crónica (Zink et al., 2003).

La epidemia de tuberculosis en Europa, después conocida como la “Gran Plaga Blanca”, probablemente comenzó a inicios del siglo XVII y continuó en los siguientes 200 años. La muerte por tuberculosis era considerada inevitable y, en 1650, la tuberculosis fue la principal causa de muerte. La alta densidad de población y las pobres condiciones de sanidad que caracterizaron el crecimiento de las ciudades de Europa y Norte América en ese tiempo, proporcionaron el ambiente necesario, no conocido en la historia del mundo, para la propagación de este patógeno aéreo. La epidemia se propagó lentamente a través de la exploración y la colonización (Cardoso y Portaels, 2007).



Figura 1. Sanatorio para pacientes enfermos de tuberculosis (Brooks et al., 2005).

La patología precisa y las descripciones anatómicas de la enfermedad comenzaron a aparecer en el siglo XVII. Franciscus Sylvius de la Bøe de Amsterdam (1614-1672) fue el primero en identificar la presencia de los tubérculos como un cambio consistente y característico en los pulmones y otras áreas de pacientes tuberculosos. En su *Opera Medica*, publicada en 1679, también describió la progresión de las lesiones de tubérculos a úlceras y cavidades. La palabra latina *tuber* significa todo tipo de protuberancia degenerativa o tubérculos (Cardoso y Portaels, 2007). El médico inglés Benjamín Marten en 1719 propuso la teoría de que la tuberculosis era producida por unos seres microscópicos capaces de vivir en el organismo humano, anticipándose ciento cincuenta años al descubrimiento de Robert Koch (Polanco, 2000).

Las gotitas de Flügge fueron descritas en la década de 1890 por el bacteriólogo e higienista alemán Carl Georg Friedrich Wilhelm Flügge (1847-1923), quien demostró que incluso durante el discurso tranquilo se rocían gotitas en el aire en minutos; este hallazgo fue fundamental para que Jan Mikulicz-Radecki (1850-1905) promocionara el uso quirúrgico de máscaras de gasa en 1897 (Cardoso y Portaels, 2007).

En la noche del 24 de marzo de 1882, en Berlín, ante una audiencia escéptica compuesta por los hombres más eminentes en ciencia de Alemania de la Sociedad Médica, Robert Koch (1843-1910) hizo su famosa presentación “*La antología de la Tuberculosis*”. Usando medio sólido hecho de patata y agar, Koch inventó un nuevo método de obtener cultivos puros de bacterias. Su colega Julius Richard Petri (1852-1921) desarrolló platos delgados especiales (cajas de Petri), las cuales son todavía de uso común, para contener los cultivos. Koch logró aislar al agente causal de la tuberculosis: ***M. tuberculosis*** (Cardoso y Portaels, 2007).

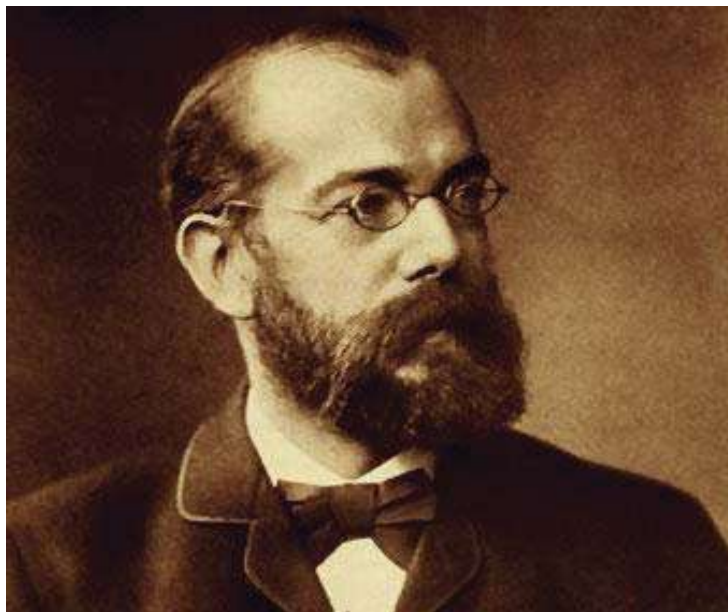


Figura 2. Robert Koch (Brooks et al., 2005).

Gaspard Laurent Bayle (1774-1816) demostró que los tubérculos no eran producto o resultado de la enfermedad sino causa de la enfermedad. El nombre “tuberculosis” apareció en el lenguaje médico en el momento en que se publicó la teoría de Bayle (Herzog, 1998). Más precisamente, el nombre “tuberculosis” fue acuñado en 1839 por el profesor alemán de Medicina Johann Lukas Schönlein (1793-1864) (Cardoso y Portaels, 2007).

En el año 1895 Wilhelm Konrad von Rontgen descubre los rayos X, con lo que la evolución de la enfermedad podía ser observada en pacientes enfermos de tuberculosis (Polanco, 2000).

En conjunción al conocimiento del agente causal y el mecanismo de transmisión de la tuberculosis, proliferó la aparición de los famosos sanatorios, con los que se buscaba, por un lado, aislar a los enfermos de la población general interrumpiendo la cadena de transmisión de la enfermedad, y por otro, ayudar al proceso de curación con la buena alimentación y el reposo (Polanco, 2000).

La toracoplastia y el neumotórax terapéutico eran hace un siglo y, hasta la aparición de la quimioterapia, dos técnicas utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar. Su objetivo era reducir el volumen de la caja torácica posibilitando el cierre de las cavidades producidas por la enfermedad tuberculosa (Abu-Shams et al., 2000)

La introducción de la quimioterapia en 1947 cambió por completo el destino de los pacientes con tuberculosis. A partir de la década de los 50, en varios países se presentó una caída dramática en la tasa de muerte por tuberculosis por medio del uso de antibióticos (Zhang y Yew, 2009). En 1959, el médico escocés J. Crofton publicó la idea de que si el tratamiento antibiótico se llevaba a cabo de forma correcta, el paciente tenía el 100% de probabilidad de una curación satisfactoria (Chiang et al., 2010). Ejemplo de ello lo constituyó la ciudad de Edimburgo donde se hizo un registro de 1938 a 1955 de las notificaciones de casos nuevos de tuberculosis y de las muertes causadas por esta enfermedad. Al aplicar la quimioterapia en todos sus pacientes se observó que el desenlace fatal de los enfermos se redujo de manera impresionante, pero no solo eso, también la notificación de casos nuevos se vio disminuida debido a que la medicación correcta evitaba, en gran medida, la transmisión de la enfermedad (Cardoso y Portaels, 2007).

La estreptomycin fue la primer droga usada para combatir la tuberculosis. En el año 1952 tiene lugar el desarrollo de un agente mucho más eficaz: la isoniacida. La rifampicina, en la década de los 60, hizo que los regímenes terapéuticos se acortaran de una forma significativa (Polanco, 2000). Poco después de que las primeras drogas antituberculosas fueran introducidas, se observó resistencia en algunos aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (Zhang y Yew, 2009).

La quimioterapia de la tuberculosis ha sido uno de los logros más espectaculares conseguidos por la medicina contemporánea, pues en pocos años se revirtió una situación en la que los únicos métodos eficaces eran la colapsoterapia y el sanatorio, a otra muy distinta, con pautas de medicamentos cortas, sencillas de administrar y de baja toxicidad que aseguran la curación en todos los casos (Sauret, 2011).

Sin embargo, a inicios de la década del 70 el descenso progresivo de casos condujo a una disminución en la financiación y el interés de los programas de control de la tuberculosis, y como resultado en los siguientes veinte años no se llevó a cabo ningún seguimiento concreto de la enfermedad ni de la resistencia antibiótica que algunos pacientes desarrollaban (Espinal, 2003).

A partir de 1980 se observó un notable incremento en la tasa de incidencia de tuberculosis; tanto en países en desarrollo como en los países más industrializados. El resurgimiento de la tuberculosis motivó que en marzo de 1993 la OMS declarara por primera vez a una enfermedad como “emergencia global de salud” (Suffys et al., 1997). Las causas de este incremento respondían fundamentalmente a los problemas económicos de muchos países y por consiguiente al deterioro de los programas de control sanitario, a la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), así como a los grandes asentamientos poblacionales (Cole y Telenti, 1995).

El primer estudio global sobre resistencia a antibióticos, concluido en 1997 bajo el auspicio de la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), mostró que en un tercio de los 35 países estudiados las cepas multidrogorresistentes (MDR) constituyeron entre el 2 y el 4% de todos los casos de tuberculosis. En este trabajo se identificaron las llamadas “zonas calientes” donde las cepas fueron resistentes tanto a Isoniacida como a Rifampicina, los antibióticos más eficaces en el tratamiento de la enfermedad. Es importante mencionar que en los pacientes infectados con cepas MDR, su cura se dificulta extremadamente y el tratamiento suele ser más tóxico y costoso (OMS, 1997). El término tuberculosis extremadamente drogorresistente (XDR) apareció por primera vez en la literatura en marzo de 2006 en un informe conjunto publicado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, siglas en inglés) y la OMS para describir una forma severa de la enfermedad, con lo que se agravaba aún más la situación de salud pública a nivel mundial (CDC^b, 2006).

-4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS-

La tuberculosis es transmitida de humano a humano principalmente por vía aérea. La fuente de infección es aquel paciente con tuberculosis pulmonar o laríngea que expectora bacilos por medio de pequeñas gotas infecciosas (gotas de Flügge) mientras tose, habla, canta, escupe o estornuda (Varaine et al., 2010). Estas partículas miden de 0.5 a 10 μm y pueden permanecer hasta 30 minutos en el aire en suspensión, lo cual les permite ingresar hasta la vía aérea pequeña y sacos alveolares, donde tienen contacto con los macrófagos. En la tuberculosis se le llama unidad bacilar a una gota de Flügge que contiene de uno a tres bacilos tuberculosos (American Thoracic Society, 2000).

Las gotas de Flugge son producidas también en el ambiente hospitalario y de laboratorio, en acciones sobre el paciente de tuberculosis como: tratamientos de aerosol, inducción de esputos, broncoscopías, manipulación de lesiones y procesamiento de muestras (esputos, biopsias, secreciones, etc.) (American Thoracic Society, 2000). La infección ocurre cuando estas gotitas son inhaladas por un huésped (Varaine et al., 2010).

Los bacilos de Koch (BK) forman los núcleos de estas pequeñas gotitas. Las partículas de mayor tamaño, aunque tengan mayor número de bacilos, son menos contagiosas, pues caen por gravedad, o en caso de ser inhaladas, son eliminadas por el sistema mucociliar y la tos (Polanco, 2000). Otras formas de infección menos comunes son la inoculación cutánea o contaminación digestiva en caso de tuberculosis bovina (Varaine et al., 2010).

La infecciosidad del paciente con tuberculosis está ligada a la cantidad de bacilos contenidos en su esputo. Los pacientes con baciloscopía positiva (BK+) son los más contagiosos. Aquellos con sólo el cultivo positivo y baciloscopía negativa (BK-) son menos contagiosos. Pacientes BK- y cultivo negativo generalmente no son contagiosos. Las formas extrapulmonares de la enfermedad sólo son contagiosas en circunstancias excepcionales. Los niños generalmente no son contagiosos

debido a que su tos es débil y tienen menos producción de esputo (Varaine et al., 2010).

Se estima que un paciente con tuberculosis y BK+, no diagnosticado y no tratado, infecta de 10 a 20 personas por año (esto varía de acuerdo al ambiente y estilo de vida de cada persona) (Varaine et al., 2010). Aproximadamente 10% de personas infectadas con el bacilo de la tuberculosis desarrollarán la enfermedad activa durante su vida, con un alto riesgo en los dos primeros años seguidos de la infección. Cerca del 55% de estos pacientes con enfermedad activa tienen una forma pulmonar contagiosa (American Thoracic Society, 2000).

Los mayores factores que contribuyen a la transmisión son (Varaine et al., 2010):

- Las características del enfermo.
- El entorno en que tiene lugar la exposición.
- La duración de la exposición.
- La susceptibilidad del hospedero.

A diferencia de lo que ocurre con el riesgo de adquirir la infección por *M. tuberculosis*, el riesgo de enfermar después de infectarse depende ante todo de factores endógenos, como la predisposición natural a la enfermedad y la eficacia funcional de la inmunidad celular. Las manifestaciones clínicas que aparecen inmediatamente después de la infección se denominan tuberculosis primaria y se observan con frecuencia en los niños de hasta cuatro años de edad. Esta forma puede ser grave y generalizada, pero no suele ser contagiosa. Cuando la infección se adquiere a edades más tardías hay mayor probabilidad de que el sistema inmune la contenga, por lo menos temporalmente. Sin embargo, pueden quedar bacilos en estado no replicante durante años antes de que se reactiven y produzcan la tuberculosis secundaria (o posprimaria), que suele ser contagiosa. (Harrison et al., 2005).

Una vez iniciado un tratamiento correcto, en tres o cuatro semanas el paciente ya no es infeccioso y a partir del segundo o tercer mes presenta baciloscopía negativa. De aquí la importancia que tiene en el control de la enfermedad, el diagnóstico precoz, el aislamiento y el inicio del tratamiento (Polanco, 2000).

Las micobacterias son sensibles a la radiación ultravioleta. Así, raramente, se produce el contagio en la calle, a la luz del día. El contagio se puede producir en un contacto esporádico con un enfermo, pero evidentemente cuanto más íntimo y prolongado sea el contacto, mucho mayores serán las posibilidades de infectarse, por tanto los más vulnerables podría citar a familiares, compañeros de habitación o trabajo. En general, se establece que 23-25% de los contactos con un caso infeccioso contraerán la infección (Polanco, 2000).

La tuberculosis pulmonar es una forma severa de la enfermedad; 50-60% de los pacientes con tuberculosis pulmonar no tratada mueren, 20-25% tienen curación espontánea y 20-25% desarrollan tuberculosis crónica con BK+ (American Thoracic Society, 2000). Con el adecuado tratamiento, la tasa de mortalidad puede caer a menos de 5%. En casos de tuberculosis extrapulmonar con BK-, la tasa de mortalidad sin tratamiento se estima de aproximadamente 40-50% (estas estimaciones aplican en pacientes sin infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana [VIH]) (Varaine et al., 2010).

El boletín informativo de la OMS sobre el estado actual de la tuberculosis en el mundo es impactante, en el cual se mencionan los siguientes datos (OMS, 2010):

1. En 2009 hubo un estimado de 9.4 millones de casos incidentes, de los cuales 1.0-1.2 millones fueron VIH positivos.
2. Existen 14 millones de casos prevalentes.
3. 1.3 millones de muertes de casos VIH negativos, y 0.4 millones de muertes de casos VIH positivos.
4. En 2008 existió un estimado de 440 000 casos de tuberculosis MDR.

5. En Julio de 2010, 58 países reportaron al menos un caso de tuberculosis XDR.

M. tuberculosis causa la muerte de más personas que cualquier otro agente infeccioso. Las defunciones por tuberculosis representan un 25% de toda la mortalidad evitable en los países en desarrollo, donde se registra un 95% de los casos y un 98% de los fallecimientos causados por esta enfermedad; 75% de los casos se sitúa en el grupo de edad económicamente productivo (15-50 años). Hasta el 2008, países como Rusia, India, Japón, Italia, Francia, España, Australia, Sudáfrica, Canadá, Estados Unidos, México y prácticamente toda América Latina, reportaron al menos un caso de tuberculosis resistente (Koneman et al., 2008).

La emergencia de tuberculosis MDR y XDR, se considera un serio problema a nivel mundial para el control de la tuberculosis. Más de 400,000 casos nuevos de tuberculosis MDR ocurren cada año, aunque actualmente se desconoce la cifra exacta, los casos de tuberculosis XDR se han detectado en varios países agravando aún más la situación. Aparte del evidente problema de salud y epidemiológico, la tuberculosis resistente también tiene un gran impacto económico, pues el tratamiento es 3.2% más costoso que para la tuberculosis no resistente (Migliori et al., 2008).

La infección por VIH y la tuberculosis son enfermedades que interactúan de manera sinérgica en todo nivel, desde el molecular hasta el epidemiológico (Koneman et al., 2008). Por ejemplo, la presencia de VIH en un individuo promueve la replicación intracelular del bacilo de la tuberculosis y, en consecuencia, la propagación de **M. tuberculosis** a otros (Narain et al., 1992). En muchas partes del mundo, la tuberculosis es una de las causas principales de muerte en los individuos infectados por VIH. La OMS ha calculado que un tercio de los 36.1 millones de personas que están infectadas por VIH tienen también tuberculosis (Koneman et al., 2008).

La tuberculosis sigue representando una causa importante de enfermedad, muerte y grandes costos económicos en América Latina, representando el 3,2% de la carga mundial de tuberculosis en todas las formas. En 2007 se estimaron unos 295 mil casos nuevos de tuberculosis en todas las formas y 41 mil defunciones, incluidas las casi 8 mil muertes por tuberculosis en las personas VIH-positivo, lo cual, según estimaciones, América Latina es la segunda región del mundo con mayor proporción de casos nuevos de tuberculosis infectados con el VIH y muertes debidas a la coinfección tuberculosis-VIH (OPS, 2010).

En el 2007, los países de la región del continente americano notificaron 218 mil casos nuevos de tuberculosis en todas las formas y 120 mil de tuberculosis pulmonar BK+, que corresponden al 74 y 76% respectivamente de los casos estimados por OMS (OPS, 2010).

Los presupuestos para el control de la tuberculosis en la región de América, representada por 16 países, se han triplicado en los últimos 5 años, alcanzando en 2009, 215 millones de dólares estadounidenses (USD). El presupuesto se concentra fundamentalmente en la línea estratégica Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), tuberculosis resistente, abogacía, comunicación y movilización social. El déficit financiero en 2009 alcanzó 52 millones de USD. El costo total del control de la tuberculosis ha crecido desde 2004 y asciende a 274 USD en 2009. En la región, los gobiernos son la fuente de financiación más importante para los Programas Nacionales de Control de Tuberculosis, las fuentes externas representan aún una pequeña proporción en el total del presupuesto (OPS, 2010).

En México, de acuerdo con la información disponible en el componente de tuberculosis del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (*SINAVE*), se ha presentado una disminución en la incidencia de la enfermedad, aunque la tuberculosis continúa presentándose con más de 17 mil casos nuevos y cerca de dos mil defunciones cada año, lo que representa una importante pérdida de años

potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años (OMS, 2007).

En 2009 se reportaron en México un total de 14,915 casos nuevos de tuberculosis pulmonar. El número total de casos registrados de tuberculosis que presentaron algún tipo de resistencia antibiótica en el período 2000-2009 por institución fue de 644; la Secretaría de Salud (SSA) registró 518, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) 99 y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) 22 y 5 más fueron registrados por otras instituciones. De estos 644 casos, el 85% fue resistente, el 13% MDR y el 2% XDR (Coyoli, 2011).

El estado de Michoacán ocupa el lugar número 23 a nivel nacional, en relación al número de pacientes con tuberculosis pulmonar (Coyoli, 2011). En 2008 se registraron 264 casos nuevos de tuberculosis pulmonar y 34 defunciones por tuberculosis en el estado; mientras que en 2009 se llegó a 278 los casos nuevos de tuberculosis pulmonar. En el 2010 hubo un total de 28 pacientes con resistencia antibiótica, 2 de los cuales presentaron tuberculosis XDR; por institución 24 fueron registrados en la SSA, 2 en el IMSS y 2 en el ISSSTE (Coyoli, 2011).

El programa nacional de control de tuberculosis intensifica sus acciones en aquellas áreas de salud del estado de Michoacán donde se detectan 55% del total de casos de tuberculosis, como son Morelia, Apatzingán y Lázaro Cárdenas (Coyoli, 2011).

-5. ASPECTOS CLÍNICOS Y FISIOPATOGENIA-

Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis son muy variables y dependen de factores relacionados con el paciente (edad, condición inmunológica, enfermedades coexistentes), la cepa infectante (virulencia, predilección por tejidos específicos) y la interacción hospedero-microorganismo (severidad de la enfermedad, órganos involucrados) (American Thoracic Society, 2000).

La tuberculosis que involucra cualquier sitio del cuerpo humano puede producir síntomas y signos que no están específicamente relacionados al órgano o tejido afectado en sí, sino son de naturaleza sistémica. Entre ellos, la fiebre, la pérdida de apetito y peso, la sudoración nocturna, la debilidad y el malestar general. La manifestación hematológica más común es la anemia, la leucopenia o la leucocitosis de rango leucemoide (American Thoracic Society, 2000).

La tos persistente (2 o más semanas), seca o acompañada de expectoración que puede ser mucoide, mucopurulenta o hemoptoica, es el síntoma más frecuente en la tuberculosis pulmonar. Con frecuencia se advierten estrías de sangre en el esputo. A veces aparece una hemoptisis masiva ocasionada por la erosión de un vaso por completo permeable, situado en la pared de una caverna, o bien consecutivamente a la rotura de un vaso dilatado en una caverna (American Thoracic Society, 2000). En los pacientes con lesiones parenquimatosas subpleurales a veces existe dolor pectoral, pero también puede deberse a la sobrecarga muscular causada por la tos persistente. Las formas extensas de la enfermedad pueden producir disnea y, en ocasiones, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda del adulto (Harrison et al., 2005).

La tuberculosis suele dividirse en pulmonar y extrapulmonar. Antes de que se conociera la infección por el VIH, más de 80% de todos los casos de tuberculosis se localizaban en los pulmones. Sin embargo, hasta dos tercios de los pacientes infectados por el VIH y que enferman de tuberculosis pueden padecer una enfermedad tuberculosa pulmonar y extrapulmonar, o sólo extrapulmonar (Harrison et al., 2005).

A partir de una localización pulmonar inicial (infección primaria), *M. tuberculosis* puede propagarse al organismo entero durante una fase silenciosa, generalmente en el inicio de la infección. La tuberculosis activa puede, por consiguiente, desarrollarse en muchos otros órganos, dando lugar a tuberculosis en nódulos linfáticos, huesos y articulaciones, genitourinaria, de efusión pleural o pericardial, meníngea o miliar. Estas infecciones presentan características clínicas comunes: evolución insidiosa, lesiones “frías” acompañadas por deterioración de la condición física, y falta en la respuesta a tratamientos sintomáticos o antiinfecciosos no específicos; a menudo están aisladas, pero pueden estar asociadas con una localización pulmonar, la cual debería ser buscada (Varaine et al., 2010). En los niños pequeños, con escasa inmunidad natural, la diseminación hematógena puede acabar en una tuberculosis miliar letal o en una meningitis tuberculosa (Harrison et al., 2005). La búsqueda de *M. tuberculosis* en frotis (orina, pus, fluido de ascitis, entre otros) es casi siempre negativa, pero el cultivo ayuda a mejorar el resultado del diagnóstico (Varaine et al., 2010).

El tiempo que transcurre desde la entrada del bacilo al organismo hasta que se establece la respuesta inmunitaria es el período de incubación que oscila entre 2 a 8 semanas (Frieden et al., 2003). En la primera fase de interacción entre el hospedero y la bacteria puede ocurrir que los macrófagos con bacilos englobados inhiban su multiplicación gracias a la producción de enzimas proteolíticas y citocinas, o que los bacilos comiencen a multiplicarse. Si se produce esto último, su proliferación acaba por lisar a los macrófagos. Los monocitos no activados que llegan a la lesión vehiculados por la sangre y atraídos por varios factores quimiotáxicos fagocitan a los bacilos que fueron liberados por los macrófagos lisados. Estas primeras etapas de la infección suelen ser asintomáticas (Harrison et al., 2005).

Unas dos a cuatro semanas después de la infección se producen dos nuevas respuestas del hospedero frente a *M. tuberculosis*: una que es lesiva para los tejidos y otra induce la activación de los macrófagos. La respuesta de lesión hística

se debe a la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH, por sus siglas en inglés) a diversos antígenos bacilares y destruye los macrófagos no activados que albergan a los bacilos en fase de multiplicación. La reacción de activación de los macrófagos es un fenómeno mediado por células que activan los macrófagos y les confiere la capacidad de destruir y digerir a los bacilos tuberculosos. Estas dos clases de respuesta pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias, pero el equilibrio entre ambas determinará la forma de tuberculosis que posteriormente se desarrollará (Harrison et al., 2005).

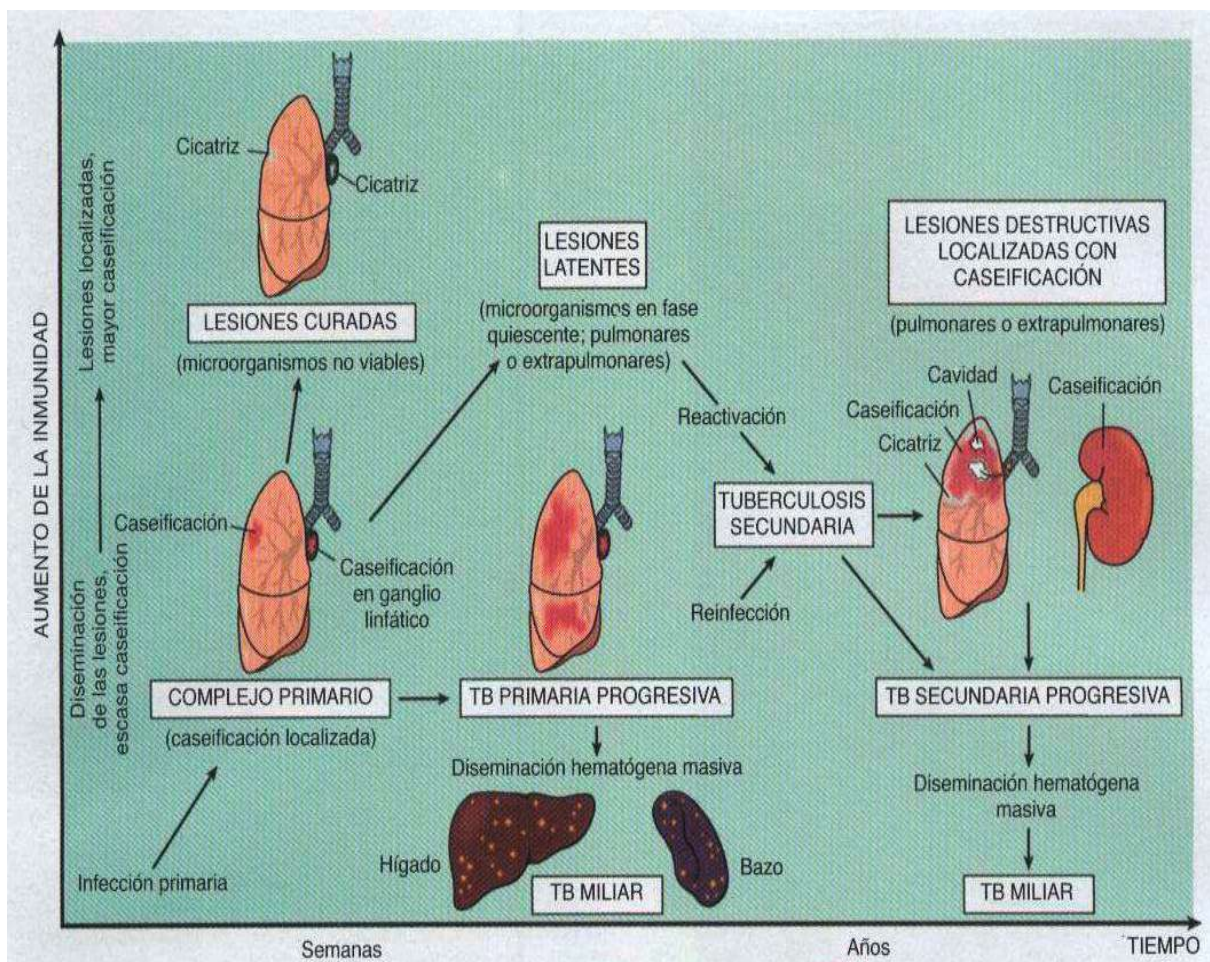


Figura 3. Evolución natural y espectro de la tuberculosis (Cotran et al., 2000).

Cuando se adquiere la inmunidad específica y se acumulan muchos macrófagos activados en el sitio de la lesión primaria aparecen las lesiones granulomatosas. Estas lesiones están formadas por linfocitos y macrófagos activados, como las

células epitelioides y las células gigantes. Al principio, la respuesta denominada lesión hística que acaba de producirse es el único cambio capaz de contrarrestar la proliferación de las micobacterias dentro de los macrófagos. Esta respuesta que está mediada por varios productos bacterianos, no sólo destruye a los macrófagos, sino que también causa una necrosis sólida precoz en el centro de la lesión granulomatosa. En este momento, algunas lesiones pueden curar por fibrosis y calcificación (lesión de Ghon), mientras que otras siguen evolucionando (Harrison et al., 2005). Aunque se produzca la curación hay bacilos viables que permanecen en un estado no replicante dentro de los macrófagos o del material necrótico durante años o incluso durante toda la vida del paciente, pero son capaces de reactivarse en un evento de inmunodepresión local (Frieden et al., 2003).

La tuberculosis secundaria se debe a una reinfección por ***M. tuberculosis*** o a la reactivación endógena de una infección tuberculosa primaria, y suele localizarse en los segmentos apicales y posteriores de los lóbulos superiores, donde la gran concentración de oxígeno favorece el crecimiento de las micobacterias. En ese caso, la lesión tiende a aumentar de tamaño y a extenderse cada vez más al tejido circundante. En el centro de la lesión, el material caseoso se licua. Se produce entonces la invasión y destrucción de las paredes bronquiales y de los vasos sanguíneos, seguido de la formación de cavidades. El material caseoso licuado, abundante en bacilos, se expulsa a través de los bronquios. Dentro de las cavernas, los bacilos se multiplican y propagan por las vías respiratorias y se expulsan con la expectoración (Harrison et al., 2005).

-6. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO MYCOBACTERIUM-

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente en el género *Mycobacterium*, único de la familia Mycobacteriaceae, perteneciente al orden Actinomycetales. En el esquema de clasificación de Bergey, dicha familia se incluye dentro del grupo de bacilos aerobios grampositivos, donde se encuentran además, la familia Corynebacteriaceae y las Nocardioformes (incluye a los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*) (Rastogi et al., 2001).

El género *Mycobacterium* incluye más de cien especies que se dividen en tres grupos: Complejo Tuberculosis, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti* (Leao et al., 2004). El otro grupo está formado por el Complejo Lepra, que incluye *M. leprae* y *Mycobacterium leprae-murium*, causantes de la lepra en el hombre y en el ratón respectivamente; y el último grupo de especies denominadas micobacterias “no tuberculosas”, en el que se incluyen el resto de las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores, las que pueden ser patógenas verdaderas, patógenas oportunistas o saprófitas (Rastogi et al., 2001).

Morfológicamente son bacilos ligeramente curvos o rectos, en pocas ocasiones ramificados, miden entre 0,4 x 3,0 μm , no esporulan, no tienen flagelos ni cápsulas (Brooks et al., 2005).

Las micobacterias forman más de una clase de colonias. Estas pueden ser rugosas, color hueso crema, elevadas, convexas, de bordes irregulares, con bacilos densos y compactos (por ejemplo *M. tuberculosis*), o pueden ser lisas y transparentes, con bacilos sin agrupaciones discernibles (por ejemplo en el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*), o de aspereza intermedia (por ejemplo *Mycobacterium kansasii*). En dependencia de la producción de pigmento se dividen en: fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmentos), escotocromógenas (forman pigmento en presencia o ausencia de luz) y no cromógenas (no producen pigmentos) (Koneman et al., 2008).

M. tuberculosis es una bacteria estrictamente aerobia, por lo tanto se multiplica mejor en el tejido pulmonar (en particular en el ápice, donde las concentraciones de oxígeno son más altas) que en el resto de los órganos, y obtiene la energía de la oxidación de compuestos sencillos del carbono. Las micobacterias tienen una velocidad de crecimiento mucho más lenta que la mayoría de las bacterias, ***M. tuberculosis*** tiene un tiempo de generación de 18 horas, por lo que necesita de 3 a 4 semanas de incubación a 37°C para formar colonias visibles macroscópicamente. Las formas saprófitas tienen un desarrollo más rápido, proliferan bien entre 22-37°C, producen más pigmento y son menos ácido resistente que las formas patógenas (Brooks et al., 2005).

La estructura más original de las micobacterias es su pared celular, una estructura con múltiples capas, de aproximadamente 20nm de espesor. Químicamente, la pared es muy compleja, y bien diferente a la que presentan las bacterias grampositivas y gramnegativas. La envoltura consiste en dos partes principales: la membrana plasmática y, alrededor de ella, la pared celular. La primera le otorga a la célula protección osmótica y transporte de iones y moléculas, en tanto que la segunda le brinda soporte mecánico y protección (Brooks et al., 2005).

La membrana plasmática de las micobacterias aparece en cortes ultrafinos como una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, dos capas electrón-densas separadas por una capa transparente. Sin embargo, tiene como característica la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomananos y fosfatidil-inositol-manósidos (Brooks et al., 2005).

La pared celular presenta una capa de peptidoglicano, arabinogalactano (complejo polisacárido covalentemente unido al peptidoglicano, formado por unidades de arabinosa y galactosa) y ácidos micólicos (Tovar y Torres, 2008).

Los ácidos micólicos, uno de los componentes más distintivos de la pared micobacteriana, son largas cadenas de ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono,

perpendiculares a la superficie de la célula, presentan pocos dobles enlaces, lo cual le confiere la hidrofobicidad a la capa y la convierte en una efectiva barrera contra la penetración de nutrientes hidrofílicos y antibióticos (Tovar y Torres, 2008).

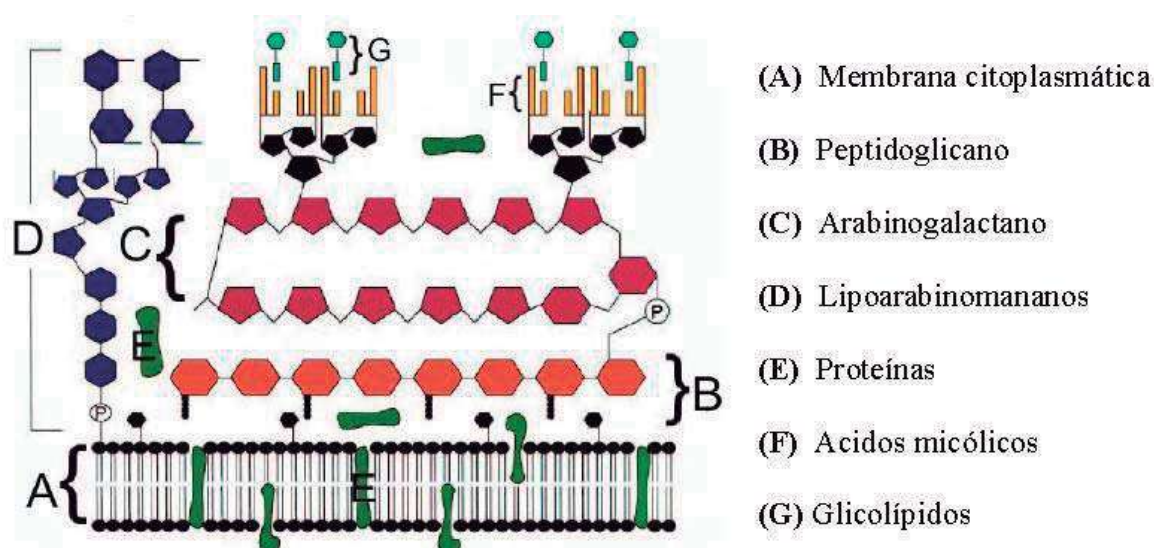


Figura 4. Representación esquemática de la pared celular micobacteriana (Murray et al., 2006).

Los canales en la pared celular micobacteriana son de naturaleza protéica, y constituyen una ruta de entrada de pequeñas moléculas de antibióticos hidrofílicos como la Isoniacida (Barry y Mdluli, 1996). Las moléculas grandes hidrofóbicas como la Rifampicina y los macrólidos se disuelven en la fase lipídica y se ponen en contacto con la fase acuosa en el interior de la célula. El paso a través de la bicapa lipídica juega un papel importante en la penetración de solutos debido a que la ruta hidrofílica es ineficiente. Muchas de las drogas efectivas contra las micobacterias muestran hidrofobicidad variable, estudios *in vitro* han demostrado que los derivados hidrofóbicos de aminoglucósidos son más activos contra *M. tuberculosis* que la mayoría de los derivados hidrofílicos (Karakousis et al., 2004).

-7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO-

Las micobacterias son difíciles de teñir debido a la presencia de gran cantidad de lípidos (ácidos micólicos) en la pared celular; por lo tanto el uso de la tradicional tinción de Gram es de poco o ningún valor ya que los colorantes no suelen penetrar las paredes celulares de las micobacterias. En cambio, los métodos usados para determinar ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas son las tinciones con carbol fucsina (Kinyoun o Ziehl-Neelsen) y la tinción de fluorocromo (por ejemplo, auramina O o auramina-rodamina) (Salfinger y Pfyffer, 1994).

La baciloscopia, es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de la tuberculosis, en la detección de casos y control de tratamiento. Con un costo bajo y de rápida ejecución, la baciloscopia es una técnica que permite identificar del 70-80% de los casos pulmonares positivos (OPS, 2008).

La confiabilidad de la baciloscopía depende de la calidad de la recolección de esputo. El esputo emitido temprano por la mañana a menudo muestra una concentración más alta de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). La confiabilidad de su examinación depende de la preparación e interpretación de las laminillas. Se recomienda que cada paciente se realice de 2-3 examinaciones sucesivas (Varaine et al., 2010).

Aunque la tinción de Ziehl-Neelsen sigue siendo el método más rápido para la detección de micobacterias, debido a su baja sensibilidad y especificidad (son necesarios 10,000 bacilos por mililitro de muestra para poderlos observar microscópicamente), el frotis de ácido-alcohol resistentes es un complemento y no un sustituto del cultivo (Kent et al., 1985).

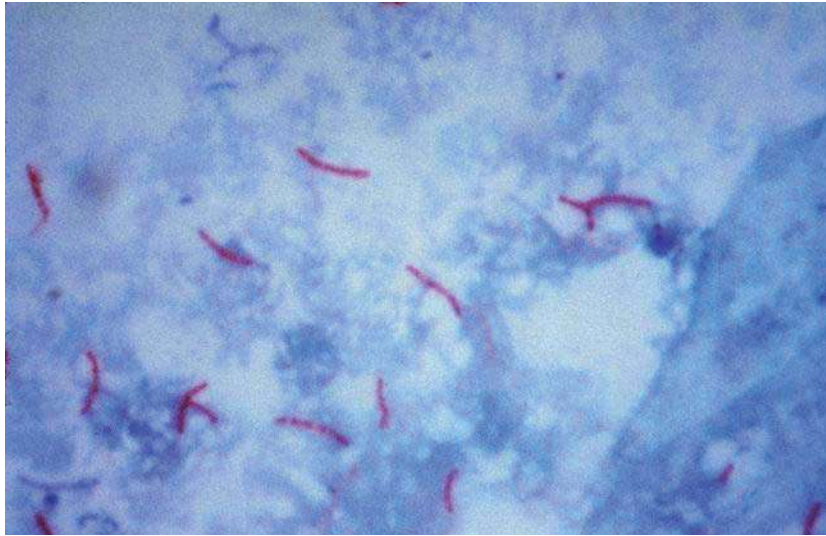


Figura 5. BAAR con tinción Ziehl-Neelsen observados a 100x.

A la hora de realizar el cultivo lo primero que debemos hacer es eliminar la máxima cantidad de microorganismos, que no sean micobacterias, de la muestra. Esto facilitará el cultivo de las mismas. Debemos tener en cuenta que el crecimiento de las micobacterias es muy lento (18-20 h), mientras que el resto de las bacterias presentes pueden duplicarse en 40-60 minutos; si esta duplicación se hiciese efectiva se agotarían los nutrientes del medio y como consecuencia de su metabolismo generan desechos lo que propiciaría un ambiente poco favorable del medio para el crecimiento de *M. tuberculosis* (OPS, 2008).

Para la recuperación óptima de micobacterias de muestras clínicas que se sabe están contaminadas, se requiere licuefacción de la muestra clínica (digestión) y eliminación de organismos contaminantes (descontaminación), lo cual se logra utilizando el método de Petroff (Garcia e Isenberg, 2007).



Figura 6. Cultivo con *Mycobacterium tuberculosis* en medio Löwenstein-Jensen modificado (Koneman et al., 2008).

El método de Petroff resulta agresivo para todos los microorganismos miembros de la flora normal presente en la muestra clínica, incluso para las micobacterias, durante el proceso una porción no despreciable de estas muere (hasta 30%), sin embargo las que son capaces de resistir ante tal agresión crecerán en el medio de cultivo. Esto nos garantiza la descontaminación de la muestra y por lo tanto la posibilidad de obtener un cultivo puro (OPS, 2008).

El cultivo produce resultados tardíamente pero es más sensible que la baciloscopía. Puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 BAAR por mililitro de muestra, si es realizado en forma adecuada (OPS, 2008). Además de su alta sensibilidad, otras ventajas del cultivo es que permite aislar la cepa responsable del cuadro clínico en el paciente, también constituye el soporte de las pruebas de identificación (bioquímica y molecular) y sensibilidad antibiótica (Blanco, 2011).

Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar. Si se considera el total de casos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmado bacteriológicamente, la baciloscopía detecta 70-80% y el cultivo 20-30% restante. Estas cifras están condicionadas por la situación epidemiológica (OPS, 2008).

Existen otro tipo de pruebas para el diagnóstico de tuberculosis, tales como las pruebas serológicas que son ampliamente usadas desde hace décadas, sobre todo en países en vías de desarrollo. Estas pruebas detectan anticuerpos, antígenos y complejos inmunes que evidencien la presencia de infección o enfermedad por tuberculosis. Ejemplos de ellas son el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, siglas en inglés), ensayos inmunocromatográficos o pruebas de flujo lateral, determinación de Interferón gamma y la pruebas de la tuberculina, la cual existe desde hace más de 100 años (Singh y Espitia, 2007).

Recientemente, la OMS hizo un llamado a todos los países a suspender el uso de pruebas serológicas para el diagnóstico de tuberculosis activa. La OMS indica que la evidencia revisada por un grupo de expertos concluyó que dichas pruebas proporcionan resultados inconsistentes e inexactos (OMS, 2011).

Una amplia variedad de pruebas basadas en cultivo también son empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis, como por ejemplo ensayos basados en fagos como FastPlaque (Biotec Laboratories Ltd., Ipswich, UK), o en la detección de crecimiento mediante la medición del consumo de oxígeno como Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT, siglas en inglés) (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA), entre otras (Palomino, 2006).

Por otro lado se han desarrollado técnicas moleculares para lograr los mismos resultados del cultivo con mayor celeridad. Ejemplo de ello son las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés). Algunos de los métodos aprobados por Food and Drug Administration (FDA) son: Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test (Roche Diagnostic Systems Inc, New Jersey, USA), Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (MTD; Gen-Probe, California, USA) y BD ProbeTec ET Direct TB System (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA). La prueba Amplicor amplifica el gen 16S de ARN ribosomal usando primers específicos con detección de una reacción colorimétrica. MTD está basado en la amplificación de transcritos

ribosomales de 16S, los cuales son detectados con una sonda ADN. Ambos métodos fueron aprobados para la detección de ***M. tuberculosis*** en muestras respiratorias con baciloscopía positiva. También existen métodos de PCR en tiempo real, como la prueba MTBC LightCycler (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) (Palomino, 2006).

La mayor ventaja de los métodos anteriormente mencionados es la rapidez para obtener resultados, sin embargo muestran variaciones en la sensibilidad y especificidad en relación a la naturaleza de la muestra (pulmonar o extrapulmonar). Debido a su alto costo y la exigencia en la capacitación del personal, sólo son usados en laboratorios de referencia nacionales y en laboratorios de investigación aplicada (Palomino, 2009).

Los métodos moleculares aún no han logrado sustituir a la detección, identificación y pruebas de sensibilidad dependientes del cultivo. El cultivo mantiene su posición como método de referencia por su especificidad y sensibilidad, y es aplicado en laboratorios de altos y medianos recursos. En México, el cultivo para ***M. tuberculosis*** se realiza en laboratorios de referencia nacional y en algunos laboratorios estatales, a los cuales se remiten las muestras clínicas provenientes de hospitales y centros de salud de todo el país (Coyoli, 2011)

-8. ASPECTOS GENERALES DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS-

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema muy amplio y puede ser analizado desde diferentes ángulos. Se nos hace importante verter los diferentes niveles de análisis del tema, pues en los posteriores capítulos del presente material se hacen referencia sólo a aquellos manifestos en *M. tuberculosis*.

Visto así, podemos referirnos a mecanismos de resistencia individuales, resistencia poblacional y resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección (Vignoli y Seija, 2008).

La resistencia individual se refiere a la interacción molecular entre una célula bacteriana con todo su arsenal genético y metabólico, y un antibiótico determinado. No siempre es suficiente con que el microorganismo posea un gen que codifica un mecanismo de resistencia particular, pues ese gen debe ser expresado en cantidad y calidad suficiente, y muchas veces deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la sobrevida bacteriana (Vignoli y Seija, 2008).

La resistencia poblacional representa el comportamiento in vitro de un inóculo bacteriano preestablecido (una población bacteriana) enfrentado a determinada concentración de un antibiótico (por ejemplo, concentración inhibitoria mínima), por un período de tiempo determinado. En este principio se basan los métodos de detección de resistencia que serán tratados en un capítulo posterior. Los resultados finales de estos tipos de estudios darán un informe de sensibilidad o resistencia, que son muy importantes para la orientación terapéutica del paciente, pero que no siempre coinciden con el éxito terapéutico (Vignoli y Seija, 2008). Así un coco grampositivo como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*, que in vitro es sensible a eritromicina, no puede ser combatido con dicho antibiótico si se encuentra produciendo bacteriemia, debido a que los macrólidos alcanzan una concentración plasmática insuficiente (Koneman et al., 2008).

La resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección se habla de eficacia terapéutica y juegan otros factores, como el sitio de

infección, las propiedades farmacocinéticas del antibiótico (donde se encuentran incluidos las dosis y el fraccionamiento del mismo), el estado inmunológico del paciente, el tamaño del inóculo bacteriano, etc. La recuperación del estado de salud del paciente, es el parámetro que determina la efectividad del tratamiento (Vignoli y Seija, 2008).

Estos tres conceptos forman peldaños de una escalera que se debe transitar para alcanzar el objetivo final, que es la erradicación de una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, en un paciente en particular. Precisamente la interacción antibiótico-bacteria se refiere al juego entre los mecanismos de acción de los antibióticos y los mecanismos de resistencia bacterianos (Vignoli y Seija, 2008).

La resistencia antibiótica para su estudio es dividida en resistencia natural (o intrínseca), resistencia adquirida y resistencia adaptativa (Leibler et al., 2004). La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Algunos microorganismos cuentan con cierta estructura que actúa como barrera, volviéndolos impermeables al antibiótico o simplemente carecen de la estructura que inhibe el antibiótico (Brooks et al., 2005). Por ejemplo, todas las bacterias gramnegativas son resistentes a vancomicina, y esta situación no es variable (Vignoli y Seija, 2008).

La resistencia adquirida se debe a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética (Vignoli y Seija, 2008). Las bacterias presentan tres diferentes mecanismos de transferencia de genes, el más común por el cual se transfieren genes de resistencia es la conjugación, en dicho mecanismo el genoma de un plásmido es transferido a otra célula y tiene como condición esencial el contacto celular. La transducción es un intercambio de información genética por medio de bacteriófagos, y la transformación es la incorporación de ADN libre del medio que rodea al microorganismo (Koneman et al., 2008).

Hasta aquí, la mayoría de los mecanismos de resistencia antibiótica pueden agruparse en 3 categorías (Vignoli y Seija, 2008):

- a) Inactivación enzimática: el principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas y los betalactámicos, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos.
- b) Modificaciones en el sitio blanco: existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo. Destacaremos algunos como son: modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico y/o la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales.
- c) Alteraciones de la permeabilidad: se pueden incluir aquí 3 tipos:
 - Alteraciones de las membranas bacterianas: observado fundamentalmente en gramnegativos y recientemente descrito en micobacterias (Niederweis et al., 2010), donde la membrana externa de la envoltura celular rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas.
 - Alteraciones en la entrada de antibióticos dependientes de energía, como ocurre en la primera etapa de ingreso de los aminoglucósidos.
 - Aumento de la salida de los antibióticos: la resistencia por eflujo (drug efflux pumps: bombas de excreción de drogas) es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. Existen 5 superfamilias de proteínas de estas bombas de excreción: -familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés: ATP binding cassette); -superfamilia del facilitador mayor (MFS, major facilitator superfamily); -familia de extrusión de multidrogas y tóxicos (MATE, multidrug and toxic-compound extrusión); -familia de resistencia pequeña a multidrogas (SMR, small multidrug resistance) y -familia de resistencia a división por nodulación (RND, resistance nodulation division). Existen en el genoma de *M. tuberculosis* 69 genes codificadores a bombas de excreción de drogas (De Rossi et al., 2006), no debe sorprender el hecho que todas las drogas antituberculosas en la actualidad sean sustrato de estas bombas (Niederweis et al., 2010).

La resistencia adaptativa a antibióticos es sobre todo fenotípica, aunque algunos factores genéticos predisponen al microorganismo a activar este mecanismo. Por tanto, bajo esta categoría se encuentran los mecanismos por los cuales las poblaciones de bacterias o fracciones de estas poblaciones genéticamente homogéneas y ordinariamente susceptibles llegan a ser resistentes a antibióticos.

Así, bajo esta categoría se encuentran (Leibler et al., 2004).

- a) Indiferencia a la droga: Las bacterias que no se dividen y/o no tienen suficientes nutrientes para un metabolismo activo, son parcial o completamente resistentes a antibióticos bactericidas (McDermott, 1958). Este fenómeno no se limita a la familia de antibióticos betalactámicos. Ejemplo de este fenómeno se manifiesta en las poblaciones infectantes de ***M. tuberculosis*** en su estado no-replicante, razón primaria para la larga duración del tratamiento contra la tuberculosis. Las poblaciones residuales y no replicantes de bacilos tuberculosos en el sitio de lesión del pulmón del paciente pueden contribuir a recaídas tras la interrupción o suspensión del tratamiento antituberculoso (Paramasivan et al., 2005).
- b) Persistencia: Es conocido que los antibióticos bactericidas no eliminan todas las bacterias aún en crecimiento activo (Leibler et al., 2004). Conforme pasa el tiempo, el rango de eliminación declina en fracción sustancial de la población bacteriana que sobrevive al encuentro con esa droga. Este fenómeno se le denomina persistencia bacteriana, resistencia adaptativa o tolerancia fenotípica (Leibler et al., 2004; Wiuff et al., 2005). Se cree que durante el curso de crecimiento las poblaciones bacterianas incluyesen células en proceso de reparación del ADN y no se estuviesen dividiendo, lo que generaría un fenotipo resistente (Leibler et al., 2004).
- c) Biopelículas (biofilm): Constituyen agregados celulares adherentes que se forman en superficies bióticas y abióticas (Callow JA y Callow ME, 2006). Se han postulado varias hipótesis sobre este fenómeno y su relación con la resistencia antibiótica, primero, las células bacterianas encajadas en la matriz de la biopelícula son menos accesibles a la difusión del antibiótico

(Anderl et al., 2000). La segunda razón es que se trata de una forma de indiferencia a la droga a causa de los nutrientes y otros limitantes, pues muchas de las células bacterianas dentro de la biopelícula no se replican ni metabolizan lo suficiente para que el antibiótico funcione de manera eficaz (Anderl et al., 2003). La tercera hipótesis, y actualmente la más apoyada, es que las bacterias dentro de las biopelículas se diferencian a estados refractarios a los antibióticos; es decir, una combinación de los fenómenos anteriores: indiferencia y persistencia (Southey-Pilling et al., 2005). *M. tuberculosis* es capaz de formar biopelículas en diferentes condiciones nutricionales y en presencia de drogas antituberculosas (Ojha et al., 2008), fenómeno que recientemente ha sido descrito también en otras especies de micobacterias (Esteban et al., 2011).

-9. DROGAS ANTITUBERCULOSAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Mycobacterium tuberculosis*-

La resistencia a las drogas antituberculosas se produce como consecuencia de la aparición de mutaciones espontáneas en el interior del genoma de *M. tuberculosis* (no se han descrito plásmidos codificantes de resistencia como en otras bacterias) y suelen codificar resistencia a una sola droga (Quirós-Roldán et al., 2001). El éxito del tratamiento de la tuberculosis se basa en la asociación de drogas nunca antes empleadas en el paciente para evitar la selección de cepas resistentes (Coll, 2003).

Las drogas de primera línea incluyen: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB) y estreptomycin (STR). Existen también otras drogas de segunda línea o de reciente desarrollo que constituyen alternativas para el tratamiento de aquellos pacientes infectados con cepas resistentes. Los principales grupos son los aminoglucósidos, polipéptidos, fluoroquinolonas, etionamida (ETH), cicloserina y ácido para-aminosalicílico (PAS) (CDC^a, 2006).

Resistencia a Isoniazida

INH fue descubierta en 1912 pero su uso como droga antituberculosa se inició hasta 1952. Posee una potente acción bactericida y actúa únicamente contra bacterias en fase de replicación activa (Quirós-Roldán et al., 2001). La concentración mínima inhibitoria (CIM) que contribuye para su eficacia es muy baja (0,02 – 0,05 µg/ml). Esta pro-droga requiere para su activación del complejo micobacteriano catalasa-peroxidasa, siendo la susceptibilidad a INH dependiente de la presencia de esta enzima, codificada por el gen *katG*. El derivado activo de INH bloquea la síntesis de ácidos micólicos, lo cual permite que el microorganismo sea susceptible a la acción de radicales de oxígeno reactivo y a otros elementos externos de respuesta del huésped (Zhao et al., 2006).

Se ha demostrado que las mutaciones en el gen *katG* ofrecen altos niveles de resistencia a INH en 22-64% de los casos (Zhang, 2005). La mutación más comúnmente observada en *katG* es en el codón 315, que causa el cambio del aminoácido Serina 315 por Treonina (Ser315Thr) (Hofling et al., 2005).

Por otra parte, la enzima enoil ACP reductasa, involucrada en los pasos de elongación de ácidos grasos, codificada por el gen *inhA* se identificó como un blanco de acción de INH. El intermediario de INH, cuya activación depende de la actividad catalasa-peroxidasa intacta, inhibe la actividad de la enzima *inhA* y en consecuencia la síntesis de ácidos micólicos (Sacchettini y Blanchard, 1996). Las mutaciones en el gen *inhA* inducen sobreexpresión del gen *inhA* y niveles elevados de la enzima enoil reductasa en cantidades que superan el poder inhibitorio de INH. Las mutaciones en *inhA* están asociadas aproximadamente al 25% de los casos de resistencia a INH, generalmente con bajos niveles de resistencia (CIM $\leq 1\mu\text{g/ml}$) (Banerjee et al., 1994). Recientemente se ha propuesto a este gen como el responsable de la corresponsencia a INH y ETH (Said et al., 2005).

La investigación de otros genes involucrados en resistencia a INH que explicaran el mecanismo de resistencia de 10 a 20% de cepas que carecían de mutaciones en *katG* o *inhA* condujo a la identificación del gen *aphC*, codificante de la enzima alquil hidroperóxido reductasa, involucrada en la respuesta a estrés oxidativo. Las mutaciones en *aphC* están asociadas a aproximadamente un 10 a 15% de aislados clínicos resistentes a INH (Wilson y Collin, 1996). Se ha observado que 15% de cepas resistentes a INH presentan mutaciones en el locus *kasA*, lo cual implica que otro posible objetivo de INH es la proteína *kasA*, involucrada en el mecanismo de elongación de los ácidos grasos. Las mutaciones en este gen confieren bajos niveles de resistencia a INH. Actualmente se investigan otros genes candidatos asociados con resistencia a este antibiótico (Zhang et al., 2005).

Resistencia a Rifampicina

RIF fue desarrollada por el investigador italiano Pietro Sensi en 1965 a partir de la *Nocardia mediterranei*, se utiliza en el tratamiento antituberculoso desde 1967; tiene un efecto bactericida sobre las células metabólicamente activas de *M. tuberculosis*. La CIM es muy baja 0,005 – 0,2 $\mu\text{g/ml}$. RIF es un potente inhibidor de la síntesis de ARN mensajero (ARNm), y por tanto, de la transcripción genética, al

unirse a la polimerasa de ARN dependiente de ADN de los procariotas. La inhibición de la transcripción tiene lugar porque RIF se fija a la subunidad β (Coll, 2003).

La resistencia a esta droga se explica por mutaciones en el gen *rpoB*, el cual codifica la subunidad β de la ARN polimerasa y las alteraciones en esta subunidad impiden que la RIF interactúe adecuadamente con la ARN polimerasa e inhiba la transcripción (Telenti, 1998).

Se ha demostrado que más del 96% de las cepas resistentes a la RIF presentan mutaciones en el gen *rpoB*, las cuales generalmente se localizan en un corto segmento de aproximadamente 81 pares de bases (pb) que incluye los codones 507 a 533 del gen *rpoB*. Las mutaciones más frecuentes se presentan en los codones Ser531Leu, His526Tyr y Asp516Val. La CIM muestra que un alto nivel de resistencia a RIF está asociado con mutaciones en el codón 526 y 531 (CIM >32 μ g/ml), mientras que la alteración en el codón 516 resulta en un bajo nivel de resistencia (Telenti et al., 1993). Los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a RIF que no contienen mutaciones en el gen *rpoB* son raros. En estas cepas, la resistencia puede deberse a mutaciones fuera de esta región, particularmente en la región amino terminal, así como cambios en la permeabilidad de la membrana que afectan la incorporación de la droga. La resistencia a RIF se asocia a la resistencia a INH, por lo que su detección constituye un marcador de multirresistencia (Zhang, 2005).

Resistencia a Pirazinamida

PZA fue descubierta en 1952, y constituye una de las drogas más importantes de primera línea, al ser usada junto con INH y RIF permitió reducir el período de tratamiento de tuberculosis. Esta pro-droga es convertida, por acción de la enzima pirazinamidasa/nicotinamidasa, en su forma activa ácido pirazinoico, el cual genera

un pH ácido intrabacteriano y al parecer causante del efecto contra *M. tuberculosis*. La CIM promedio es de 20µg/ml (Zhang, 2005).

PZA atraviesa la membrana celular de la micobacteria a través de difusión pasiva, y es hidrolizada en el citosol por la pirazinamidasas (*pncA*), liberándose un grupo amonio y produciendo como resultado el ácido pirazinoico. El ácido pirazinoico abandona la micobacteria por difusión pasiva luego de lo cual es protonado extracelularmente, para finalmente reingresar a la micobacteria a través de un canal impulsado por diferencia de potencial. Una vez dentro de la micobacteria, el protón es liberado y el ácido pirazinoico vuelve a salir y se repite el ciclo. El resultado es una translocación de protones hacia el interior de la micobacteria con una reducción significativa y letal del pH intracelular (Wade y Zhang, 2004).

La mayoría de los aislamientos (72-97%) de *M. tuberculosis* resistentes a PZA tienen afectada usualmente, la actividad de la pirazinamidasas, enzima que es codificada por el gen *pncA*, con la subsecuente pérdida de la capacidad para activar el antibiótico; las mutaciones están dispersas en todo el gen, pero cierto grado de agrupamiento de mutaciones se encontraron en las regiones: Gly132-Thr142, Pro69-Leu85, and Ile5-Asp12 (Scorpio et al., 1997). No obstante, existen cepas resistentes a PZA, sin mutaciones en el gen *pncA*, en las que esta resistencia se debe a otros mecanismos relacionados con el eflujo o la permeabilidad de la membrana plasmática (Scorpio y Zhang, 1996).

Resistencia a Estreptomicina

STR fue descubierta en 1943 y fue la primer droga usada para el tratamiento de la tuberculosis. Al igual que otros aminoglucósidos, STR interfiere en la síntesis de proteínas procarióticas, produce errores de lectura en el código genético como son la inhibición de la iniciación y la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica durante la transcripción del ARNm (Coll, 2003). La proteína S12, una

subunidad del ribosoma 30S, es el principal blanco de STR. La CIM para las cepas sensibles a STR oscila alrededor de 8µg/ml (Zhang, 2005).

El mecanismo de resistencia a STR conocido es por alteración de la diana sobre la que actúa (16sARN) como consecuencia de mutaciones cromosómicas. Estas mutaciones afectan a los genes que codifican el ARN ribosomal (ARNr) 16S (*rrs*) y la proteína ribosomal S12 (*rpsL*) (Musser, 1995). Las mutaciones que afectan al gen *rpsL* se dan en 52-59% de las cepas resistentes y produce una resistencia de alto nivel (CIM > 500µg/ml) (Telenti, 1998). Las mutaciones de este gen se encuentran en los codones 43 (Lisina—Arginina y/o Treonina) y 88 (Lisina—Glutamina, Arginina y/o Treonina) (Caws y Drobniewski, 2001).

Las mutaciones que afectan al gen *rrs* se observan en 8-21% de las cepas y producen una resistencia de nivel intermedio (CIM 50-500µg/ml) (Telenti, 1998). La mayor parte de las mutaciones en *rrs* se circunscriben a la región 530. Esta región interacciona con la proteína ribosomal S12. Existen diferentes teorías que relacionan la estructura conformacional de la región 530 con la fidelidad de la traducción (Meier et al., 1996).

En aproximadamente un tercio de las cepas resistentes existe un nivel de resistencia bajo (CIM 25-50µg/ml) y no se detectan alteraciones en los genes *rrs* o *rpsL*. En estas cepas se ha sugerido un mecanismo de permeabilidad de la membrana plasmática para justificar la resistencia (Meier et al., 1996).

Resistencia a Etambutol

Esta droga se sintetizó por primera vez en 1961, tiene actividad bacteriostática y es activa únicamente en bacterias en fase de multiplicación activa, con CIM de 1 a 5µg/ml (Quirós-Roldán et al., 2001). EMB bloquea la incorporación de los ácidos micólicos al arabinogalactano o un paso en la biosíntesis de arabinogalactanos y lipoarabinomanano lo que provoca una inhibición de la biosíntesis de la pared

micobacteriana (Coll, 2003). Evidencias experimentales y clínicas indican que EMB ejerce un efecto sinérgico con otras drogas antituberculosas como consecuencia del incremento en la permeabilidad bacteriana, permitiendo el ingreso en mayor cantidad de otros medicamentos (Said et al., 2005). El sinergismo entre EMB y STR es de gran importancia, ya que EMB en su acción desestabilizadora de la pared micobacteriana produce pequeños poros que favorecen que STR penetre al interior celular (Chopra y Brennan, 1998).

La resistencia a EMB está asociada con cambios en una región genómica definida, el conjunto de genes *embCAB*, localizados en un locus de 10,000pb, los cuales codifican arabinosiltransferasas involucradas en la síntesis de componentes de la pared celular micobacteriana, el arabinogalactano y el lipoarabinomano (Telenti, 1998). Cerca de 70% de las cepas resistentes a EMB presentan una mutación puntual en el codón 306 Metionina del gen *embB*, causando la sustitución por Valina, Leucina o Isoleucina (Sreevatsan et al., 1997). Estas mutaciones dan un alto nivel de resistencia (CIM >20µg/ml) y se debe a un proceso múltiple que incluye como primer paso una sobreexpresión de las proteínas Emb, para posteriormente añadirse las mutaciones en la región EmbB o cambios adicionales en los niveles de expresión. En las cepas que no presentan mutaciones en la región EmbB la resistencia suele ser menor con CIM <10µg/ml (Telenti et al., 1997).

Resistencia a fluoroquinolonas

La actividad de las quinolonas tiene lugar a nivel de las topoisomerasas de tipo II y, fundamentalmente, sobre la ADN-girasa compuesta de dos subunidades A y de dos subunidades B codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Una diana secundaria de actuación sería la topoisomerasa IV, codificada por los genes *parC* y *parE*. El desarrollo de la resistencia a las quinolonas es un proceso complejo que generalmente asocia mutaciones que afectan la ADN-girasa, la topoisomerasa IV y/o proteínas de membrana que regulan la permeabilidad y el eflujo de la droga. En *M. tuberculosis* se han descrito mutaciones en *gyrA61* que se asocian a

resistencia clínica a ciprofloxacina, así como resistencia cruzada con ofloxacina. También se han descrito mutaciones en el gen *gyrB62* así como una bomba de eflujo (gen *lfrA*) que confiere una resistencia de bajo nivel (Cambau y Jarlier, 1996).

La resistencia a las quinolonas en el curso de tratamiento aparece con una frecuencia de 10^7 - 10^8 (Quirós-Roldán et al., 2001).

Resistencia a aminoglucósidos

Kanamicina (KNM) y amikacina (AMK) son aminoglucósidos que inhiben la síntesis de proteínas de bacilos en estado replicante. Estos aminoglucósidos se unen a los ribosomas bacterianos e interrumpen la elongación de la cadena polipeptídica de la micobacteria. Las mutaciones en el gen *rrs* que codifican para ARNr 16S son asociadas con resistencia a AMK y KNM. Los cambios en los nucleótidos en las posiciones 1400, 1401 y 1483 en el gen *rrs* son asociados con resistencia específica a KNM, y el cambio en la posición 1408 se asocia a resistencia a AMK (Suzuki et al., 1998).

Resistencia a polipéptidos

Capreomicina (CPM) y viomicina son antimicrobianos peptídicos básicos que tienen el mismo mecanismo de acción que los aminoglucósidos. Las mutaciones en el gen *rrs* que codifica para ARNr 16S está asociado con la resistencia a viomicina y CPM. La proporción de mutantes resistentes espontáneas es elevada oscilando entre 10^{-3} y 10^{-5} . La CIM de CPM en cepas sensibles oscila alrededor de 10 µg/ml. CPM es menos tóxica que viomicina. Algunas cepas resistentes a CPM presentan resistencia cruzada con AMK y KNM (Coll, 2003). Después de STR, capreomicina es la droga más útil para tratar la tuberculosis (Harrison et al., 2005).

Resistencia a Rifabutina

Rifabutina es un derivado semisintético de la espiropiperidil rifamicina, que conserva muchas de las propiedades de RIF, incluida su acción contra *M. tuberculosis*. Rifabutina también resulta eficaz contra algunas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a RIF y a otras drogas. Su mecanismo de acción es el mismo que RIF, inhibe la transcripción genética. Para tratar a los individuos VIH-positivos que están tomando un inhibidor de las proteasas se aconseja usar rifabutina en lugar de RIF, debido a que su efecto en esos agentes es menos pronunciado. Las mutaciones en el gen *rpoB* confieren resistencia a rifabutina (Harrison et al., 2005).

Resistencia a tionamidas

ETH y protionamida son derivados del ácido isonicotínico con una potente actividad frente a *M. tuberculosis*. ETH inhibe la síntesis de ácidos micólicos y estimula las reacciones de oxidorreducción. Su mecanismo de acción es parecido al de INH. De hecho, las mutaciones en el gen *inhA* que confieren una resistencia de bajo nivel a INH también producen resistencia a ETH. Presenta resistencia cruzada con la tiacetazona. La CIM de ETH para *M. tuberculosis* oscila entre 0,6 y 2,5 µg/ml (Banerjee et al., 1994).

Resistencia a D-cicloserina

D-cicloserina es un análogo de la D-alanina que inhibe de forma competitiva, las enzimas D-alanil-D-alanina sintetasa, alanina racemasa y alanina permeasa, interfiriendo con la síntesis de la pared micobacteriana. Las CIM para *M. tuberculosis* oscilan entre 5 y 20 µg/ml. La resistencia a D-cicloserina parece depender de alteraciones en la D-alanil-D-alanina sintetasa (Coll, 2003). Sus intensos efectos secundarios disminuyen su utilidad, ya que esta droga provoca

psicosis (en algunos casos con suicidio), convulsiones, neuropatía periférica, cefalalgia, somnolencia y reacciones alérgicas (Harrison et al., 2005).

Resistencia a ácido paraaminosalicílico

El ácido paraaminosalicílico (PAS), en forma de sal cálcica o sódica, inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* alterando la síntesis de folato, pero rara vez está indicado para tratar la tuberculosis debido a su escasa actividad antituberculosa y a la intensidad de sus efectos secundarios en el tubo digestivo (náusea, vómito y diarrea) (Harrison et al., 2005). La CIM para *M. tuberculosis* es de 1 µg/ml (Coll, 2003).

Resistencia a rifapentina

Este antibiótico, una ciclopentil rifamicina semisintética, ha sido autorizado pronto por la FDA para el tratamiento de la tuberculosis. Es la primer droga nueva que se aprueba en 25 años en Estados Unidos para la tuberculosis. Aunque es similar a RIF, rifapentina es lipófila y tiene una acción más prolongada (propiedad que ayuda al paciente a cumplir el tratamiento). Rifapentina es bactericida y actúa inhibiendo la polimerasa de ARN dependiente de ADN en las bacterias sensibles. La CIM de rifapentina en las cepas de *M. tuberculosis* sensibles a RIF oscila entre 0,03 y 0,12 µg/ml. Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifapentina, RIF y rifabutina presentan mutaciones en el gen *rpoB*. Todas las cepas resistentes a RIF lo son también a rifapentina (Harrison et al., 2005).

RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Mycobacterium tuberculosis*

En una lesión tuberculosa activa existen al menos cuatro poblaciones distintas de *M. tuberculosis* (Varaine et al., 2010):

- Bacilos de multiplicación activa en cavidades abiertas que son los responsables del contagio.
- Bacilos de multiplicación lenta en tejido inflamatorio ácido.
- Bacilos de multiplicación esporádica en tejidos.
- Bacilos inactivos en lesiones sólidas.

Cada droga antituberculosa tiene una acción específica en una o más de estas poblaciones bacilares pero ninguno en bacilos inactivos (Varaine et al., 2010).

La resistencia en *M. tuberculosis* surge, en primer lugar, por mutaciones genéticas espontáneas. En toda población de células sensibles, existe una pequeña proporción de mutantes resistentes por cada generación, que varía en dependencia de la droga a la cual se manifieste la resistencia. Cuando una única droga es utilizada en el tratamiento de la tuberculosis, la mayoría de los bacilos, sensibles a ésta, son inhibidos o muertos, pero se favorece la selección de mutantes resistentes a la droga empleada. Además, como el tratamiento es a largo plazo debido a que la población bacteriana es elevada, las células mutantes resistentes continúan su multiplicación y se tornan en mayoría (Zhang y Yew, 2009).

Actualmente, se acepta que en un cultivo salvaje de *M. tuberculosis* aparece, por mutación espontánea, un microorganismo resistente a INH por cada 10^5 - 10^7 bacilos, tasa igual a la encontrada para EMB, STR, KNM y PAS. La aparición de mutantes resistentes a RIF es menos frecuente (10^7 - 10^9 bacilos), en cambio puede ser muy elevada (1×10^3) para ETH, cicloserina, CPM, viomicina, tiacetazona y embiomicina, y de 1×10^2 - 10^4 para PZA (Riska et al., 2000). Se sabe que la mutación de los bacilos es independiente para cada una de las drogas, por lo que la posibilidad de que se presenten asociadas es igual al producto de sus tasas respectivas de mutación (Caminero, 2001).

Por tanto, toda monoterapia (real o encubierta por asociación con drogas previamente resistentes e ineficaces) llevará al fracaso y a la selección de

resistencia. De esta forma, la asociación de drogas nunca usadas en el enfermo (o que se hayan utilizado asociadas adecuadamente) debe ser la primera premisa que ha de tenerse en cuenta en el tratamiento de la tuberculosis, hecho relativamente fácil de seguir si se trata de un paciente inicial, pero que se torna a veces difícil de realizar cuando un enfermo ha recibido previamente varios esquemas terapéuticos (Caminero, 2001).

Según lo expuesto previamente, existirían dos conceptos completamente diferentes de resistencias. El primero de ellos sería la denominada “resistencia natural”, la cual es aquella que presentan las cepas salvajes, como fruto de su multiplicación continua que, al alcanzar un determinado número de bacilos, se produce una mutación genética en un bacilo concreto, mutación que puede afectar específicamente al lugar donde interviene alguna de las drogas. Pero esta resistencia natural debe ser seleccionada por la droga para que se exprese fenotípicamente. Cuando esto se produce por una mala terapéutica (monoterapia real o encubierta) se da lugar a la “resistencia en casos previamente tratados”, o también llamada “resistencia adquirida”, que siempre tendrá detrás de sí una mala actuación por parte del ser humano, ocasionándose por una inadecuada prescripción del tratamiento por parte del médico, o por una mala adherencia al tratamiento (Parsons et al., 2004).

Si un paciente portador de una resistencia adquirida contagia a un individuo que no había recibido con anterioridad tratamiento antituberculoso, le podrá ocasionar una tuberculosis con una resistencia, denominada “resistencia en casos nuevos”, o “resistencia primaria”, por presentarse en individuos que nunca antes han sido tratados (OMS, 2004).

Se entiende por drogoresistencia en tuberculosis al concepto microbiológico, en el que *M. tuberculosis* aislado de un enfermo, no es susceptible a la acción de RIF o INH y/o alguna otra droga de primera línea (Cohn et al., 1997).

Se considera tuberculosis MDR cuando al aislar a ***M. tuberculosis***, no es susceptible al menos, a la acción de RIF e INH administrados simultáneamente (Cohn et al., 1997).

La tuberculosis XDR es la resistencia a la acción de RIF e INH, más una quinolona y uno o más de los tres inyectables de segunda línea (KNM, CPM y AMK) (CDC^b, 2006).

La pregunta sobre el futuro de la tuberculosis MDR en el mundo va ligada a la transmisibilidad y a la virulencia de los bacilos MDR. Si a estos bacilos resistentes se le supone la misma capacidad de contagio y de producir enfermedad que a los bacilos sensibles, entonces la situación sí será crítica, pues de los 50 millones de personas infectadas por bacilos MDR habría que estimar que un 10% de ellos acabará enfermando de una tuberculosis de difícil curación (American Thoracic Society, 2000).

-10. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA-

La importancia de actuar de forma rápida y efectiva ante la sospecha de estar frente a una cepa de tuberculosis drogorresistente y gracias al conocimiento de los mecanismos genéticos generadores de resistencias, así como al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular, ha sido posible desarrollar en los últimos años una nueva serie de técnicas enfocadas al diagnóstico de drogorresistencia a drogas antituberculosas, buscando aquellas con alta sensibilidad y especificidad, que al mismo tiempo sean rápidas y de bajo costo. En términos generales, se ha establecido una clasificación de estos métodos; en fenotípicos, considerando el cultivo microbiológico de la muestra a diagnosticar; y genotípicos, basados en el empleo de ADN de micobacterias provenientes de la muestra (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).

10.1 Métodos fenotípicos

Estos métodos evalúan la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de antibióticos para distinguir entre las cepas susceptibles y las resistentes. Esta clase de métodos son los empleados en la rutina de los laboratorios de micobacteriología clínica. Una desventaja son los largos períodos de tiempo que necesitan para emitir resultados (Martin y Portaels, 2007).

✪ Método proporcional de Canetti

En 1961 la OMS organizó una consulta internacional de especialistas en bacteriología de tuberculosis, como resultado de esta, Canetti y cols., describieron criterios y técnicas de pruebas confiables para la detección de resistencia micobacteriana a drogas antituberculosas. Desde entonces una experiencia considerable ha sido adquirida en el uso de las pruebas descritas y las nuevas drogas que han sido introducidas (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).

El método de las proporciones consiste en calcular la proporción de bacilos resistentes presentes en una cepa. Dos diluciones bacilares apropiadas, una alta y

una baja, son inoculadas en un medio que contiene droga y en un medio libre de droga, con el fin de proporcionar colonias numerables en ambos medios. La relación entre el número de colonias obtenidas en el medio que contiene droga con el número de colonias obtenidas en el medio libre de droga indica la proporción de bacilos resistentes presentes en la cepa. Por debajo de cierta proporción, la cepa es clasificada como sensible, por encima, como resistente (Canetti et al., 1969). Este método es considerado mundialmente el estándar de oro para la detección de resistencia a drogas antituberculosas. Las ventajas de este método son la alta reproducibilidad, la elevada correlación clínica y su bajo costo (American Thoracic Society, 2000).

Existen dos variantes del método de las proporciones: la variante simplificada y la variante estándar. La variante simplificada es la indicada para la práctica actual: con los criterios adoptados, su uso bajo adecuadas condiciones técnicas causa un porcentaje casi insignificante de cepas sensibles clasificadas equivocadamente como resistentes, y una proporción muy pequeña de cepas resistentes de ser erróneamente clasificadas como sensibles. La variante estándar, requiere una amplia gama de medios con drogas y mayor trabajo, debe usarse solamente en laboratorios altamente especializados en pruebas de sensibilidad (Canetti et al., 1969).

Variante simplificada

El medio de Löwenstein-Jensen es utilizado para todas las pruebas de resistencia. Los recipientes usados son de 17mm x 170mm y contienen 7ml del medio. Las drogas, disueltas en agua destilada, son incorporadas en el medio antes de la coagulación. El medio control sin drogas es preparado al mismo tiempo que el medio que contiene drogas (Canetti et al., 1969).

La concentración empleada para cada droga es única. Las concentraciones son (Canetti et al., 1969):

Tabla 1. Concentraciones de droga en medio Löwenstein-Jensen modificado

Isoniacida	0.2 µg/ml
Estreptomicina	4 µg/ml
PAS	0.5 µg/ml
Tioacetazona	2 µg/ml
Etionamida	20 µg/ml
Kanamicina	20 µg/ml
Cicloserina	30 µg/ml
Viomicina	30 µg/ml
Capreomicina	20 µg/ml
Pirazinamida	100 µg/ml
Etambutol	2 µg/ml
Rifampicina	40 µg/ml

Con una espátula, se toma una muestra representativa (5mg-10mg) del cultivo primario y se coloca en un matraz esférico de fondo plano que contenga 30 cuentas de vidrio de 3mm de diámetro. El matraz es agitado durante 20-30 segundos; 5ml de agua destilada son agregados lentamente en agitación continua. La opacidad de la suspensión bacteriana se ajusta por la adición de agua destilada a la de una suspensión estándar que contiene 1mg/ml de bacilos tuberculosos (o BCG) (Canetti et al., 1969), o tubo 0.5 en escala de McFarland (1.5×10^8 células/ml), siendo este último el modo habitual en nuestros días (Blanco, 2011).

Los resultados son leídos por primera vez el día 28. Se contabilizan solo las colonias de los tubos sembrados con el inóculo que ha producido menor crecimiento. El número promedio de colonias obtenido para el tubo que contiene la droga indica el número de bacilos resistentes que contiene el inóculo. La proporción entre la segunda cifra y la primera indica la proporción de bacilos resistentes existentes en la cepa. Por debajo de cierta proporción (la proporción crítica) la

cepa es clasificada como sensible; por encima de ésta, como resistente. Las proporciones son reportadas en porcentajes (Canetti et al., 1969).

Si de acuerdo a los criterios indicados antes, el resultado de la lectura hecha el día 28 es “resistente”, no se requiere una lectura posterior de la prueba para la droga: la cepa es clasificada como resistente. Si el resultado en el día 28 es “sensible”, se realiza una segunda lectura el día 42, esto proporciona el resultado definitivo (Canetti et al., 1969).

Cualquier cepa que presente una proporción igual o superior a la que se indica a continuación, es clasificada como resistente a la droga correspondiente (Canetti et al., 1969):

Tabla 2. Proporción crítica de resistencia antibiótica

Antibiótico	Concentración (µg/ml)	Proporción crítica para resistencia (%)
Isoniacida	0.2	1
Estreptomicina	4	10
PAS	0.5	1
Tioacetazona	2	10
Etionamida	20	10
Kanamicina	20	10
Cicloserina	30	10
Viomicina	30	10
Capreomicina	20	10
Pirazinamida	100	10
Etambutol	2	10
Rifampicina	40	1

Para el cálculo de la proporción de bacilos resistentes, el título más alto obtenido en el medio libre de drogas y en el que contiene drogas debe ser tomado,

independientemente de que este número se obtenga en el día 28 o el 42 (Canetti et al., 1969).

Variante estándar

El procedimiento es igual que para la variante simplificada, la única diferencia consiste en el mayor número de concentraciones de drogas probadas. Las dos o tres concentraciones de drogas que son empleadas se muestran en la siguiente tabla (Canetti et al., 1969).

Tabla 3. Proporción crítica de resistencia de acuerdo a cada concentración de droga

Droga	Concentración (µg/ml)	Proporción crítica de resistencia (%)
Isoniazida	0.1	1
	0.2	1
	1	0.1
Estreptomicina	4	10
	8	0.1
PAS	0.25	10
	0.5	1
	1	0.1
Tioacetazona	1	50
	2	10
	4	1
Etionamida	10	50
	20	10
	40	1
Kanamicina	10	50
	20	10
	30	1

Cicloserina	20	50
	30	10
	40	1
Viomicina	20	50
	30	10
	40	1
Capreomicina	20	10
	40	1
Pirazinamida	50	50
	100	10
	400	1
Etambutol	1	50
	2	10
	3	1
Rifampicina	20	10
	40	1

La fórmula para medir la resistencia es la siguiente:

$$\% \text{ Resistencia} = \frac{\text{número de colonias de tubo con antibiótico}}{\text{número de colonias de tubo control}} \times 100$$

Los resultados se leen por primera vez el día 28. El procedimiento del conteo de colonias y el cálculo de la proporción de bacilos resistentes a una droga determinada es el mismo que para la variante simplificada. Sin embargo, para los tubos con drogas, el conteo en el día 28 puede ser limitado a aquellos que contienen la concentración principal de droga. Si el resultado es “resistente”, la cepa es clasificada como tal, sin lecturas posteriores de la prueba. Si el resultado es “sensible”, la prueba se lee de nuevo el día 42 (Canetti et al., 1969).

En el día 42 las colonias son contadas primero en los tubos sin droga y en los que contienen la concentración principal de droga. Para el cálculo de la proporción de bacilos resistentes el conteo más alto obtenido en el medio libre de drogas y el medio que contiene drogas debe ser elegido, independientemente de la fecha en que se obtuvo el conteo. Si el resultado es “resistente”, no es necesario el conteo con las otras concentraciones de drogas, la cepa es clasificada como resistente. Si el resultado para la concentración principal de drogas es “sensible”, las colonias de las concentraciones secundarias de drogas también son contadas, y los criterios correspondientes de resistencia son aplicados para la clasificación definitiva de la cepa (Canetti et al., 1969).

Los criterios de resistencia para las concentraciones secundarias de droga pueden ser un poco menos confiables que para la concentración principal de droga. En consecuencia, si el criterio aplicado bajo las condiciones especificadas indica “resistencia” para las dos concentraciones secundarias de droga, la cepa es definitivamente clasificada como resistente. Si éstas indican “resistencia” para sólo una concentración secundaria de droga, la cepa es probada nuevamente. Si, en la segunda prueba, el criterio de nuevo indica “resistencia” para una concentración secundaria de droga (o para ambas, o para la concentración principal de droga), la cepa es definitivamente clasificada como resistente. Si no indica resistencia a la concentración secundaria (ni a la concentración principal) la cepa es clasificada como sensible (Canetti et al., 1969).

Sin embargo, para INH y STR, las cepas que muestran resistencia a una de las concentraciones secundarias son clasificadas como resistentes sin una prueba posterior (Canetti et al., 1969).

✪ Sistema radiométrico BACTEC-460

El sistema radiométrico BACTEC-460, comercializado por Becton Dickinson, fue el primer, y por muchos años el único, sistema automatizado de detección

radiométrica aplicado al diagnóstico de tuberculosis; está basado en el método de las proporciones. En la actualidad ha caído en desuso en la mayoría de los programas nacionales de control de tuberculosis (Garcia e Isenberg, 2007). El sistema automatizado BACTEC consiste en el sembrado de los bacilos previamente cultivados en un medio líquido Middlebrook, rico en ácido palmítico con carbono 14 (C^{14}). El C^{14} es un isótopo radioactivo natural que emite radiaciones beta, de manera que cuando las micobacterias metabolizan el ácido palmítico liberan al medio ambiente dicho isótopo en forma de CO_2 , marcado con C^{14} . Este CO_2 es aspirado y llevado a una cámara de ionización, en donde se transforma en una corriente eléctrica que se cuantifica y es proporcional a la cantidad de bacilos que se encuentran en crecimiento, es decir la señal eléctrica se expresa como índice de crecimiento. En cuanto al diagnóstico de resistencia, se emplean frascos con medio de cultivo, en los cuales se inocula la cepa a estudiar y se agrega la droga antituberculosa a evaluar, de modo que la emisión de radioactividad en un medio de cultivo con determinada droga, significa que el bacilo se está multiplicando y por tanto es resistente. Este sistema presenta sensibilidad y especificidad superiores al 90%. Entre sus inconvenientes se encuentran el generar desperdicios radioactivos, la importante inversión inicial en la compra de equipo, reactivos y materiales, y la necesidad de personal altamente capacitado (Nava y Prieto, 2007).

★ Sistema BACTEC MGIT 960 (Tubo Indicador de Crecimiento Micobacteriano)

El sistema BACTEC MGIT 960, comercializado por Becton Dickinson, sustituye al sistema BACTEC 460 y, aunque fue propuesto hace más de 10 años, forma parte de la “nueva generación” de herramientas en el diagnóstico de la tuberculosis (Palomino, 2006). Está basado en la detección de fluorescencia por el crecimiento micobacteriano en un tubo que contiene el medio Middlebrook 7H9 modificado, la propiedad fluorescente se encuentra en un compuesto sensible al oxígeno que está contenido en un tapón de silicona ubicado en el fondo del tubo (Sierra et al., 2008).

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 (Miranda et al., 2008). Los tubos son incubados y controlados dentro del aparato, un tubo contiene algún antibiótico y se compara con un tubo libre de antibiótico. El sistema BACTEC MGIT 960 constantemente monitorea los tubos para detectar algún incremento en la fluorescencia. Los análisis de fluorescencia del tubo que contiene el antibiótico se comparan con la fluorescencia del tubo control de crecimiento y se usa para determinar los resultados de susceptibilidad. El sistema BACTEC MGIT 960 automáticamente interpreta estos resultados y los reporta como cepa susceptible o resistente (Garcia e Isenberg, 2007).

Existen varios estudios publicados sobre la aplicación del sistema BACTEC MGIT 960 para la detección rápida de resistencia a drogas antituberculosas de primera y segunda línea. En todos estos estudios, el sistema BACTEC MGIT 960 ha mostrado muy buenos resultados teniendo una gran correlación con el método de las proporciones. Recientemente, FDA aprobó al sistema BACTEC MGIT 960 para la detección de drogoresistencia para drogas de primera línea (Martin y Portaels, 2007).

Al compararlo con el sistema BACTEC 460 tiene la ventaja de evitar la producción de desechos radioactivos; no obstante, mantiene varias de sus desventajas como requerir personal capacitado y altos costos de inversión en equipo, materiales y reactivos (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).



Figura 7. Tubos MGIT que muestran una reacción positiva y negativa a cepa resistente (Martin y Portaels, 2007).

Balabanova y cols., analizaron la viabilidad, costo y desempeño del sistema BACTEC MGIT 960 y de ensayos moleculares para el diagnóstico tuberculosis y pruebas de susceptibilidad a drogas (INH y RIF) comparados con el método de las proporciones. 698 pacientes (2487 muestras de esputo) con factores de riesgo de tuberculosis drogorresistente fueron recolectadas. Las tasas de cultivo positivo del complejo *M. tuberculosis* fueron 31.6% (787/2487) en el sistema BACTEC MGIT 960 y 27.1% (675/2487) en medio de Löwenstein-Jensen (90.5% y 83.2% para muestras con baciloscopía positiva). En total, 809 cultivos del complejo *M. tuberculosis* fueron aislados por alguno de los métodos. El tiempo medio de detección fue de 14 días para el sistema BACTEC MGIT 960 y de 36 días en medio de Löwenstein-Jensen. Las pruebas de susceptibilidad a drogas mostró buena concordancia entre el método de las proporciones y el sistema BACTEC MGIT 960 (96.8% para RIF y 95.6% para INH). Los resultados del ensayo de hibridación molecular correlacionaron bien con los resultados de las pruebas de susceptibilidad a drogas con el sistema BACTEC MGIT 960, aunque los ensayos moleculares generalmente producen tasas más altas de resistencia (aproximadamente 3% tanto para INH como para RIF) (Balabanova et al., 2009).

El-Sayed y Goda, realizaron un estudio en el que evaluaron el desempeño de pruebas para susceptibilidad a las drogas de primera línea con el sistema BACTEC MGIT 960 y el ensayo de amplificación de fagos FAST-plaque TB-MDR y los compararon con el sistema radiométrico BACTEC 460. Este estudio se llevó a cabo en 84 muestras de esputo con baciloscopía positiva. Las muestras de esputo fueron sometidas a cultivo y pruebas de susceptibilidad a drogas por el sistema BACTEC 460. Las muestras también fueron analizadas mediante pruebas directas de susceptibilidad a INH, RIF, EMB y STR con el sistema BACTEC MGIT 960. Los aislados sensibles y resistentes a RIF fueron estudiados posteriormente con el ensayo FAST-plaque TB-MDR. El patrón más común de resistencia mediante el sistema BACTEC 460 fue para INH (32%) seguido por RIF (24%) ya sea solos o en combinación con otras drogas. La resistencia a múltiples drogas fue de 20%. La concordancia entre el sistema BACTEC 460 y el sistema BACTEC MGIT 960 en pruebas directas fue 100% para INH y EMB, 91.7% para RIF, 80% para STR y 90% para cepas MDR. FAST-plaque TB-MDR detectó correctamente todas las cepas resistentes a RIF y 97.2% de las cepas sensibles. De acuerdo a los resultados, el sistema BACTEC MGIT 960 puede determinar con precisión la resistencia a las drogas de primera línea y FAST-plaque TB-MDR a RIF (El-Sayed y Goda, 2007).

★ Método de detección de microcolonias

El método de detección de microcolonias también es conocido como observación microscópica de droga-sensibilidad (MODS, siglas en inglés), fue ideado en la década de los 60 (Welch et al., 1993). Está basado en la observación de la característica de formación cordonal de *M. tuberculosis*, que es visualizada microscópicamente en medio líquido y con el uso de un microscopio invertido. En un estudio realizado se observó que la concordancia entre MODS y el método de las proporciones es de 97% para INH, 100% para RIF, y 99% para INH y RIF combinados (tuberculosis MDR). Los valores fueron más bajos para EMB (95%) y STR (92%). Una de las mayores desventajas de MODS es que se requiere invertir

en el microscopio para la observación del crecimiento micobacteriano (Moore et al., 2006).

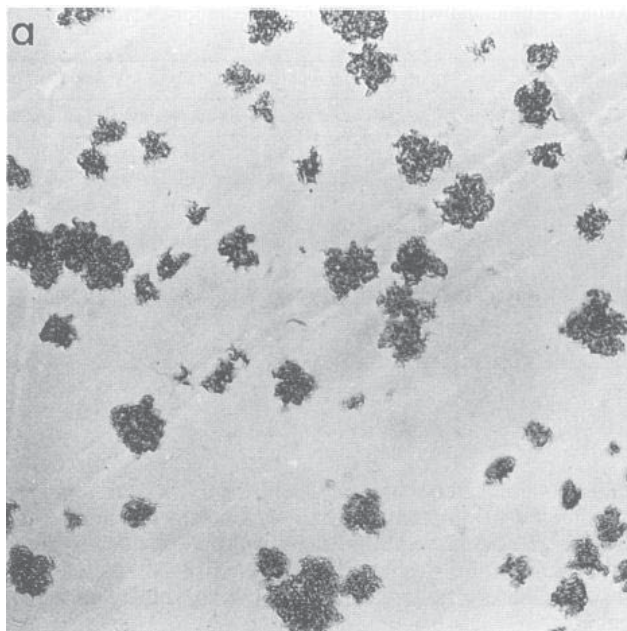


Figura 8. Colonia de *Mycobacterium tuberculosis* examinadas a 100x a los diez días de edad (Martin y Portaels, 2007).

Ejigu y cols., compararon el ensayo MODS con el sistema BACTEC MGIT 960 para detección de resistencia a RIF e INH en *M. tuberculosis*. Se usaron 58 muestras de esputo con baciloscopía y cultivo positivos. Para la detección de tuberculosis MDR, el ensayo MODS tuvo sensibilidad de 95% y especificidad de 100%. Los resultados fueron obtenidos en un promedio de 9 días con MODS, y las pruebas indirectas con el sistema BACTEC MGIT 960 se obtuvieron en promedio de 8 días (Ejigu et al., 2008).

Shiferaw y cols., evaluaron la eficacia en la detección de resistencia a RIF e INH del ensayo MODS aplicado directamente en muestras de esputo. Fueron recolectadas 262 muestras con baciloscopía positiva. De las 262 muestras, MODS detectó 254 (96.9%) y el cultivo de Löwenstein-Jensen detectó 247 (94.3%). Para los 247 cultivos, la sensibilidad y especificidad de MODS para la detección de tuberculosis MDR fue de 92.0% y 99.5%, respectivamente, usando el método de

las proporciones como referencia, obteniendo una concordancia de 98.8%. Los resultados de MODS fueron obtenidos en un promedio de 9 días (Shiferaw et al., 2007).

✪ Métodos basados en fagos

Las dos técnicas basadas en micobacteriófagos usadas actualmente son la amplificación biológica de fagos y la identificación de fagos reporteros de luciferasa (LRP, siglas en inglés) (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).

La amplificación biológica de fagos emplea el micobacteriófago D29, virus ADN, que tiene la habilidad de infectar micobacterias de crecimiento lento y de crecimiento rápido como ***M. tuberculosis*** y ***Mycobacterium smegmatis*** (***M. smegmatis***), respectivamente. Este fago es capaz de replicarse en el interior de estas micobacterias (David et al., 1980). La replicación del fago se ve afectada cuando se emplean drogas antituberculosas, por lo que la exposición de una cepa de ***M. tuberculosis*** sensible a la droga y luego de ser infectada con el micobacteriófago D29 no dará lugar a la replicación de fagos, mientras que una cepa resistente infectada continuará su replicación y provocará la lisis de la pared celular y la liberación de la nueva progenie de fagos. En el ensayo los fagos exógenos son inactivados por tratamiento químico mientras que el número de fagos endógenos, el cual es un indicador del número de células de ***M. tuberculosis*** viables, es determinado después de ciclos de infección, replicación y liberación en una placa indicadora que contiene a ***M. smegmatis***. Los resultados se obtienen en 24-48 horas a través de la aparición de zonas claras o de lisis (McNerney et al., 2004).

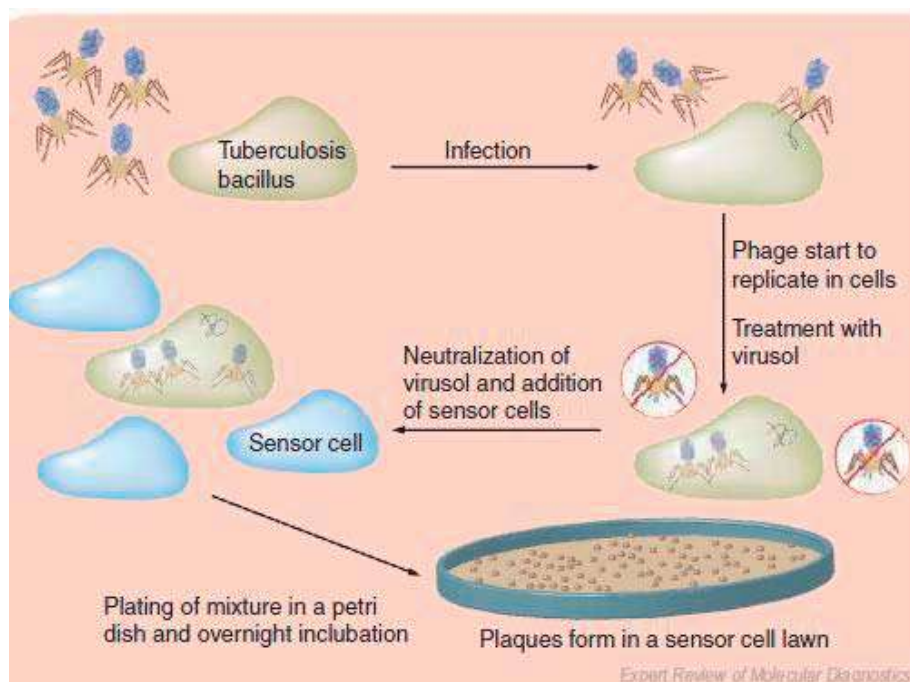


Figura 9. Amplificación biológica de fagos para detección de *Mycobacterium tuberculosis* y rápida detección de drogoresistencia (Pai et al., 2006).

Los laboratorios Biotec (Biotec Laboratories, Ltd. Reino Unido) desarrollaron un sistema comercial para la detección de *M. tuberculosis* con resistencia a RIF llamado FASTplaqueTB-Rif assay, puede emplearse tanto en aislados de *M. tuberculosis* como directamente en muestras clínicas (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010).



Figura 10. Placa con zonas de lisis, cepa resistente (Martin y Portaels, 2007).

La identificación de LRP es un procedimiento basado en el principio de emisión de luz debido a una actividad enzimática. Se emplea la enzima luciferasa aislada de una variedad de luciérnagas, cuyo gen ha sido clonado en los bacteriófagos L5 y phAE88. Estos funcionan como un vehículo para introducir la mencionada enzima dentro de la célula sin recurrir a la lisis celular. El principio de este método es la detección de fotones liberados por reacciones dependientes de trifosfato de adenosina (ATP), metabolito muy ligado a la actividad vital de la célula y que en ambientes desfavorables, como es presencia de antibióticos, se ve afectada su producción; por lo tanto las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la droga sobrevivirán y serán detectadas fácil y rápidamente mediante la cuantificación de fotones con un luminómetro (Schluger, 2001).

La realización de ambos métodos es muy complicada y su costo elevado no permite su implementación en la rutina de los laboratorios de micobacteriología clínica.

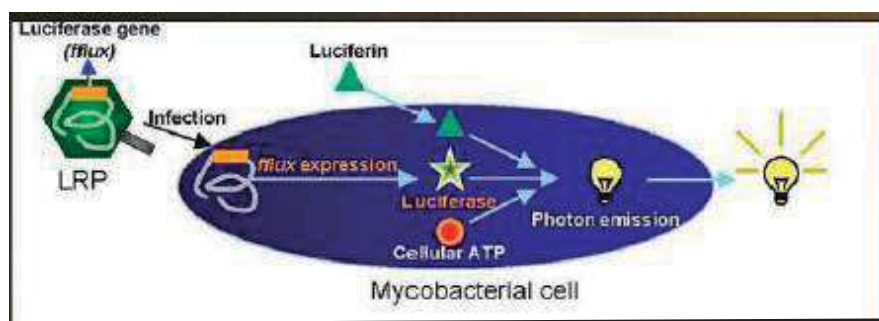


Figura 11. Técnica de fagos reporteros de luciferasa (Hazbón, 2004).

Chauca y cols., realizaron un estudio en el que evaluaron la precisión diagnóstica de una prueba rápida (3-4 días) y de bajo costo basada en el uso de micobacteriófago D29 para determinar la susceptibilidad de cepas de *M. tuberculosis* a RIF e INH. Los resultados obtenidos mostraron que las pruebas de susceptibilidad para RIF tuvieron una alta precisión diagnóstica (sensibilidad 100% y especificidad 98%) comparada con el método de las proporciones. Teniendo en cuenta la asociación entre la resistencia a RIF e INH, que definen la tuberculosis

MDR, esta prueba parece adecuada para la rápida detección de cepas de tuberculosis MDR. Las pruebas de susceptibilidad para INH usando micobacteriófago D29 tuvieron una menor precisión diagnóstica (sensibilidad 80.4% y especificidad 80.8%) comparada con el método de las proporciones; la utilidad de la prueba sería limitada en el manejo de pacientes con tuberculosis (Chauca et al., 2007).

Hazbon y cols., compararon dos métodos de detección, fotográfico y luminométrico, de LRP para pruebas de susceptibilidad de *M. tuberculosis* contra las drogas de primera línea. La sensibilidad para la detección de resistencia a RIF e INH fue del 100%, concluyendo que ambos métodos eran apropiados para pruebas de detección para la vigilancia de tuberculosis MDR (Hazbon et al., 2003).

Banaiee y cols., probaron la utilidad de LRP para la detección, identificación y susceptibilidad antibiótica de *M. tuberculosis* en un laboratorio de microbiología clínica en la ciudad de México. 523 muestras consecutivas de esputo recibidas en el laboratorio durante un período de 5 meses fueron incluidas en este estudio. Estas muestras fueron cultivadas en medios de Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H9 y MGIT. De los 71 aislados de micobacterias recuperados con alguno de los tres medios, 76% fueron detectados con LRP, 97% con el sistema BACTEC MGIT 960, y 90% con medio de Löwenstein-Jensen. El tiempo medio de detección con LRP y el sistema BACTEC MGIT 960 fue de 7 días. La precisión y velocidad de LRP en las pruebas de susceptibilidad a RIF, INH, STR y EMB fueron comparadas con el sistema BACTEC 460, y los resultados discrepantes se verificaron con el método de las proporciones. Un total de 50 aislados del complejo *M. tuberculosis* fueron probados. La concordancia global de resultados entre LRP y el sistema BACTEC 460 fue de 98.5%. La mediana del tiempo de respuesta de LRP para pruebas de susceptibilidad fue de 2 días (rango 2-4 días) comparada con el sistema BACTEC 460 que se llevó 10.5 días (rango 7-16 días). Las pruebas basadas en micobacteriófagos pueden ser implementadas en laboratorios clínicos, teniendo

sensibilidad, especificidad y rapidez comparadas favorablemente con el sistema BACTEC MGIT 960 (Banaiee et al., 2001).

Albert y cols., evaluaron la rápida detección de resistencia a RIF en pacientes con tuberculosis previamente tratados usando esputo con baciloscopia positiva mediante la prueba Fastplaque-Response. La capacidad de resistencia a RIF de predecir tuberculosis MDR también fue determinada. El método de las proporciones fue usado como referencia. La sensibilidad y especificidad de Fastplaque-Response para determinación de resistencia a RIF fue de 95.4% y 97.2%, respectivamente. La mayoría (95.5%) de cepas resistentes a RIF eran cepas MDR (Albert et al., 2007).

10.1.1 Métodos Colorimétricos

Los métodos colorimétricos están basados en la reducción de un indicador redox coloreado que se agrega al medio de cultivo después de que *M. tuberculosis* ha sido expuesta *in vitro* a diferentes antibióticos. La resistencia es detectada por un cambio en el color del indicador, el cual es directamente proporcional al número de micobacterias viables en el medio (Palomino, 2006).

✧ Método de la nitrato reductasa

El ensayo de nitrato reductasa (NRA) forma parte de la batería de pruebas bioquímicas para la identificación de especies en un laboratorio de Micobacterias (Koneman et al., 2008).

En 1996 se reportó por primera vez el ensayo de la nitrato reductasa en la detección de resistencia en *M. tuberculosis* (Golyshevskaya et al., 1996). Esta técnica es muy simple y está basada en la capacidad de *M. tuberculosis* de reducir nitratos a nitritos, lo cual es detectado por la adición de un reactivo químico al medio de cultivo. *M. tuberculosis* se cultiva en presencia de un antibiótico y su

capacidad para reducir nitrato, es medida después de 10 días de incubación. Las cepas resistentes reducirán el nitrato que se observará por un color rosa-rojo en el medio, mientras que las cepas susceptibles perderán esta capacidad ya que son inhibidas por el antibiótico. Además tiene la ventaja de utilizar el mismo formato y medio de cultivo que en el método de las proporciones. Un reciente estudio multicéntrico evaluó la realización de NRA para detectar resistencia a drogas de primera línea. La prueba resultó muy bien para INH, RIF y EMB con una precisión entre 96.6 y 98%; sin embargo los valores más bajos fueron obtenidos para STR (Palomino, 2006).

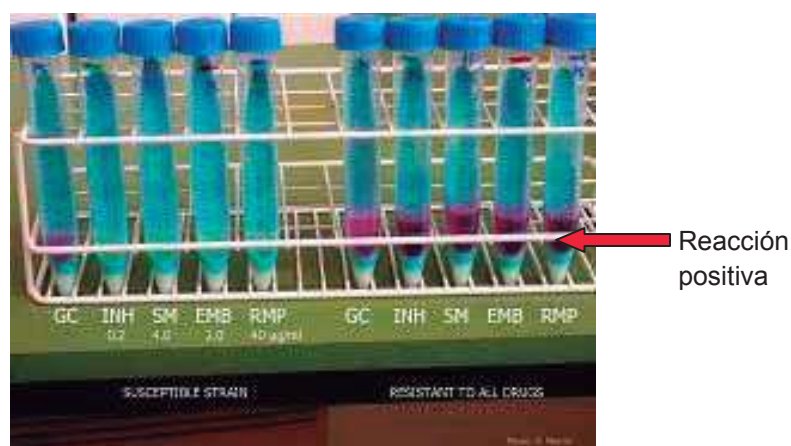


Figura 12. Ensayo de la Nitrato Reductasa mostrando cepa sensible y cepa resistente (Martin y Portaels, 2007).

Bwanga y cols., compararon diferentes pruebas de susceptibilidad a drogas (RIF e INH) en áreas de recursos limitados. 31 cepas de *M. tuberculosis* fueron probadas con el ensayo de NRA, MODS, sistema BACTEC MGIT 960, Genotype MTBDRplus, Alamar azul, MTT y ensayo de resazurina. El método de las proporciones fue usado como referencia. NRA identificó correctamente las cepas resistentes teniendo sensibilidad y especificidad de 100%. El sistema BACTEC MGIT 960 identificó todas las cepas MDR pero omitió una cepa resistente a RIF. Genotype MTBDRplus detectó todas las cepas resistentes a RIF pero la sensibilidad para la detección de resistencia a INH fue menor (88%). MODS alcanzó una sensibilidad y especificidad de 86% a 100%, y para Alamar azul, MTT

y el ensayo de resazurina los valores fueron de 57% a 100%. Este estudio mostró que NRA, el sistema BACTEC MGIT 960 y Genotype MTBDRplus ofrecen excelentes resultados en la detección de tuberculosis MDR, sin embargo el ensayo de NRA es el más económico y por lo tanto el que es más conveniente aplicar en países con recursos limitados (Bwanga et al., 2010).

Martin y cols., realizaron un meta-análisis para evaluar la precisión del ensayo NRA para la detección de tuberculosis resistente a RIF e INH. 15 estudios cumplieron con los criterios de inclusión para detección de resistencia a RIF y 13 para INH. De estos, la mayoría usaron aislamientos de cultivo en medio sólido, 4 usaron aislamientos de cultivo en medio líquido y 3 usaron muestras de esputo. Para RIF la mayoría de los estudios que usaron aislamientos, obtuvieron una sensibilidad y especificidad >94% y para INH >92%. Los 3 estudios que aplicaron NRA directamente en muestras de esputo tuvieron una sensibilidad y especificidad que osciló entre 88% y 100%. Esta evidencia demuestra que NRA es altamente sensible y específico para la rápida detección de resistencia a INH y RIF en aislamientos de cultivo. Se requieren más estudios sobre la aplicación de NRA directamente en muestras de esputo, pero los resultados preliminares parecen ser prometedores pues muestran buena sensibilidad y especificidad (Martin et al., 2008).

★ Ensayo de la rezasurina

El Alamar azul fue el primer método colorimétrico empleado en la detección de resistencia en *M. tuberculosis*, sin embargo después de varios estudios se identificó a la resazurina como el principal componente del Alamar azul. La resazurina es un indicador de óxido-reducción, es azul en su estado oxidado pero cambia a rosa cuando es reducido, por lo tanto cuando se observa el viraje de color en la microplaca significa que hay crecimiento bacteriano. El ensayo de resazurina permite obtener la detección rápida de multidrogorresistencia en aislados de *M. tuberculosis* con una precisión de 97% comparada con el método de las

proporciones en el medio Löwenstein-Jensen. El ensayo de resazurina también es muy útil para detectar resistencia a otras drogas antituberculosas como la PZA e incluso drogas de segunda línea como las fluoroquinolonas. Esta técnica es rápida y poco costosa por lo que se recomienda para su implementación en países de bajos recursos (Martin et al., 2007).

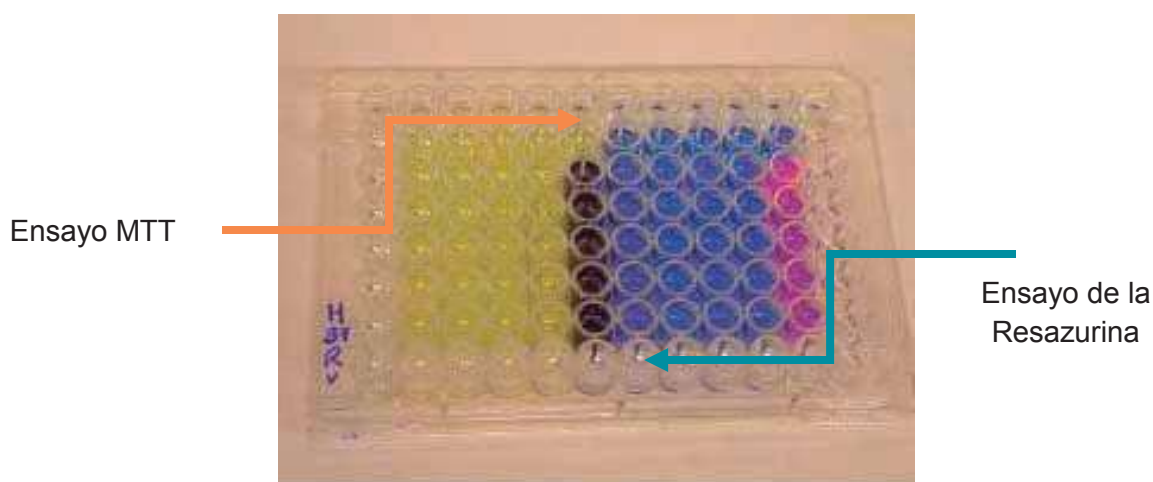


Figura 13. Microplaca que muestra ensayos de MTT y ensayo de la Resazurina (Martin y Portaels, 2007).

Rivoire y cols., evaluaron la viabilidad y desempeño del ensayo de resazurina como prueba indirecta de detección de resistencia a RIF e INH en cepas de *M. tuberculosis*. Los resultados se compararon con el método de las proporciones. Se estudiaron 77 cepas y la sensibilidad y susceptibilidad fueron de 95% y 97.3%, respectivamente, para detección de resistencia a INH, y 95% y 100% para RIF. Para la identificación de cepas MDR la sensibilidad fue 89% y la especificidad 100% (Rivoire et al., 2007).

Nateche y cols., evaluaron 136 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* para detección de resistencia a INH y RIF mediante el ensayo de resazurina y los resultados fueron comparados con el método de las proporciones. Se obtuvieron excelentes resultados, sensibilidad de 100% tanto para INH como para RIF y especificidad de 98.3% y 99.2%, respectivamente. El ensayo de resazurina es un

método confiable y rápido para la determinación de tuberculosis MDR y es una buena alternativa para su uso en países de recursos limitados (Nateche et al., 2006).

Martin y cols., evaluaron 150 aislamientos de *M. tuberculosis* para detectar resistencia a drogas de segunda línea, ETH, KNM, CPR, ofloxacina y PAS mediante el ensayo de resazurina y el método de las proporciones. De los 150 aislamientos, 31 fueron resistentes a ETH, 29 a KNM, 9 a PAS, 8 a ofloxacina y 19 a CPR, mediante el método de las proporciones. El ensayo de resazurina alcanzó una especificidad de 100% para las 5 drogas, y la sensibilidad osciló de 96.8% a 100%, para CPR la sensibilidad fue de 84.2%. Este estudio fue el primero realizado en detección de resistencia a drogas de segunda línea y la precisión y concordancia del ensayo de resazurina logró muy buenos resultados (Martin et al., 2003).

✪ Microensayo MTT

Este ensayo colorimétrico fue introducido por Mossman en 1983 como una medida cuantitativa de la supervivencia y proliferación de células mamíferas, posteriormente lo utilizó para detectar la viabilidad de bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, y en 1998, Abate y cols., lo emplearon por primera vez para la detección de resistencia a RIF en *M. tuberculosis* (Abate et al., 1998).

En el ensayo se usa sal de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio o MTT, un compuesto amarillo que, cuando es reducido por la deshidrogenasa mitocondrial de células vivas, produce cristales púrpuras insolubles (formazán) que puede ser medido con un espectrofotómetro después de la solubilización, la cantidad formada de formazán es proporcional al número de micobacterias vivas en la muestra. Con el propósito de propagar la detección de drogoresistencia en muestras clínicas, MTT también ha sido aplicada como prueba

directa en muestras de esputo para detección de resistencia a RIF. La sensibilidad y especificidad de esta prueba directa de MTT coincidían con las pruebas indirectas de drogossensibilidad estándar en agar 7H10 con 98.5% de las muestras dando la interpretación de los resultados en dos semanas (Martin y Portaels, 2007). Esta prueba es económica por lo que puede emplearse en países de bajos recursos (Abate et al., 1998).

Ferrari y cols., evaluaron el desempeño del microensayo MTT comparado con el sistema BACTEC MGIT 960 para detección de resistencia. La prevalencia de resistencia en *M. tuberculosis* fue de 6.7%. La MDR, la resistencia a INH y a STR representaron el 1%, 3.8% y 3.8% de toda la resistencia, respectivamente, y todos los aislamientos fueron susceptibles a EMB. De los 119 aislamientos de *M. tuberculosis*, se observó una total concordancia de los resultados obtenidos para INH y EMB entre el microensayo MTT y el sistema BACTEC MGIT 960. La concordancia para RIF fue 99% (sensibilidad 90%) y 95.8% para STR (sensibilidad 90.9%), menores que para las otras drogas (Ferrari et al., 2010).

Foongladda y cols., evaluaron el microensayo MTT para pruebas de susceptibilidad a RIF e INH en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y los resultados fueron comparados con el método de las proporciones. Se obtuvieron valores altos de especificidad y sensibilidad, 100% y 94.1%, respectivamente, para RIF, y 99.5% y 89.2%, respectivamente, para INH (Foongladda et al., 2002).

Montoro y cols., evaluaron el desempeño de 3 métodos de bajo costo para la detección de resistencia a las drogas de primera línea en *M. tuberculosis*. 100 aislamientos clínicos fueron probados mediante el ensayo NRA, el microensayo MTT y el ensayo de resazurina y los resultados fueron comparados con el método de las proporciones. Los 3 métodos mostraron una sensibilidad y especificidad entre 94% y 100% para la detección de resistencia a RIF e INH. La especificidad para EMB y STR usando MTT y resazurina fueron más bajos (58-89%). En

contraste, NRA mostró una buena concordancia para todas las drogas de primera línea (Montoro et al., 2005).

10.2 Métodos genotípicos

La aplicación de estos métodos ha sido posible, entre otras cosas, gracias a la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, y a la identificación y caracterización de genes asociados a drogoresistencia, así como al desarrollo de la tecnología. Estos métodos ofrecen la posibilidad de identificar mutaciones asociadas a tuberculosis farmacorresistente de forma precisa y generar resultados a partir de 100 bacilos o menos por muestra. Quizá lo más importante es que permiten realizar el diagnóstico en cuestión de horas, ya que al utilizar la muestra clínica directamente como material biológico, se elimina el tiempo relacionado con el crecimiento del bacilo (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas, 2010). En todas las técnicas moleculares el primer paso es la extracción del material genético y a partir de la muestra clínica o de la muestra obtenida en medio sólido (Palomino, 2009):

★ Reacción en Cadena de la Polimerasa en punto final (PCR)

PCR es una técnica de biología molecular, desarrollada en 1986 por Kary Mullis, que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN. La técnica se basa en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a diferentes temperaturas y repetidas cíclicamente entre veinte y cuarenta veces: desnaturalización, alineamiento y extensión. Posteriormente, la secuencia amplificada puede ser detectada por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La amplificación de secuencias específicas de ADN micobacteriano mediante PCR ha sido utilizada en cultivo y directamente en muestras biológicas. Sin embargo, se han reconocido dos grandes obstáculos al éxito de la técnica: las dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción del ADN, y la presencia de inhibidores de PCR contenidos en la muestra clínica. La manipulación necesaria en la mayoría de los

protocolos de extracción del ADN descritos los hace propensos a la contaminación cruzada de las muestras; además, es necesario utilizar reactivos y procedimientos agresivos que eventualmente podrían conducir a la pérdida del genoma micobacteriano presente en la muestra. Otros factores que pueden afectar a la sensibilidad y especificidad de la técnica son la variabilidad biológica y la amplificación inespecífica (Cormican et al., 1992).

Esta técnica no es una herramienta ideal para el diagnóstico directo de muestras de ***M. tuberculosis*** en países en vías de desarrollo, pues su especificidad y sensibilidad no son satisfactorias (Suffys et al., 2000).

Morán y cols., realizaron un estudio en el que se compara la detección de ***M. tuberculosis*** mediante baciloscopia, cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y PCR realizada con ADN extraído directamente de distintos tipos de muestras. Se analizaron 252 muestras (114 de esputo, 96 de orina, 15 de líquido cefalorraquídeo y 27 de otros tipos) de 160 pacientes con sospecha de tuberculosis en cualquiera de sus formas. Tomando el cultivo como prueba de referencia, PCR proporcionó una sensibilidad de 92,3%, una especificidad de 78,7%, un valor predictivo positivo de 20,3% y un valor predictivo negativo de 99,4%. Al analizar únicamente las muestras de esputo, PCR directa proporcionó una sensibilidad de 90,9%, una especificidad de 89,5%, un valor predictivo positivo de 52,6% y un valor predictivo negativo de 98,7% (Morán et al., 2000).

Imperiale y cols., evaluaron la técnica PCR alelos múltiples específicos para detectar tuberculosis MDR y las principales mutaciones que confieren esta resistencia en aislamientos clínicos. En el estudio se incluyeron 193 aislamientos clínicos, 52.6% de los aislamientos resistentes a INH presentaron mutación en el gen *katG* (315), 28.1% en *inhA* y 3.0% en ambos. Para el gen *rpoB*, 60% de los aislamientos resistentes a RIF presentaron mutación en el codón 531, 17.5% en 526 y 2.5% en 516. Los resultados se compararon con la técnica de secuenciación de ADN, obteniendo 100% de concordancia para la detección del gen *katG* (315),

94.1% para *inhA*, y 97.8% para *rpoB*. La concordancia total entre ambos métodos fue de 98% (Imperiale et al., 2011).

❖ Secuenciación de ADN

Esta técnica es la más exacta dentro de los métodos genotípicos para la detección de resistencia en ***M. tuberculosis***; es precisa y confiable y se ha convertido en el estándar de referencia genotípica para la detección de mutaciones, sin embargo es demasiado costosa, por lo que se desarrollan nuevas técnicas con semejante precisión y a bajo costo (Palomino, 2006).

La secuenciación de ADN permite la ubicación concreta de la(s) mutación(es) y consiste en identificar y analizar la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN específico. Solo se requiere obtener el ADN de la cepa a estudiar, amplificar por PCR la región del gen de interés y este producto es analizado por un secuenciador automático, el cual finalmente presenta la sucesión de ácidos nucleicos. Para el caso de la detección de resistencia a drogas en micobacterias, es posible secuenciar el gen involucrado en dicho mecanismo, e identificar la mutación o mutaciones específicas mediante comparación con el gen de una cepa sensible. Sin embargo, las limitaciones de esta técnica son los altos costos del equipo, los materiales y reactivos que se requieren, y la necesidad de contar con personal altamente capacitado. Además no todos los mecanismos de drogoresistencia son completamente conocidos para todas las drogas involucradas. Pese a estas desventajas, varios estudios demuestran que la secuenciación es considerada la técnica de elección para la detección genotípica de resistencias en cepas de ***M. tuberculosis*** (Hazbón, 2004).

Campbell y cols., emplearon secuenciación de ADN para detectar resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea INH, RIF, PZA y EMB, y a las drogas de segunda línea AMK, CPR, KNM, ciprofloxacina y ofloxacina. Nueve loci fueron secuenciados: *rpoB* (para resistencia a RIF), *katG* e *inhA* (INH), *pncA* (PZA), *embB*

(EMB), *gyrA* (ciprofloxacina y ofloxacina), y *rrs*, *eis*, y *tlyA* (kanamicina, amikacina y capreomicina). Se analizaron un total de 314 aislados clínicos del complejo *M. tuberculosis* que representan una variedad de patrones de resistencia antibiótica, genotipos y orígenes geográficos. La información molecular se comparó con la información fenotípica y los valores de precisión fueron calculados. Los valores de sensibilidad y especificidad para los loci de las drogas de primera y segunda línea fueron 97.1% y 93.6% para *rpoB*, 85.4% y 100% para *katG*, 16.5% y 100% para *inhA*, 90.6% y 100% para *katG* e *inhA* juntos, 84.6% y 85.8% para *pncA*, 78.6% y 93.1% para *embB*, 81.6% y 97.7% para *gyrA*, 57.7% y 99.0% para *rrs* (kanamicina), 90.0% y 98.8% para *rrs* (amikacina), 55.1% y 88.6% para *rrs* (capreomicina), 28.8% y 97.0% para *eis*, 10.1% y 98.8% para *tlyA*. El tamaño y alcance de este estudio en el número de loci y aislamientos examinados, y la diversidad fenotípica de estos aislamientos apoya el uso de la secuenciación de ADN para detectar la resistencia a las drogas en el complejo *M. tuberculosis* (Campbell et al., 2011).

Sekiguchi y cols., desarrollaron un método basado en secuenciación de ADN para detectar mutaciones en el genoma de *M. tuberculosis* drogorresistente. Ocho regiones del genoma asociadas con drogorresistencia, incluyendo *rpoB* para RIF, *katG* y el promotor *mabA(fabG1)-inhA* para INH, *embB* para EMB, *pncA* para PZA, *rpsL* y *rrs* para STR, y *gyrA* para levofloxacina, fueron amplificadas simultáneamente por PCR, y las secuencias de ADN fueron determinadas. Tomó 6.5 horas completar todos los procedimientos. Entre los 138 aislados clínicos de prueba, 55 fueron resistentes al menos a una droga. 34 de 38 (89.5%) aislados resistentes a INH, 28 de 28 (100%) aislados resistentes a RIF, 15 de 18 (83.3%) aislados resistentes a EMB, 18 de 30 (60%) aislados resistentes a STR, y 17 de 17 (100%) aislados resistentes a PZA, tuvieron mutaciones relacionadas a drogorresistencia específica. 18 de estas mutaciones no habían sido reportadas previamente. Estas nuevas mutaciones incluyen una en *rpoB*, ocho en *katG*, una en la región regulatoria *mabA-inhA*, dos en *embB*, cinco en *pncA*, una en *rrs*. Este método basado en secuenciación también fue útil para realizar en esputo de pacientes tuberculosos y para la detección de mutaciones en *M. bovis*. En

conclusión, este nuevo método es útil para la rápida detección de *M. tuberculosis* MDR y para la identificación de nuevas mutaciones en *M. tuberculosis* drogorresistente (Sekiguchi et al., 2007).

✪ Hibridación en fase sólida

Este tipo de ensayo está basado en la hibridación reversa de oligonucleótidos en tiras plásticas en las que las sondas específicas se han inmovilizado; también son conocidas como ensayos de sonda en línea. Las secuencias blanco amplificadas provenientes del microorganismo que se evalúa se unen a las sondas específicas, y la hibridación es revelada por el desarrollo de una reacción colorida en la tira (Palomino, 2009).

Actualmente existen dos ensayos de hibridación reversa en fase sólida disponibles comercialmente para la detección rápida de resistencia en *M. tuberculosis*: Line Probe Assay (LiPA) (INNO-LiPA Rif TB Assay, Innogenetics) para la detección de resistencia a RIF y GenoType MTBDR*Plus* (Hain Lifesciences) para la detección simultánea de resistencia a RIF e INH (Palomino, 2009).

El procedimiento LiPA es el más utilizado y permite una amplificación de la región central de 81pb del gen *rpoB* el cual codifica para la subunidad beta de la enzima ARN polimerasa presente en todos los miembros del complejo tuberculosis, seguida de una hibridación reversa. La biotina que actúa de marcador se incorpora durante la fase de amplificación, de esta forma, el producto amplificado biotinilado es posteriormente desnaturalizado e hibridado con 10 sondas oligonucleotídicas inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa a modo de líneas paralelas. El híbrido se detecta mediante una reacción colorimétrica. Este ensayo se completa en aproximadamente 12 horas (Morgan et al., 2005).

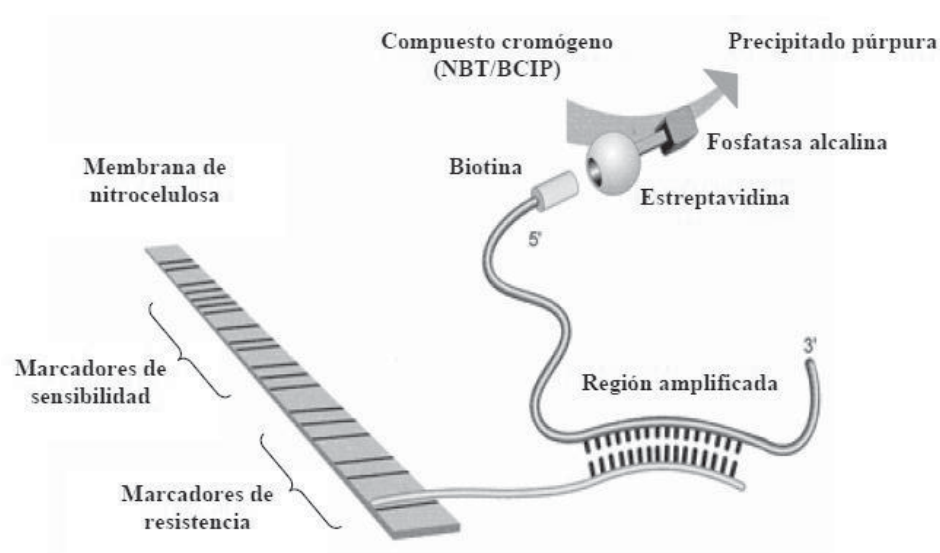


Figura 14. Proceso de hibridación en el sistema comercial INNOLipa_Rif.TB (Cockerill, 1999).

GenoType MTBDR*Plus* detecta resistencia a RIF e INH en aislados de cultivo y muestras de esputo; se basa en la detección de las mutaciones más comunes en los genes *katG*, *inhA* y *rpoB* (Hillemann et al., 2007). También se usa PCR e hibridación reversa en sondas inmovilizadas sobre una tira plástica (Palomino, 2009). En cuanto a validez de la prueba ofrece una sensibilidad para detectar resistencia a RIF de 98,1% y para INH de 90,2%, con una especificidad de 97,8% y 100% para cada droga respectivamente (Hillemann et al., 2007).

Ambos métodos de hibridación en fase sólida son relativamente fáciles de realizar; sin embargo, se requiere de experiencia básica en biología molecular y técnicas de PCR. Así como en otros métodos genotípicos, la sensibilidad de estas pruebas depende de la cantidad de ADN presente en la muestra, y la presencia de inhibidores podría causar falsos negativos (Palomino, 2009).

Morgan y cols., resumieron en un meta-análisis la evidencia de LiPA de varios estudios sobre su precisión para detectar resistencia a RIF. Este meta-análisis demostró que LiPA tiene una alta sensibilidad y especificidad cuando se usa aislado de cultivo. La mayoría de los estudios tenían una sensibilidad de 95% o

mayor, y una especificidad cercana al 100%. Sin embargo, los resultados eran menos precisos cuando la prueba se aplicaba directamente en muestras clínicas (por ejemplo esputo) (Morgan et al., 2005).

Hillemann y cols., evaluaron el método GenoType MTBDR en 103 cepas MDR y 40 susceptibles, las mutaciones que conferían resistencia habían sido analizadas previamente mediante secuenciación de ADN y PCR en tiempo real. El GenoType MTBDR identificó 102 de las 103 cepas MDR (99%) con mutaciones en el gen *rpoB* y 91 cepas (88.4%) con mutaciones en el codón 315 del gen *katG*. La correlación con la secuenciación de ADN fue de 100%. Comparado con el método de las proporciones, la sensibilidad y especificidad fue de 99% y 100% para resistencia a RIF, y 88.4% y 100% para resistencia a INH (Hillemann et al., 2005).

Anek-vorapong y cols., probaron el sistema BACTEC MGIT 960 y el ensayo Genotype MTBDRplus en 50 aislamientos y en 164 muestras de esputo con baciloscopia positiva. Genotype MTBDRplus tuvo una sensibilidad de 95.3%, 100% y 94.4% para resistencia a INH, resistencia a RIF y tuberculosis MDR, respectivamente. La especificidad fue de 100% para todos los patrones de resistencia y tanto para aislamientos como para muestras de esputo. Los resultados se obtuvieron en promedio de 25 días con el sistema BACTEC MGIT 960 y 5 días con Genotype MTBDRplus (Anek-vorapong et al., 2010).

- ✪ Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR, siglas en inglés)

En RT-PCR los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior lo que disminuye las posibilidades de contaminación. Mediante detección por fluorescencia se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la

cinética de la reacción de amplificación. RT-PCR proporciona un método ágil y sencillo para la identificación de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a drogas antituberculosas (Palomino, 2006). La principal ventaja de RT-PCR en tiempo real es la rapidez para obtener resultados, 1.5-2.0 horas después de la extracción de ADN, y el bajo riesgo de contaminación. Las principales desventajas son el requerimiento de equipo y reactivos costosos y la necesidad de personal bien capacitado (Palomino, 2009).

Kocagoz y cols., usaron la técnica de RT-PCR para determinar resistencia en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. 96 aislados resistentes a RIF y 23 aislados susceptibles fueron incluidos en el estudio. Se amplificó una región del gen *rpoB* de 305pb en la que se incluía la región determinante de resistencia a RIF de 81pb. Se utilizaron dos pares de sondas de hibridación que cubrían los sitios más frecuentes de mutación, en las regiones codón 526 a 531 y 513 a 516. Los resultados obtenidos fueron comparados con el método de las proporciones. Para la detección de resistencia a RIF, RT-PCR produjo sensibilidad de 92.7% y especificidad de 100% (Kocagoz et al., 2005).

En 2004 fue lanzado el sistema GeneXpert, un sistema automatizado basado en cartuchos de amplificación de ácidos nucleicos que simplifica las pruebas moleculares mediante la plena integración y automatización de los tres procesos (preparación de muestras, amplificación y detección) necesarios para RT-PCR. El sistema GeneXpert consiste en un instrumento, una computadora personal, un escáner de código de barras y el software precargado, utiliza cartuchos desechables de un solo uso que contienen reactivos liofilizados, buffers y soluciones de lavado. La detección de blancos y la caracterización se realiza en tiempo real usando un láser de seis colores como dispositivo de detección (OMS, 2011^c).

El desarrollo del ensayo Xpert MTB/RIF para la plataforma GeneXpert se completó en 2009 y se considera un importante avance en la lucha contra la tuberculosis.

Xpert MTB/RIF detecta *M. tuberculosis*, así como las mutaciones que confieren resistencia a RIF con tres primers específicos y cinco sondas moleculares únicas para asegurar un alto grado de especificidad. El ensayo proporciona resultados directamente del esputo en menos de 2 horas. Es importante destacar que la plataforma GeneXpert y el ensayo Xpert MTB/RIF son actualmente la única tecnología madura que representa una nueva generación de plataformas automatizadas de diagnóstico molecular (OMS, 2011^c).

La OMS revisó a finales de 2010 datos de trabajos publicados y estudios de demostración, y los resultados mostraron que el ensayo Xpert MTB/RIF tiene una sensibilidad analítica de cinco copias de genoma de ADN purificado, y 131 unidades formadoras de colonia por mililitro de esputo. Las guías moleculares cuyo blanco es el gen *rpoB* cubre todas las mutaciones encontradas en >99.5% de todas las cepas resistentes a RIF. No existe reactividad cruzada con micobacterias no tuberculosas. La tuberculosis y la resistencia a RIF fueron correctamente detectadas en presencia de ADN no tuberculoso o en mezcla de cepas susceptibles y resistentes. El procedimiento de inoculación Xpert MTB/RIF y el análisis de muestras no generan aerosoles infecciosos detectables (OMS, 2011^c).

Los resultados de los estudios controlados de validación clínica, revisados por la OMS, mostraron que el 92.2% de pacientes con cultivo positivo fueron detectados por una prueba única directa Xpert MTB/RIF. La sensibilidad de una prueba única Xpert MTB/RIF en pacientes con baciloscopía negativa y cultivo positivo fue de 72.5% y aumentó a 90.2% cuando tres muestras eran probadas. La especificidad de Xpert MTB/RIF fue de 99%. Xpert MTB/RIF detectó resistencia a RIF con 99.1% de sensibilidad y excluyó resistencia con 100% de especificidad (OMS, 2011^c). Cuando los resultados de Xpert MTB/RIF no fueron usados para terapia directa, los pacientes tuberculosos con baciloscopía negativa comenzaron el tratamiento después de un período medio de 58 días, comparado con una mediana de 4 días cuando los resultados de Xpert MTB/RIF fueron usados (OMS, 2011^c).

Un estudio realizado en Francia (Lemaitre et al., 2011), en el que se compararon las sensibilidades de los ensayos Xpert MTB/RIF y el “hecho en casa” RT-PCR IS6110-Taqman al usarlos en muestras pulmonares y extrapulmonares de rutina en el laboratorio, reportó que ambos métodos mostraron alta especificidad y excelente sensibilidad en muestras BAAR+. Sin embargo, en muestras BAAR- ambos métodos exhibieron sensibilidades similares, pero el ensayo Xpert MTB/RIF ofreció la menor sensibilidad en muestras extrapulmonares BAAR-. El ensayo Xpert MTB/RIF detectó correctamente la resistencia a RIF en muestras BAAR+, pero no en aquellas BAAR-. El estudio concluye que el ensayo Xpert MTB/RIF es un método rápido y bien adaptado a la rutina de un laboratorio, pero que disminuye su sensibilidad en muestras paucibacilares, tal como las muestras extrapulmonares BAAR-.

En base a evidencia sólida, la OMS apoya el uso extendido de Xpert MTB/RIF para la detección simultánea de tuberculosis y resistencia a RIF, dando lugar a dos recomendaciones principales: Xpert MTB/RIF debería ser usado como prueba de diagnóstico inicial en personas con sospecha de tuberculosis resistente a RIF o tuberculosis asociada a VIH y Xpert MTB/RIF puede ser considerado como una prueba de seguimiento de la microscopía en entornos donde la tuberculosis resistente a RIF o VIH es de menor importancia, especialmente en pruebas de muestras con baciloscopía negativa (OMS, 2011^c).

El costo para la implementación de Xpert MTB/RIF, incluyendo el equipo, la instalación, el mantenimiento anual, los reactivos y la capacitación del personal, es más de 100 500 USD (OMS, 2011^c).

Recientemente, un grupo de expertos de la UICter publicaron las consideraciones a tener en cuenta en países de bajos ingresos para la aplicación del ensayo Xpert MTB/RIF (Trébucq et al., 2011):

- El uso de este ensayo está limitado a laboratorios donde la temperatura se mantenga por debajo de 30°C en forma sostenida. Esto en la mayoría de los países de clima tropical implica el uso de equipos de aire acondicionado, lo cual sería una limitación en laboratorios periféricos.
- El costo por prueba del ensayo es de 20 USD (40 veces más costoso que el examen microscópico por tinción Ziehl-Neelsen).
- Se requiere de la disponibilidad regular e ininterrumpida del cartucho de prueba (aditamento de la plataforma GeneXpert), el cual cuenta con un tiempo de vida media de 18 meses. Este consumible es importado, a diferencia de las soluciones para tinción de Ziehl-Neelsen que son fácilmente preparadas a nivel regional en la mayoría de los programas de control.
- La fuente de energía eléctrica es frecuentemente interrumpida e inestable en la mayoría de los países de bajos recursos. Esto implicaría la necesidad de calibraciones anuales adicionales de la plataforma GeneXpert.
- Se requiere una cuidadosa investigación operacional (hospitales de referencia, laboratorios regionales, por ejemplo) para evaluar la viabilidad y eficacia de esta nueva tecnología comparada con la combinación de la tinción rutinaria y optimizada de ácido-alcohol resistencia y un algoritmo clínico como la primera línea diagnóstica.

La Guía Programática para el Manejo de Tuberculosis Drogorresistente publicada por la OMS en 2011 recomienda a los programas de control regionales la utilización de pruebas rápidas de susceptibilidad a drogas como INH y RIF o RIF sola, por encima de las pruebas convencionales al momento del diagnóstico de tuberculosis, de acuerdo a los recursos disponibles (OMS, 2011^a).

Sólo las pruebas moleculares pueden detectar la resistencia tan rápidamente. Actualmente, la OMS recomienda dos tecnologías para este fin: ensayos Line probe y Xpert MTB/RIF. Este tipo de pruebas proporcionan reducción de la mortalidad, aumento de la probabilidad de curación, disminución en el desarrollo de resistencia adicional y la reducción de probabilidad de fracasos y recaídas (OMS, 2011^a).

Los riesgos de estas dos pruebas rápidas de susceptibilidad a drogas incluyen resultados falsos positivos que lleven al desperdicio de recursos e incremento de la toxicidad para el paciente por el uso innecesario de medicamentos de segunda línea. Otro riesgo potencial es colocar a todos los pacientes resistentes a RIF en un régimen de tuberculosis MDR, pues se excluye de inmediato INH para su tratamiento, privándolos de una droga bactericida segura y útil (OMS, 2011^a).

Es muy importante aclarar que Xpert MTB/RIF no sustituye a los métodos convencionales de diagnóstico de tuberculosis (baciloscopía, cultivo y pruebas fenotípicas de susceptibilidad a drogas), los cuales son requeridos para monitorear el progreso del tratamiento y detectar resistencia a otras drogas aparte de RIF. En entornos o grupos de pacientes donde la resistencia a RIF es rara, los resultados de Xpert MTB/RIF que indican resistencia a RIF deben ser confirmados por pruebas convencionales de susceptibilidad a drogas o ensayos Line Probe (OMS, 2011^b).

★ Microarreglos de ADN

Esta técnica fue diseñada en 1999 por Brown y Botstein, y la definieron como un vehículo para explorar el mundo natural a nivel molecular, observando los resultados como mapas que reflejan el orden y la lógica del programa genético (Brown y Botstein, 1999). Aunque técnicamente es una hibridación en fase sólida, los microarreglos, también conocidos como biochips, han sido propuestos como uno de los nuevos métodos para la detección de drogorresistencia en *M.*

tuberculosis. Están basados en la hibridación de ADN obtenido de muestras clínicas frente a oligonucleótidos inmovilizados en una lámina de vidrio en miniatura, lo que brinda la posibilidad de evaluar y comparar una gran cantidad de secuencias simultáneamente en un simple paso de hibridación. Han sido principalmente usados en la detección de resistencia a RIF (Gryadunov et al., 2005).

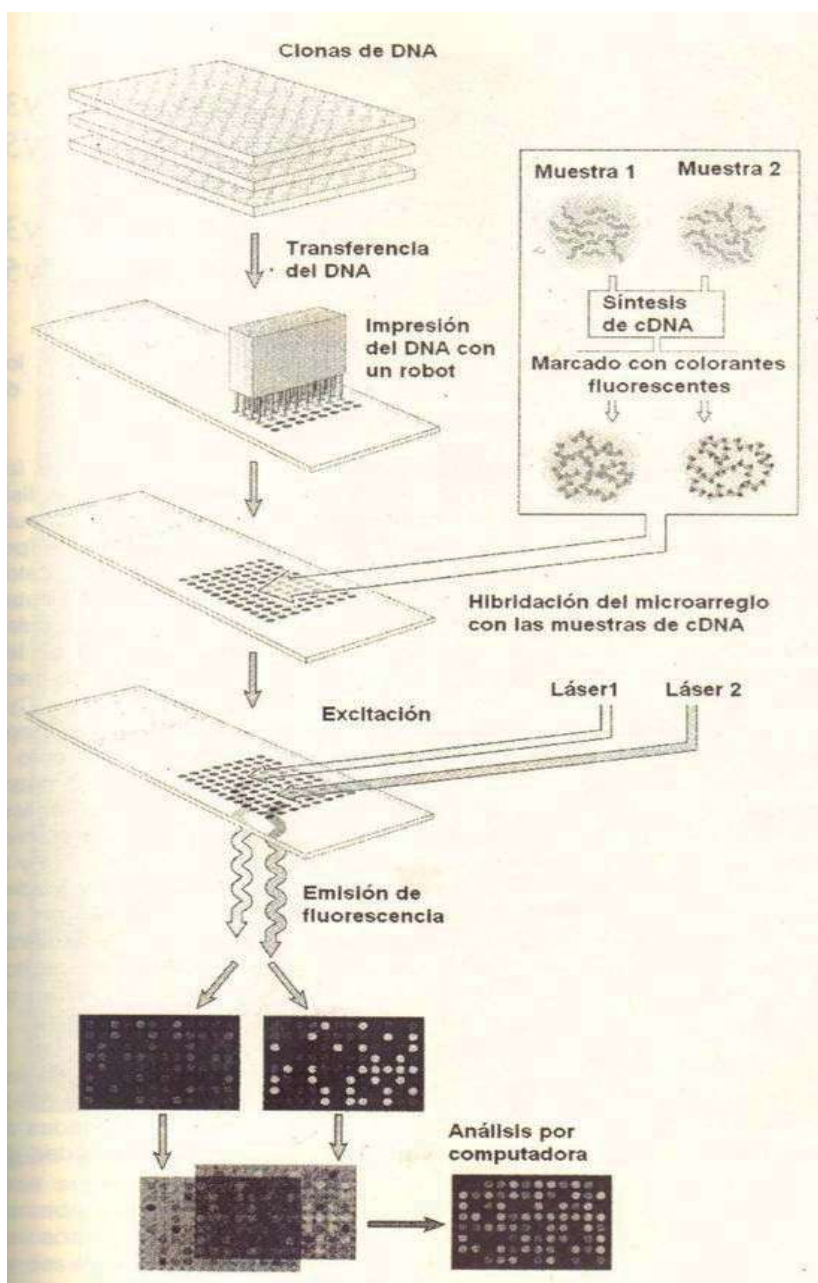


Figura 15. Mecanismo de la técnica de microarreglos (Martínez et al., 2006).

Gryadunov y cols. detectaron en aislados de *M. tuberculosis* más de 95% resistentes a RIF y casi 80% resistentes a INH. Los resultados fueron comparados con las pruebas estándar de drogoresistencia en *M. tuberculosis*. (Gryadunov et al., 2005).

Shimizu y cols., emplearon microarreglos de ADN para la detección de siete mutaciones de genes relacionados a resistencia de cinco drogas antituberculosas (INH, RIF, STR, EMB y KNM) usando ADN de *M. tuberculosis* aislado de esputo. Los resultados del análisis por microarreglos fueron comparados con el método de las proporciones. El análisis de microarreglos de ADN mostró alta sensibilidad (>90%) para las cinco drogas. La especificidad a RIF y EMB fue cerca de 90%, sin embargo la especificidad a INH (60%) y KNM (67%) no fueron suficientes. La cantidad de ADN de *M. tuberculosis* requerido para el análisis de microarreglos es de al menos 1-9 BAAR por 10 campos de tinción carbolfucsina. El análisis de microarreglos de ADN parece ser útil para estimación de resistencia a drogas, sin embargo tiene sus limitaciones. Para minimizar discrepancias, es necesario confirmar el número de bacilos en el esputo, y el método de las proporciones se necesita para la comparación de resultados cuando se utiliza el sistema de arreglos basado en PCR (Shimizu et al., 2008).

Kim y cols., compararon la técnica de microarreglos con la secuenciación de ADN y pruebas fenotípicas para detección de resistencia en 69 aislados de *M. tuberculosis* resistentes a INH y/o RIF y 27 aislados susceptibles. Dos codones seleccionados (*katG* codón 315 e *inhA15*) permitieron la identificación de 84.1% de los aislados resistentes a INH y 100% de los aislados resistentes a RIF fueron detectados mediante la búsqueda de siete codones: *rpoB511*, *rpoB513*, *rpoB516*, *rpoB522*, *rpoB526*, *rpoB531* y *rpoB533*. La especificidad total de este chip con oligonucleótidos para detección de resistencia a INH y RIF fue 100% y 95.3%, respectivamente (Kim et al., 2006).

Por el momento y debido al alto costo que involucran, la técnica de micorarreglos está todavía lejos del alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos de micobacteriología en el mundo (Palomino, 2009).

-11. CONCLUSIONES-

- 1) La tuberculosis es una enfermedad que ha acompañado al hombre desde los inicios de su evolución, como grave problema de salud en todos los tiempos, las epidemias han cobrado millares de víctimas en diferentes regiones del mundo.
- 2) La tuberculosis se transmite de persona a persona por vía aérea principalmente. Se presenta como enfermedad pulmonar y extrapulmonar. Es una enfermedad de distribución cosmopolita.
- 3) Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis son muy variables y dependen de factores relacionados con el paciente, la cepa infectante y la interacción hospedero-microorganismo. En la presentación clínica más frecuente: tuberculosis pulmonar, el síntoma predominante es la tos persistente, en conjunto con la toma del estado general del paciente. La variante pulmonar se presenta en 2 formas: primaria y secundaria o posprimaria.
- 4) El establecimiento de una infección en el pulmón por el bacilo de Koch depende tanto de su virulencia como de la habilidad microbiciada inherente del macrófago alveolar que haya ingerido al bacilo. La tuberculosis pulmonar desde el punto de vista fisiopatogénico tiene como precedente la inmunodepresión en el paciente, con lo cual se facilita la formación o activación del granuloma o complejo de Ghon en el pulmón.
- 5) El diagnóstico de la tuberculosis se establece por la identificación, aislamiento o demostración indirecta del bacilo de Koch. La bacteriología de tuberculosis dentro de los programas de control de tuberculosis a nivel mundial descansa en el examen microscópico (tinción de ácido-alcohol resistencia) y examen bacteriológico (cultivo sólido: Löwenstein-Jensen modificado; cultivo líquido: sistema BACTEC-MGIT 960).

- 6) La resistencia a los antibióticos en *M. tuberculosis* se debe a mutaciones espontáneas dentro de su genoma y suele codificar a una sola droga. No se reportan plásmidos codificadores de resistencia. Esta resistencia puede ser de tipo natural o adquirida, y en ambos casos, el aislamiento (o cepa) puede ser definido como resistente, multirresistente o extremadamente resistente.
- 7) En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos rápidos para el diagnóstico de tuberculosis y la detección de resistencia y multirresistencia antibiótica. Estos han sido diseñados como métodos fenotípicos o genotípicos, que han llegado a ser herramientas disponibles comercialmente. En general, estos métodos han sido descritos y evaluados en aislamientos (cepas) de *M. tuberculosis* y pocos de ellos se han aplicado directamente en muestras clínicas. Para que estos nuevos métodos se conviertan en alternativas reales en el diagnóstico y la detección de resistencia antibiótica, deben ser adaptables tanto para cultivos como muestras clínicas y deben ser evaluados en ensayos clínicos controlados dentro de poblaciones altamente endémicas donde la implementación de estos métodos son necesarios para un mejor control de la enfermedad.
- 8) La metodología de oro o referencia mundial en la detección de resistencia antibiótica en *M. tuberculosis* es el método proporcional de Canetti o método de las proporciones, llevado a cabo en medio sólido (Löwenstein-Jensen) o líquido (BACTEC MGIT 960).
- 9) El ensayo Xpert MTB/RIF de la plataforma GeneXpert está llamada a ser la herramienta molecular de escrutinio inicial de identificación de *M. tuberculosis* y detección de resistencia a rifampicina, simultáneamente. Se precisan estudios operacionales para evaluar la viabilidad y eficacia de esta nueva tecnología comparada con la combinación de la tinción rutinaria y optimizada de ácido-alcohol resistencia y el algoritmo clínico como primera línea diagnóstica.

-12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

- Abate G, Mshana RN, Miörner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 1998; 2:1011-1016.
- Abu-Shams K, Ardanaz J, Murie M, Sebastián A, Tiberio G, Arteché A. Evolución de los pacientes sometidos a colapsoterapia por tuberculosis pulmonar. Gac Med Bilbao. 2000; 97(1):11-13.
- Albert H, Trollip AP, Seaman T, Abrahams C, Mole RJ, Jordaan A, et al. Evaluation of a rapid screening test for rifampin resistance in re-treatment tuberculosis patients in the Eastern Cape. SAMJ. 2007; 97:858-863.
- American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161:1371-1395.
- Anderl JW, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:1818-24.
- Anderl JW, Zahller J, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:1251-6.
- Anek-vorapong R, Sinthuwattanawibool C, Podewils LJ, McCarthy K, Ngamlert K, Promsarin B, et al. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. BMC Infectious Diseases. 2010; 10:123.
- Balabanova Y, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Kruuner A, Malomanova N, Simak T, et al. An Integrated Approach to Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Multidrug Resistance Using Liquid Culture and Molecular Methods in Rusia. PLoS ONE. 2009; 4:7129.
- Banaiee N, Bobadilla del Valle M, Bardarov S, Riska PF, Small PM, Ponce de Leon A, et al. Luciferase Reporter Mycobacteriophages for Detection, Identification, and Antibiotic Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. J Clin Microbiol. 2001; 39:3883-3888.

- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um Ks, Wilson T, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1994; 263:227-230.
- Barry CE, Mdluli K. Drug sensitivity and enviromental adaptation of Mycobacterial cell wall components. Trends Microbiol. 1996; 4:275-81.
- Blanco F. 2011. Miembro del Laboratorio de Micobacterias. Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. (Comunicación personal, 20 de septiembre de 2011).
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Micobacterias. En: Jawetz, Melnick, Adelberg, editores. Microbiología Médica. 18ª ed. México DF: El Manual Moderno: 2005. p:313-24.
- Brown PD, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat Get. 1999; 21:33-7.
- Bwanga F, Joloba ML, Haile M, Hoffner S. Evaluation of seven tests for the rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Uganda. Int J Tuberc Lung Dis. 2010; 14:890-5.
- Callow JA, Callow ME. Biofilms. Prog Mol Subcell Biol. 2006; 42:141-69.
- Cambau E, Jarlier V. Resistance to quinolones in mycobacteria. Res Microbiol. 1996; 147:52-9.
- Caminero JA. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2001; 37:35-42.
- Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and chemotherapy. 2011; 55:2032-2041.
- Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ. 1969; 41:21-43.

- Cardoso S, Portaels F. History. En: Palomino JC, Cardoso S, Ritacco V, editores. Tuberculosis 2007 from basic science to patient care [Internet]. Disponible en: <http://www.tuberculosisistextbook.com>
- Caws M, Drobniewski FA. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. Ann NY Acad Sci. 2001; 953:138-45.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC^a). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2000-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006; 55:301-5.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC^b). Revised Definition of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. MMWR 2006; 55:1169-92.
- Chauca JA, Palomino JC, Guerra H. Evaluation of rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage D29-based assay. J Med Microbiol. 2007; 56:360-364.
- Chiang CY, Centis R, Migliori GB. Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future. Respirology. 2010; 15:413-432.
- Chopra I, Brennan P. Molecular action of antimicrobial agents. Int J Tuberc Lung Dis. 1998; 78:89-98.
- Cockerill FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43:199-212.
- Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC. Drug-Resistant Tuberculosis Review of the Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. Clin Infect Dis. 1997; 24:121-30.
- Cole ST, Telenti A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Eur Respir J. 1995; 8:701s-713s.
- Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21:299-308.
- Cormican MG, Barry T, Gannon F, Flynn J. Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. J Clin Pathol. 1992; 45:601-604.

- Cotran RS, Kumar V, Collins T, editores. Robbins: Patología Estructural y Funcional. 6ta ed. Madrid: McGraw Hill; 2000.
- Coyoli BA. 2011. Responsable del Programa de Tuberculosis de la Secretaría de Salud de Michoacán. (Comunicación personal, 31 de mayo de 2011).
- Cuevas-Córdoba B, Zenteno-Cuevas R. Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(9):621-628.
- David HL, Clavel S, Clement F, Moniz J. Effects of antituberculosis and antileprosy drugs on mycobacteriophage D29 growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980; 18:357-9.
- De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30:36-52.
- Donogue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, et al. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:584-92.
- Ejigu GS, Woldeamanuel Y, Shah NS, Gebyehu M, Selassie A, Lemma E. Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008; 12:332-7.
- El-Sayed ZM, Goda T. Rapid phenotypic assay of antimycobacterial susceptibility pattern by direct mycobacteria growth indicator tube and phage amplified biological assay compared to BACTEC 469 TB. *Tuberculosis*. 2007; 87:102-8.
- Espinal MA. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis*. 2003; 83:44-51.
- Esteban J, Ortiz A, Matín N, Alonso V, Molina D, Fernández R. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(2):79-84.
- Ferrari M, Telles MA, Ferrazoli L, Levy CE, Villares MC, Moretti ML, et al. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line antimycobacterial

- agents in a Brazilian hospital: assessing the utility of the tetrazolium (MTT) microplate assay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105:661-4.
- Foongladda S, Roengsanthia D, Arirattanakool W, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 2002; 6(12):1118-22.
 - Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. The Lancet. 2003; 362:887-899.
 - Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3a ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2007.
 - Golyshevskaja VI, Korneev AA, Chernosova IN, Selina IG, Kasarova TA, Grishina TD, et al. New microbiological techniques in diagnosis of tuberculosis. Prob Tuberc. 1996; 6:22-5.
 - Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S, Roudinskii N, Donnikov M, Pan'kov S, et al. Evaluation of hybridization on oligonucleotide microarrays for analysis of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect. 2005; 11:531-539.
 - Harrison TR, Fauci A, Braunwald E, Kasper DL. Harrison Principios de Medicina Interna. 16a ed. Madrid: McGraw Hill/Interamericana de España; 2005.
 - Hazbón M. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. Biomedical. 2004; 24:149-62.
 - Hazbon MH, Guarín N, Ferro BE, Rodríguez AL, Labrada LA, Tovar R, et al. Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 2003; 41:4865-4869.
 - Herzog H. History of tuberculosis. Respiration. 1998; 65:5-15.
 - Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the Genotype MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. J Clin Microbiol. 2007; 45:2635-2640.

- Hillemann D, Weizenegger M, Kubika T, Richter E, Niemann S. Use of the Genotype MTBDR assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43:3699-3703.
- Hofling CC, Pavan EM, Giampaglia CM, Ferrazoli L, Aily DC, de Albuquerque DM, et al. Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. Int J Tuberc Lung Dis. 2005; 9:87-93.
- Imperiale BR, Cataldi AA, Morcillo NS. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. Int J Tuberc Lung Dis. 2011; 15:496-501.
- Institute of Medicine (IOM). The new profile of drug resistant tuberculosis in Russia: A global and local perspective: summary of a joint workshop. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
- Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. Cell Microbiol. 2004; 6:105-16.
- Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology a guide for the level III laboratory. 1a ed. Atlanta, Ga: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.
- Kim SY, Park YJ, Song E, Jang H, Kim C, Yoo J, et al. Evaluation of the CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; 54:203-10.
- Kocagoz T, Saribas Z, Alp A. Rapid Determination of Rifampin Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR. J Clin Microbiol. 2005; 43:6015-6019.
- Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, et al. Koneman. Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas color. 6ta ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.

- Konomi N, Lebwohl E, Mowbray K, Tattersall I, Zhang D. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. J Clin Microbiol. 2002; 40:4738-40.
- Leao S, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo JC, Telles MA, et al. Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden Broele, Brugge, Belgium, 2004.
- Leibler S, Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science. 2004; 305:1622-5.
- Lemaitre N, Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110 Taqman Real-Time PCR Assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol. 2011; 49(5):1772-6.
- Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:3616-3619.
- Martin A, Panaitov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Argeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2008; 62:56-64.
- Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2007; 59:175-83.
- Martin A, Portaels F. Drug Resistance and Drug Resistance Detection. En: Palomino JC, Cardoso S, Ritacco V, editores. Tuberculosis 2007 from basic science to patient care [Internet]. Disponible en: <http://www.tuberculosistextbook.com>
- Martínez M, Campos J, Farías A, García E, Granados ME. Principios de Biología Molecular. 1a ed. Morelia Michoacán: Secretaría de Educación Pública; 2006.
- McDermott W. Microbial persistence. Yale J Biol Med. 1958; 30:257-91.

- McNerney R, Kambashi BS, Kinkese J, Tewbwe R, Godfrey-Faussett P. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:2115-20.
- Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Bottger EC. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:2452-4.
- Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, Pai M. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Current standards and challenges. *J Infect Dis Med Microbiol*. 2008; 19:169-172.
- Miranda J, Ríos R, Mattar S, Alvis N. 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. *Colom Med*. 2008; 39:147-53.
- Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55:500-505.
- Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. Microscopic observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med*. 2006; 355(15):1539-50.
- Morán MC, Aceves D, Peña PM, Gallegos MP, Flores SE, Montoya H, et al. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Rev Panam Salud Publica*. 2000; 7:389-394.
- Morgan M, Kalantri A, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2005; 5:62.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. *Microbiología Médica*. 5ta ed. Madrid: Elsevier; 2006.

- Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev. 1995; 8(4):496-514.
- Narain JP, Riviglione MC, Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis and treatment. Bull WHO. 1992; 70:515-526.
- Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. J Med Microbiol. 2006; 55:857-860.
- Nava O, Prieto L. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar: revisión. Kasmera. 2007; 29:51-63.
- Niederweis M, Danilchanka O, Huft J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacteria outer membranes: in search of proteins. Trends in Microbiol. 2011; 18(3):109-16.
- Ojha AK, Baughn AD, Sambandon D, Itsu T, Trivelli X, Guerardel Y, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. Molecular Microbiology. 2008; 65(1):164-74.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Comité de Expertos. Tuberculosis en las Américas; Reporte Regional 2009. Washington, DC: OPS; 2010.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual para el diagnóstico de la Tuberculosis: Normas y guía técnica. Washington, DC: OPS; 2008.
- Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 56:103-111.
- Palomino JC. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. Curr Opin Pulm Med. 2006; 12(3):172-8.
- Paramasivan CN, Sulochona S, Kubendiran G, Venkatesan P, Mitchison DA. Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic and

- stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:627-31.
- Parsons LM, Somoskövi A, Urbanczik R, Salfinger M. Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. *Front Biosci*. 2004; 1:2086-105.
 - Polanco A. Tuberculosis [monografía en internet]. Madrid: Monografias.com SA, 2011 [citado 25 Jun 2000]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos5/tuber/tuber.shtml>
 - Quirós-Roldán E, Airoidi M, Moretti F, Carosi G. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Diagn Biol [serie en Internet]*. 2001 Dic [citado 12 Jul 2011]; 50(4): [aprox. 3p]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003479732001000400006&lng=es.
 - Rastogi N, Legrand E, Sola C. The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 2001; 20:21-54.
 - Rastogi N, Sola C. Molecular Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. En: Palomino JC, Cardoso S, Ritacco V, editores. *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care [Internet]*. Disponible en: <http://www.tuberculosis textbook.com>
 - Riska PF, Jacobs WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4:4-10.
 - Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martin A, Portaels F, Ramarokoto H, et al. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007; 11:683-8.
 - Sacchetti JC, Blanchard JS. The structure and function of the isoniazid target in *M. tuberculosis*. *Res Microbiol*. 1996; 147:36-43.
 - Said S, Becerril P, Molina G, Barrios H. Tuberculosis causada por cepas de *M. tuberculosis* drogorresistentes. *Enf Emerg*. 2005; 7:13-9.
 - Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994; 13:961-979.

- Sauret J. Historia del tratamiento de la tuberculosis. [Internet]. Barcelona: Agencia de Salud Pública; c1999-2011 [actualizado el 18 de junio de 2011; citado el 24 de octubre de 2011]. Disponible en: <http://www.aspb.es/uitb/docs/HISTRACHT.HTM>
- Schluger NW. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *Am Respir Crit Care Med*. 2001; 164:2020-4.
- Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, et al. Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41:540-543.
- Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculosis drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. 1996; 2:662-7.
- Sekiguchi J, Miyoshi-Akimaya T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al. Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:179-192.
- Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, Girmachew F, Demessie D, Lemma E. Evaluation of Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay for Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:1093-1097.
- Shimizu Y, Dobashi K, Yoshikawa Y, Yabe S, Higuchi S, Koike Y, et al. Five-antituberculosis Drug-resistance Genes Detection Using Array System. *J Clin Biochem Nutr*. 2008; 42:228-234.
- Sierra C, Sánchez E, Henao S, Saavedra A. Determinación de la susceptibilidad a drogas de primera línea en aislamientos de *M. tuberculosis* por la técnica del tubo indicador de crecimiento micobacteriano. *Rev Fac Med*. 2008; 56:11-20.
- Singh M, Espitia C. Immunological Diagnosis. En: Palomino JC, Cardoso S, Ritacco V, editores. *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care* [Internet]. Disponible en: <http://www.tuberculosisistextbook.com>

- Southeg-Pilling CJ, Davies DG, Sauer K. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* 2005; 187:8114-26.
- Sreevatsan S, Stockbaver K, Pan X, Kreiswirth B, Moghazeh S, Jacobs W, et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(8):1677-81.
- Suffys P, Palomino JC, Leao S, Espitia C, Cataldi A, Alito A, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4:179-183.
- Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Degraeve WM. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92:297-316.
- Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, et al. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gen. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:1220-1225.
- Taylor GM, Young DB, Mays SA. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2236-40.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole ST, Colston MJ, et al. Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993; 341:647-650.
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbaver KE, Wieles B, et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med.* 1997; 3:567-70.
- Telenti A. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax.* 1998; 53:793-797.
- Tovar MA, Torres VB, editores. Microbiología médica de Jawetz, Melnick, Adelberg. 19ª ed. México: El Manual Moderno; 2008.
- Trébucq A, Enarson DA, Chiang CY, Van Deun A, Harries AD, Boillot F, et al. Xpert MTB/RIF for national tuberculosis programmes in low-income countries: when, where and how? *Int J Tuberc Lung Dis.* Epub 2011 Oct 13.

- Varaine F, Henkens M, Grouzard V. Tuberculosis. 5a ed. París: Medecins Sans Frontières; 2010.
- Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. En: Universidad de la República Facultad de Medicina. Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene. Temas de bacteriología y virología médica. 3ª ed. Montevideo: Oficina del libro FEFMUR; 2008. p. 649-62.
- Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience*. 2004; 9:975-994.
- Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJ. Timely Culture for *Mycobacteria* Which Utilizes a Microcolony Method. *J Clin Microbiol*. 1993; 31:2178-2184.
- Wilson TM, Collin DM. *aphC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Microbiol*. 1996; 19:1025-1034.
- Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin VR. Phenotypic tolerance: Antibiotic enrichment of non-inherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(4):1483-94.
- World Health Organization (OMS) [Internet]. Switzerland: The Organization; c1948-2011 [actualizado 20 Jul 2011; citado 3 Agosto 2011]. WHO warns against the use of inaccurate blood tests for active TB [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.who.int/tb/en/>
- World Health Organization (OMS). Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World: The WHO/IUTLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1994-1997. Geneva: WHO; 1997.
- World Health Organization (OMS). Global Project and Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 1999-2002. Geneva: WHO; 2004.
- World Health Organization (OMS). Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing, WHO report 2007. Geneva: WHO; 2007.
- World Health Organization (OMS). Global Tuberculosis Control: WHO report 2010. Geneva: WHO; 2010.

- World Health Organization (OMS). Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO; 2011^a.
- World Health Organization (OMS). Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampin resistance: Xpert MTB/RIF system. Geneva: WHO; 2011^b.
- World Health Organization (OMS). Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational “How-to”; practical considerations. Geneva: WHO; 2011^c.
- Zhang M, Yue J, Yang Y, Zhang H, Lei J, Jin R, et al. Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. Clin Microbiol. 2005; 43:5477-82.
- Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; 13:1320-30.
- Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005; 45:529-64.
- Zhao X, Yu H, Yu S, Wang F, Sacchettini JC, Magliozzo RS. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (katG) and its S315T mutant. Biochem. 2006; 45:4131-40.
- Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. Epidemiol Infect. 2003; 130:239-49.