



T E S I S:

**“Evaluación de Gen Probe Mtd-2 en la Identificación de
Mycobacterium tuberculosis en Muestras Clínicas de Pacientes del
Centro Médico Nacional la Raza”.**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD
EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

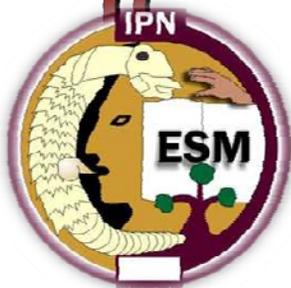
Presenta:

DRA. SUSANA JUAREZ VILCHES

Directores de Tesis:

M. en C. María Elena Hernández Campos

D. en C. Gloria María Calderón Rodríguez



México, D.F., Julio de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 10 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

"Evaluación de Gen Probe MTD-2 en la Identificación de Mycobacterium tuberculosis en Muestras Clínicas de Pacientes del Centro Médico Nacional la Raza"

Presentada por la alumna:

Juárez

Apellido paterno

Vilches

Apellido materno

Susana

Nombre(s)

Con registro:

Table with 7 columns containing the number B091889

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. María Elena Hernández Campos

Dra. Gloria María Calderón Rodríguez

Dra. Claudia Camelia Calzada Mendoza

Dr. Nelson Eduardo Álvarez Licona

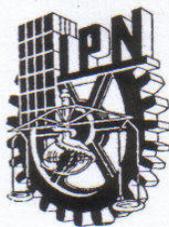
Dra. María de la Luz Sevilla González

Dra. Elvia Mera Jiménez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR

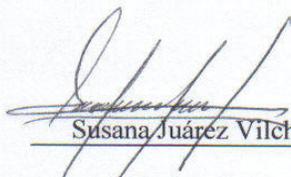


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 10 del mes Junio del año 2011, la que suscribe Juárez Vilches Susana alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD con número de registro B091889, adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. María Elena Hernández Campos y Dra. Gloria María Calderón Rodríguez y cede los derechos del trabajo intitulado “Evaluación de Gen Probe MTD-2 en la Identificación de Mycobacterium tuberculosis en Muestras Clínicas de Pacientes del Centro Médico Nacional la Raza”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección amiguerta@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Susana Juárez Vilches
Nombre y firma

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Microbiología del Hospital General “Gaudencio González Garza” del Instituto Mexicano del Seguro Social y en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional bajo la Dirección de la Dra. María Elena Hernández Campos y la Dra. Gloria María Calderón Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, por la valiosa oportunidad que me brindo para superarme académicamente y ser aceptada en la Maestría en Ciencias de la Salud y al cuerpo docente que siempre estuvo dispuesto a colaborar en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por favorecer la preparación de nuevos investigadores y el apoyo económico otorgado con la beca académica otorgada en el mes Septiembre del 2010 a Agosto 2011 para la realización de los estudios en maestrías en ciencias de la salud.

AGRADECIMIENTOS

En esta página hare una breve mención de aquellas personas que, de una manera u otra contribuyeron a que el esfuerzo que constituyo llevar a cabo la investigación se lograra.

En el aspecto académico quiero mencionar en primer lugar a la Dra. María Elena Hernández Campos directora de tesis por su apoyo e intervención que siempre me otorgo y a mi Directora de tesis externa Dra. Gloria María Calderón Rodríguez su dedicación, apoyo y sobre todo su intervención que siempre fue más allá del horizonte académico, mi más sincero reconocimiento como docentes. Dra. Elvia Mera Jiménez quien tuvo un importante papel en el desarrollo de mi tesis gracias por su tiempo y su orientación en la elaboración del protocolo.

Al Dr. Jesús Ernesto Casillas Cansino que siempre estuvo dispuesto a apoyarme y permitir mi desarrollo profesional y humano.

Al laboratorio de Microbiología del Centro Médico Nacional la Raza, en especial a la Química Ma. del Socorro Méndez Tovar por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas de biología molecular.

DEDICATORIA:

A Dios agradezco humildemente por esta nueva oportunidad para crecer bajo su protección y cuidado.

A mis padres gracias a sus enseñanzas hoy sigo creciendo y ellos siempre han sido la motivación que me ha impulsado a emprender nuevos y desafiantes proyectos.

A mis hermanas por su apoyo moral que siempre están conmigo para hacer equipo.

A mi amiga Martha por su apoyo incondicional y su ayuda constante.

A todas las personas que de una alguna manera directa e indirectamente contribuyeron a la realización de este proyecto.

Poco a poco..... Se va lejos.

Susana Juárez Vilches

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	11
Glosario.....	12
Índice de cuadros.....	15
Índice de figuras.....	16
Resumen.....	17
Abstract.....	18
1. Marco Teórico	19
1.1 Historia de la tuberculosis.....	19
1.2 Epidemiología de las Micobacterias.....	20
1.3 Bacteriología Tuberculosis.....	26
1.4 Patogénesis e Inmunología de la Tuberculosis.....	29
1.5 Características clínicas de Tuberculosis.....	33
1.6 Diagnóstico de Tuberculosis.....	37
1.6.1 Diagnóstico clínico.....	37
1.6.2. Prueba de Tuberculina.....	38
1.6.3 Baciloscopia.....	40
1.6.4 Cultivos.....	41

1.6.5 Identificación mediante sondas genéticas.....	46
2. Planteamiento del Problema.....	53
3. Justificación.....	54
4. Pregunta de Investigación.....	56
5. Hipótesis.....	56
6. Objetivos.....	57
6.1. Objetivo general	57
6.2. Objetivos específicos.....	57
7. Material y Métodos	58
7.1 Tipo de Estudio.....	58
7.2 Lugar de realización.....	58
7.3 Población de Estudio.....	58
7.4 Selección de la muestra.....	58
7.5 Preparación de la muestra	58
7.6 Técnica.....	59
7.7... Lectura.....	60
7.8 Criterios de Inclusión.....	61

7.9 Criterios de Exclusión.....	61
7. 1.1 Criterios de Eliminación.....	61
7.1.2 Variables.....	62
7.1.3. Tamaño de Muestra.....	63
7.1.4. Método Estadístico.....	63
7.1.5. Consideraciones Éticas.....	64
7.1.6. Equipos y Recursos.....	64
7. Resultados.....	65
8. Discusión	70
9. Conclusiones.....	73
11. Bibliografía.....	74
12. Anexos.....	87

ABREVIATURAS

BARR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
HTR	Hipersensibilidad de tipo retardado
IMC	Inmunidad mediada por células
IFN-γ	Interferon gamma
LAM	Lipoarabinomanán
LW	Lówestein-Jensen
MTD	Detección Directa de Mycobacterium Tuberculosis
MTC	Complejo Mycobacterium tuberculosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ph	Potencial de Hidrogeniones
PT	Prueba de la Tuberculina
RFLP	Polimorfismo de los fragmentos de restricción.
RLU	Unidades Relativas de Luz
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAr	Ácido Ribonucleico ribosomal
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis Pulmonar
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
ZN	Técnica de Zielh-Nielsen

GLOSARIO

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO:

Es una macromolécula que forma parte de todas las células contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de la transmisión hereditaria.

ÁCIDO RIBONUCLEICO:

Es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos, es la molécula que dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica. Está formado por ribosa, purinas adenina y guanina, pirimidina citosina y uracilo

ÁCIDO RIBONUCLEICO RIBOSOMAL:

Es el tipo de ARN más abundante en las células y forma parte de los ribosomas que se encargan de la síntesis de proteínas según la secuencia de nucleótidos del ARN mensajero.

ACIDOS MICOLICOS:

Son ácidos grasos de alto peso molecular, alfa substituidos y betahiroxilados encontrados formando ceras en las paredes celulares de especies del género *Mycobacterium*, *Nocardia Rhodococcus* y *Corynebacterium*.

BACILOS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES:

Bacilos que resisten la decoloración por un ácido después de haber sido teñido es la propiedad física de algunas bacterias a la resistencia a la decoloración de la fucsina básica rojo la cual penetra en la pared celular por acción del fenol y el calor.

BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN:

Es la vacuna contra la tuberculosis esta vacuna se prepara a partir de extracto atenuado de *Mycobacterium bovis* que ha perdido su virulencia en cultivos artificiales, manteniendo su poder antigénico. Se utiliza como modificante de la respuesta biológica, puede accionar el sistema inmune para atacar los tumores.

HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS ADN o ARN:

Es un proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencia de bases complementarias en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice donde las bases nitrogenadas quedan ocultas en el interior.

HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO RETARDADO:

Es el patrón principal de respuesta a *Mycobacterium tuberculosis*, hongos, protozoos y parásitos, este tipo de hipersensibilidad contribuye, asimismo al rechazo de los trasplantes es una reacción medida por las células CD4+TH1, que secretan citocinas específicas, cuando se encuentran frente a un antígeno procesado asociado al complejo principal de histocompatibilidad MHC de clase II.

INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS:

Es una forma de respuesta inmunitaria adaptativa mediada por linfocitos T, Actúa como mecanismo de ataque en contra de los microorganismos intracelulares, como virus y algunas bacterias capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes.

INTERFERON GAMMA:

Es un tipo de citoquina producida por los linfocitos T natural killer cuya función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas celulares adaptativas

LIPOARABINOMANANO:

Es un compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática. Provoca una respuesta antimicrobiana en macrófagos y está recubierto por residuos de manosa.

LÓWESTEIN-JENSEN:

Es un medio de cultivo solidificado, complejo, usado para el aislamiento de especies del género *Mycobacterium* a partir de especímenes de pacientes con tuberculosis, El medio de cultivo se prepara mezclando huevo de gallina con una mezcla de sales, entre las cuales se encuentra la aspargina y sulfato de magnesio. Además de glicerol, almidón de papa y verde de malaquita para impedir el crecimiento de bacterias contaminantes.

Mc. FARLAND:

Método estandarizado de acuerdo al grado de turbidez para determinar el número de microorganismos en una suspensión o cultivo microbiano, sin necesidad de cultivarlos o de hacer uso de algún aparato espectrofotométrico.

POTENCIAL DE HIDROGENIONES:

Es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución. El pH indica la concentración de iones hidronio presentes en determinadas sustancias.

PRUEBA DE LA TUBERCULINA

Es la prueba o intradermorreacción de Mantoux que permite saber si la persona ha estado expuesta a tuberculosis o ha sido infectada por el bacilo tuberculoso.

POLISMORFISMO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción como las endonucleasas.

SONDA DE HIBRIDACION:

Es un proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencia de bases complementarias, en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice, donde las bases nitrogenadas quedan ocultas en el interior.

SONICACION:

Es la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular, intensa agitación producida que destruye las membranas celulares, dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada.

TÉCNICA DE ZIEL-NIELSEEN:

Es una técnica de coloración utilizada para mostrar la ácido alcohol resistencia de las micobacterias y las *Nocardias*, es muy utilizada en el diagnostico de la tuberculosis los bacilos se tiñen de rojo y se agrega una tinción de contraste de nombre azul de metileno

UNIDADES RELATIVAS DE LUZ:

Es una reacción de bioluminiscencia del sistema luciferina/luciferasa y demuestra el rol del ATP como factor determinante en la emisión de la luz.

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO:

Es la probabilidad de que la persona no tenga la enfermedad cuando la prueba diagnóstica da un resultado negativo.

VALOR PREDICTIVO POSITIVO:

Estima la probabilidad de que el resultado de un estudio sea correcto o sea que un individuo con resultado positivo, tenga la lesión.

VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA:

Es una enfermedad que afecta a todos los humanos infectados por el VIH es un lentivirus de la familia retroviridae.

Índice de cuadros

Cuadros	Página
1.-Estudios de métodos diagnósticos para <i>Mycobacterium</i> Tuberculosis utilizando baciloscopia y cultivo en diversos países.	28
2.- Estudios realizados con diversos métodos diagnósticos para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> baciloscopia, Cultivo y Gen probe.	31
3.- Variables	44
4.- Edad promedio de los pacientes del estudio	47
5.- Diagnósticos de los pacientes de estudio	48
6.- Tipos de muestras	49
7.- Muestras positivas en las diversas pruebas	50
8.- Global de los 3 métodos utilizados en la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51

Índice de figuras

Figuras	Página
Figura 1. Morfología de Mycobacterium tuberculosis	10
Figura 2. Pared Celular de Mycobacterium	11
Figura 3. Respuesta Inmunitaria de Mycobacterium tuberculosis	14
Figura 4. Lesiones radiológicas típicas de Mycobacterium tuberculosis	16
Figura 5. Evolución de la tuberculosis	18
Figura 6. Prueba de Tuberculina	20
Figura 7. Baciloscopia con Tinción de Ziehl-Neelsen	22
Figura 7 Cultivo en Medio de Löwestein-Jensen	25

Resumen

La tuberculosis es un problema de Salud Mundial se estima que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con alguna cepa de Mycobacterium Tuberculosis en estado latente. La capacidad de M. tuberculosis para entrar en latencia representa uno de los principales retos para el control mundial de la enfermedad.

Para que se establezca la infección pulmonar, los microorganismos deben llegar por inhalación a los espacios alveolares, donde son fagocitados por los macrófagos pulmonares la complejidad de esta bacteria radica en la composición de su pared celular contiene enzimas que son capaces de destoxificar radicales libres e interferir con eventos de tráfico y señalización intracelular.

El diagnóstico inicial es clínico pero la clínica no es suficiente por lo que debe complementarse con métodos accesorios como son la prueba de tuberculina, la baciloscopia con tinción de Ziel-Nelseen, cultivo de Löwestein-Jensen que se considera el estándar de oro y es el único método que puede asegurar el diagnóstico de certeza de Tuberculosis

En este estudio se analizaron 120 muestras de pacientes hospitalizados en el Centro Médico Nacional la Raza Gaudencio González Garza. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de MTD directo en muestras de pacientes con búsqueda de Mycobacterium tuberculosis utilizando Gen-Probe MTD-2 correlacionándose con la baciloscopia y el cultivo y saber si puede ser utilizado como una prueba diagnóstica inmediata por sus ventajas de proporcionar el resultado en menos de 24 horas de muestras directas sometidas previamente a decontaminación y posteriormente utilizando MTD 2 y sondas de hibridación con elementos de inserción IS6110 decontaminándose realizándose tinción de Ziel-Nelssen, cultivo y sonicación, en nuestro estudio nosotros encontramos una baja sensibilidad en la baciloscopia así como VPNP Y VPNP para Gen probe MTD bajo pero con buena sensibilidad y especificidad, concluimos que la prueba es útil y su gasto está justificado, si se limita su uso a las muestras con baciloscopias positivas

Abstract

Tuberculosis is a global health problem is estimated that one third of the world population is infected with a strain of Mycobacterium Tuberculosis in latency. The ability of M. latent tuberculosis to enter is one of the major challenges for global disease control.

For the establishment of lung infection, microorganisms must arrive by inhalation to the alveolar spaces, which are engulfed by pulmonary macrophages complexity of this organism lies in the composition of their cell walls contain enzymes that are able to detoxify free radicals and interfere with traffic events and intracellular signaling.

The initial diagnosis is clinical but the clinic is not enough for what methods should be complemented with accessories such as the tuberculin test, smear stained with Ziel-Nelsen, Lowenstein-Jensen culture is considered the gold standard and is the only method that can gain sufficient assurance accurate diagnosis of TB. This study analyzed 120 samples of patients hospitalized at the National Medical Center Gaudencio González Garza. The aim of this study was to evaluate the usefulness of direct BAT samples from patients with Mycobacterium tuberculosis search using Gen-Probe MTD-2 correlated with sputum microscopy and culture and whether it can be used as a diagnostic test for its immediate benefits provide results within 24 hours of direct samples previously subjected to decontamination and then using MTD 2 and hybridization with probes IS6110 insertion elements were stained decontaminated Ziel-Nelssen, culture and sonication, in our study we found ourselves in a low sensitivity smear as well as VPNP And for Gen Probe MTD VPNP low but with good sensitivity and specificity, we conclude that the test is useful and justified spending, limiting their use to smear positive samples.

MARCO TEORICO

1.1. Historia de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es la enfermedad más antigua de la historia que se tiene registrada. Se han encontrado lesiones raquídeas características de la tuberculosis en restos humanos del período neolítico, y las pinturas en las tumbas egipcias ponen de manifiesto la formación clásica de la giba de la enfermedad de Pott ¹.

Desde los tiempos de Hipócrates hasta mediados del siglo XIX ni siquiera se admitía la naturaleza infecciosa y contagiosa de la enfermedad, sino hasta el siglo XIX que se empezó a aceptar la naturaleza infecciosa y transmisible de la tuberculosis, con los trabajos de Villemin 1865 y sobre todo de Robert Koch en 1882 donde demuestra que es una enfermedad infecciosa y transmisible consiguiendo aislar el bacilo del esputo de los tuberculosos de los 8.417.000 de noción o consumo indicaron que casi todos estos individuos tenían la enfermedad cavitaria de los pulmones. Casos 3.724.000 eran portadores de baciloscopia positiva tasa de 62/100.000 ^{2,3}.

Silvio 200 años después describió pequeños nódulos duros en los pulmones. En el siglo XVII esta enfermedad empezó a señalarse en los registros de salud pública, y se afirmó que era una enfermedad transmisible. En 1839, Johan Schölein sugirió por primera vez el nombre de tuberculosis (4)

En 1940 se iniciaron pruebas clínicas de los dos primeros fármacos eficaces con *M. tuberculosis* hubo la impresión de que los progresos científicos podrían dar como resultado acabar con una enfermedad que había plagado al género humano durante siglos ^{4, 5,6}.

Sin embargo la capacidad para mutar y desarrollar resistencia a los antibióticos por parte de *Mycobacterium tuberculosis* acabaría por hacer fracasar el único tratamiento para tuberculosis ^{4, 5, 6,7}.

1.2 Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis sigue siendo en el inicio de este nuevo milenio, la enfermedad infecciosa humana más importante que existe en el mundo a pesar de los esfuerzos que se han invertido para su control en la última década. La OMS declara en 1993 a la TB como la emergencia de salud a nivel mundial, los países con escasos recursos económicos donde vive el 65% de los casos de TB, las principales limitaciones son la deficiente infraestructura sanitaria y la extrema situación de pobreza, en los países de recursos económicos medios vive el 30% de los casos de TB ⁸.

Las pésimas cifras actuales de infectados, enfermos y muertos por esta vieja endemia obligan a realizar una profunda reflexión de lo que realmente está fallando en el control de una enfermedad curable desde hace más de 40 años y prevenible en la comunidad desde hace ya varias décadas, en 1999 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que se produjeron en el mundo 8.400.000 nuevos casos mismos datos que obligaron a declarar a la TB como una emergencia de salud a nivel mundial ⁸.

La TB es una enfermedad infecciosa y transmisible esto hace que cada caso de TB no solo implique un sufrimiento individual para el enfermo que la padece sino que la comunidad que le rodea también se puede ver afectado por su capacidad de transmitirla, la única forma de cortar la transmisión de la TB es realizar un diagnóstico

lo más precoz posible y sobre todo conseguir la curación de cada caso de enfermedad ⁸.

Existen múltiples especulaciones sobre el origen de la TB en la especie humana situándose como una de las enfermedades más antiguas que han afectado al hombre el microorganismo productor de esta enfermedad es uno de los exponentes más fieles de la presión selectiva a la que han sido sometidas muchas especies y de una capacidad de adaptación a medios adversos realmente insuperable *Mycobacterium* tiene su hábitat natural en el agua y la tierra, ha ido desplazándose paulatinamente hacia las poblaciones más vulnerables del planeta o sea hacia aquellos lugares donde la extrema pobreza no solo asegura su subsistencia y transmisión sino también donde los escasos recursos económicos no permiten la más mínima lucha contra este microorganismo, por lo tanto sigue siendo en los inicios del milenio la enfermedad infecciosa humana más importante que existe en el mundo y el patógeno que mayor número de muertes sigue produciendo fatídico primer puesto en el que compite con el virus de la inmunodeficiencia humana VIH ^{8,9}.

La magnitud del problema de TB parece gigantesco desde una perspectiva global, en 1990, el número de nuevos casos de todas formas de TB en los países en desarrollo era de 7.1 millones. Kochi estimo que había 7.6 millones de nuevos casos de TB en los países en desarrollo y 400 000 nuevos casos adicionales en los países industrializados, lo que lleva al número total de 8 millones de nuevos casos de TB cada año. Por tanto, se estima que el 95% de los casos de TB se producen en los países en desarrollo y que sólo ocurren en los países industrializados. El mayor número estimado de casos (cerca de cinco millones) parece encontrarse en Asia ^{8, 9,10}.

Sin embargo, las tasas estimadas más elevadas se encuentran en África. Murray y colaboradores calcularon una tasa de 229 casos por cada 100 000 habitantes en África del sub Sahara y Kochi ha estimado un promedio de 272 casos por cada 100 000 habitantes en la región africana ¹⁰.

Según el Informe de la OMS de 1989 en los países en desarrollo se producen 1.3 millones de casos y 450 000 defunciones de TB en niños menores de 15 años de edad. Sin embargo desde el punto de vista económico el número más grande de casos y defunciones se concentran en el grupo más productivo de la población (15 a 59 años); 70 a 80% de los casos corresponden a este grupo de edad ^{10,11}.

La tuberculosis parece ser la causa principal de muerte como consecuencia de infección por un solo agente patógeno en el mundo, y se estima que ocasiona 7% de todas las defunciones y 26% de las que se pueden prevenir en potencia en el mundo. Actualmente la tuberculosis es la cuarta causa de muerte por agentes infecciosos, sólo después de otras infecciones respiratorias. Del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA) y de infecciones gastrointestinales. Basados en los resultados de la prueba de tuberculina, se estima que aproximadamente la tercera parte de la población mundial (2 mil millones de individuos) se encuentran infectados por alguna cepa de MTC en estado latente. De estos 14.6 millones representan individuos con tuberculosis activa, 8.9 millones de los cuales surgieron durante 2004, falleciendo 1.78 millones durante el mismo período ^{8, 10,11}.

Pese a los esfuerzos realizados a nivel mundial y a los programas TAES y TAES-Plus (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) implementados por la OMS, aún no se ha tenido éxito en el control de esta enfermedad ¹².

La tuberculosis en estado latente puede evolucionar a tuberculosis activa cuando un individuo entra en un estado inmunocomprometido (desnutrición, inmunodeficiencias, trasplantes o diabetes mellitus, enfermedad que en nuestro país es otro problema de salud pública ¹³.

Existen incrementos de los casos notificados de TB siete de 14 países europeos occidentales (Austria, Dinamarca, Irlanda, Italia, Países Bajos, Noruega y Suiza) E principal factor causante de la mayor parte de estos aumentos parece ser la inmigración desde países en los que la prevalencia es más elevada, sin embargo un estudio en Italia experimentaron TB en 11.4% de los casos de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) durante 1988 a 1989 ¹³.

La tuberculosis sigue siendo en el inicio de este nuevo milenio, la enfermedad infecciosa humana más importante la población infectada es de 1 900 millones, enfermos con TB actual 16 millones, casos nuevos cada año 8.8 millones muertes por año 1.7 millones, muertes por TB y VIH 230 000 mil, el 98% de las muertes ocurren en países en desarrollo ¹³.

La tuberculosis pulmonar es un problema de salud pública en México; afecta a cualquier edad, con mayor frecuencia a la población en edad productiva y de igual forma a hombres y mujeres, se considera que un caso bacilífero que no recibe tratamiento puede infectar, por año, de 10 a 15 personas. En México se ha identificado su registro de casos y mayor asociación con diabetes mellitus, virus de inmunodeficiencia humana, desnutrición y adicciones principalmente el alcoholismo, lo cual ha venido a agravar el perfil de tuberculosis. ¹³.

Las actividades de prevención y control de la tuberculosis se iniciaron en México durante la primera década del siglo XX. ^{14,15}

En el año 2000 en México se replantea el programa de Tuberculosis multifarmacorresistente con la finalidad estratégica de atender y prevenir mayores problemas en el futuro.¹⁶

En México, durante los últimos 10 años, la morbilidad por tuberculosis pulmonar mantuvo una tendencia estacionaria durante la primera mitad años de la década, ascendente a partir de 1994, alcanzando una cifra máxima de 20.6 casos por 100 000 habitantes en 1998 para descender hasta 15.6 casos por 100 000 habitantes en el año 2000. En el estado de Tlaxcala, y como cifra máxima 38 por 100 000 en el estado de Tamaulipas. Los estados con incidencias mayores fueron Tamaulipas, Baja California, Guerrero, Veracruz, Nuevo León, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Yucatán, Aguascalientes, Puebla y Jalisco, no se observa diferencia por género de edad más afectado es el de la población en edad productiva.¹⁶

Los estados con tasas más altas de tuberculosis en la población pediátrica son : Baja California (18.5); Tamaulipas(7.9); Baja California Sur (7.5); Colima (7.5); Sonora (7.2); Guerrero (6.9); Chiapas (6.8) y Nayarit (5.7) recordando que la tasa nacional es de 3.7 casos por cada 100mil menores de 18 años.^{17,18.}

Distrito Federal casos 602, tasa 6.84, defunciones 122 tasa 1.39 (SSA/DGE) tasa por 100,000 habitantes^{17,18.}

México ocupa el 3er lugar de incidencia, los casos de Tuberculosis pulmonar (TBP) 15432 es decir 15 de cada 100 000 muertes por TB 2.8/100 000 se notifican 68145 casos pero se estima que en realidad sean de 116 000 a 170 000^{19.}

La distribución de casos de TB por países también difiere dentro de una misma región desde ha ya varios años se ha estimado que el 80% de la carga de TB en el mundo se está produciendo en 23 países concretos que han sido declarados prioritarios por la OMS son los países más poblados a la cabeza de todos ellos se encuentra la India

con 1,847 000 nuevos casos estimados en 1999, la TB es una enfermedad curable desde hace más de 40 años y de la que se conocen desde hace 30 años.

Aún es más triste observar las tremendas diferencias que existen entre las distintas zonas del mundo y así, mientras la enfermedad continua en la actualidad completamente descontrolada en la gran mayoría de los países pobres en las naciones desarrolladas la TB declina desde hace más de un siglo ²⁰.

La posibilidad de tuberculosis en el paciente transplantado es de 50% en los primeros 6 meses y de 60% durante el primer año en pacientes con transplante de médula ósea, con neoplasias sólidas, insuficiencia renal crónica con o sin diálisis, desnutrición grave, por la administración prolongada de esteroides u otros fármacos inmunosupresores, pacientes por VIH 50%, neoplasias sólidas 1-36%, hemodiálisis 10-15%, neoplasias hematológicas 4-15%.²¹

En nuestro país, según un reporte editado por el Comité Nacional de Lucha contra la Tuberculosis y Enfermedades de aparato respiratorio mueren 5 mil mexicanos al año por esta enfermedad, se conocen cerca de 30 mil casos nuevos por año y se infectan cerca de 1,000 diariamente, además, 20% de pacientes con VIH-SIDA mueren por tuberculosis y es la séptima causa de muerte en la población económicamente activa.

La tuberculosis infantil representa el 5.3% del total de casos reportados: las formas clínicas más frecuentes son: pulmonar, ganglionar, renal y meníngea la edad promedio de las defunciones en la población menor de 18 años es de 11±6.7 años, que representan poco más de 10 mil años de vida y más de 6,500 años productivos perdidos.²²

1.3 Bacteriología de *Mycobacterium tuberculosis*

En la actualidad el género *Mycobacterium* se reconocen en la actualidad por lo menos otras 53 especies. Desde el punto de vista clínico, *M. tuberculosis* es el miembro más importante del género a causa de su potencial patológico²³.

Los miembros del género *Mycobacterium* son bastoncillos rectos o ligeramente incurvados cuyo tamaño varía entre 0.2 a 0.6 μm de ancho por 1.0 a 10.0 μm de largo, no esporulados, inmóviles, aerobio estricto, ácido-alcohol resistentes²³.

No produce endosporas presentan una pared celular muy característica, debido a su alto contenido lipídico, la cual permite que colorantes como la carbolfucsina sean retenidos por la bacteria, incluso después de llevar a cabo un lavado con alcohol-ácido (ácido-alcohol resistentes). El contenido de lípidos de la pared celular es rico, y está constituido por ácidos grasos α -alquílicos y β -hidroxílicos de peso molecular elevado. Estos ácidos micólicos no son únicos del género, pues se encuentran también en los géneros *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*. La longitud de la cadena difiere entre estos géneros, y las micobacterias tienen el número más grande de átomos de carbono (60 a 90) en la estructura^{23,24}.

La estructura celular consta de una gruesa pared, separada de la membrana celular por el espacio periplasmático, con cuatro capas la más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico con cortas cadenas de alanina, a diferencia de *M. leprae* que posee glicina, esta capa es

el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente hay otras 3 capas compuestas por un polímero de arabinosa y galactosa, otra formada por ácidos micólicos y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos, el factor cordón llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las micobacterias virulentas, y los micósidos que son al igual que el anterior glicolípidos^{23, 24, 25, 26,27}.

La composición de la envoltura celular de las micobacterias es una característica distintiva de esta familia de microorganismos, ya que además de presentar a la peptidoglicana contienen micolil-arabinogalactano, formado por polímeros de arabinosa y galactosa, que se encuentran esterificados a los ácidos micólicos; otro componente de la envoltura es la lipoarabinomanana (LAM), formada por residuos de D-arabinosa, D-manosa y ácidos micólicos; (Fig.2). También se encuentran lípidos como los glicopeptidos, glicolípidos fenólicos, sulfátidos, ceras, fosfolípidos y esterres de trehalosa^{23, 24, 25, 26,27}.

El contenido de lípidos de la pared celular es rico, y está constituido por ácidos grasos alfa-alquílicos y B-hidroxiclicos de peso molecular elevado. Estos ácidos micólicos no son únicos del género, pues se encuentran también en los géneros *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*. La longitud de la cadena difiere entre estos géneros, y las micobacterias tienen el número más grande de átomos de carbono (60 a 90) en la estructura^{23, 24, 25, 26,27}.

Su genoma posee altas proporciones de Guanina y Citosina (G+C) en un 64-72% respectivamente. La morfología colonial varía entre las diferentes especies, desde lisas a rugosas y desde pigmentadas a no pigmentadas, el color de las colonias

puede ser crema, blanco, amarillo o anaranjado. Algunas especies requieren luz para sintetizar pigmentos (fotocromógenas), y otras los sintetizan tanto en presencia como en ausencia de su luz (escotocromógenas) (**Fig.1**).^{23, 24, 25, 26,27}

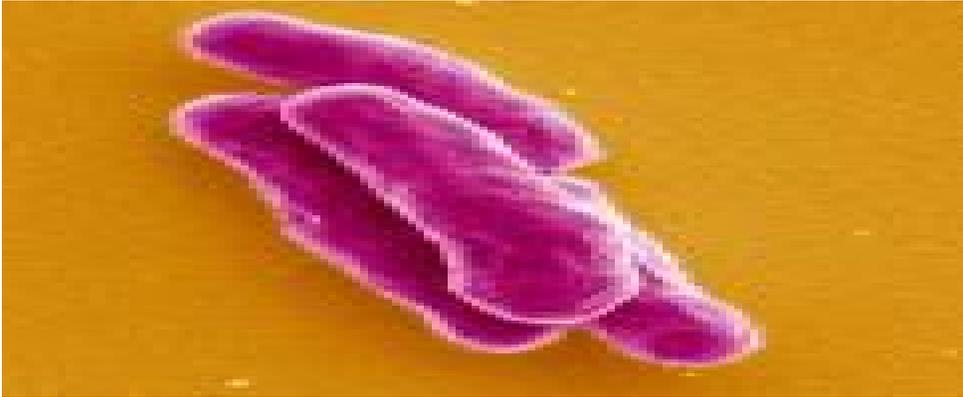


Fig. 1 Morfología de Mycobacterium tuberculosis
Tomado de [http://www.antirak-center.ru/upd/mycobacterium tuberculosis](http://www.antirak-center.ru/upd/mycobacterium_tuberculosis)

El crecimiento de las colonias varía según la especie, con tiempos de generación que van desde 2 hasta 200 horas (fig. 1). Las temperaturas óptimas de crecimiento varían desde 30 a 45 ° C. La mayoría de las especies se adapta a crecer en sustratos simples, utilizando amonio y aminoácidos como fuentes de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono en presencia de sales minerales. Las micobacterias son muy resistentes a la desecación. El medio ambiente en el que se encuentran constituye un factor muy importante para su viabilidad cuando se expone a la luz solar directa, los bacilos tuberculosis de los cultivos son destruidos en 2 horas, las micobacterias son más resistentes a la desinfección con productos químicos que otros microorganismos formadores de esporas, probablemente como consecuencia de su contenido en lípidos. Son sensibles al calor húmedo y destruido por las temperaturas de pasteurización^{23, 24, 25, 26,27}

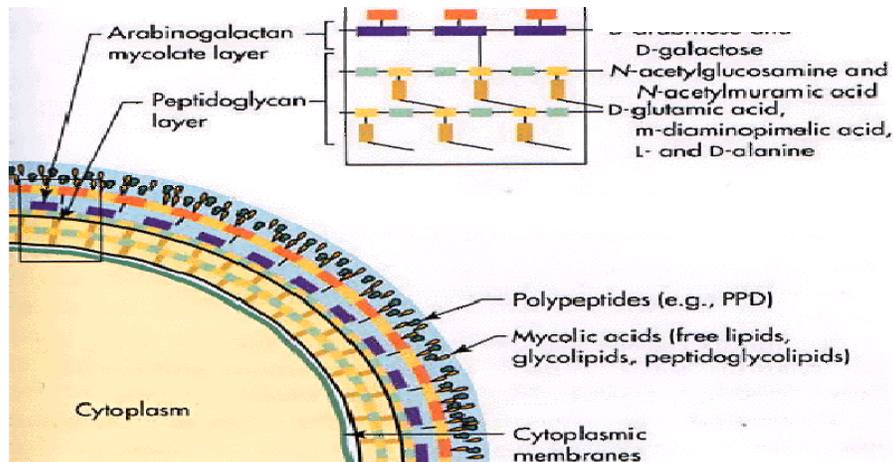


Fig.2 Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. Los ácidos micólicos están unidos a la capa de arabinósido galactosa en el lado de la cadena de arabinósido. Los enlaces de los ésteres de fósforo unen la capa de arabinogalactano a la capa de peptidoglicanos subyacentes en la subunidad del ácido murámico. Wayne

1.4 Patogénesis e Inmunología de la Tuberculosis

La infección inicial por el bacilo se transmite por el aire. Como *Mycobacterium tuberculosis* no contiene enzimas que le permitan penetrar por el moco, los microorganismos deben encontrarse en partículas de tamaño suficientemente pequeños menos de 5 μm para penetrar en la zona alveolar, sitio en el que no hay moco. Aunque no se conoce la dosis infecciosa mínima de *M. tuberculosis* para el hombre, en conejos y cobayos puede bastar con uno a tres microorganismos vivos los macrófagos alveolares residentes se encuentran inactivados los monocitos recién llegados al sitio no podrán matar a *M. tuberculosis* intracelular, que se duplicará dentro de los macrófagos y aumentará en número con rapidez. Durante este periodo antes que ocurra el desarrollo de la inmunidad específica, es cuando los microorganismos aparecerán en los ganglios linfáticos que drenan la región. En seguida sobrevendrán bacteriemia o diseminación hematogena^{28, 29,30}.

Tras varias semanas de crecimiento no inhibido de *M. tuberculosis*, sobreviene una reacción inmunológica que da por resultado interrupción del crecimiento bacteriano. Pueden quedar eliminados por completos los microorganismos en el sitio de infección inicial (infección primaria) (Fig. 3). Sin embargo, en los sitios de diseminación bacilar por vía hematológica los microorganismos pueden persistir pero con crecimiento detenido. Meses a años después, por motivos que no han podido dilucidarse aún el microorganismo empieza a reproducirse con mayor rapidez y da como resultado desarrollo de tuberculosis sintomática aunque estas lesiones pueden encontrarse en cualquier sitio del cuerpo, se observa más a menudo en ápices pulmonares, huesos, ganglios linfáticos, meninges y riñones se cree que las tensiones tisulares elevadas de oxígeno son un factor de gran importancia en la localización y el crecimiento sostenido de *M. tuberculosis* en estas localizaciones.

Existen factores de virulencia como el factor cordón conocido ahora como dimicolato de trehalosa, tiene actividades tóxicas, pero es dudosa su función como factor de virulencia, hay sulfolípidos en las cepas virulentas de *M. tuberculosis* que intensifican la toxicidad del factor cordón, se encuentran micósidos de superficie específicos de especie (glucolípidos) que constituyen una zona transparente a los electrones alrededor de los microorganismos^{31, 32, 33,34}.

El lipoarabinomano (LAM) es un constituyente de tipo polisacárido de la pared celular principal que puede actuar como factor de virulencia por sus diversas interacciones comprobadas con el sistema inmunológico del huésped. El LAM inhibe, del mismo modo, la producción de interferon gamma (IFN- γ) y funciona como depredador de los radicales libres de oxígeno^{31, 32, 33,34}.

Latencia La capacidad *M. tuberculosis* para entrar en latencia representa uno de los principales obstáculos para el control mundial de la enfermedad. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos que capacitan a *M. tuberculosis* para llevar a cabo la transición de un crecimiento activo a un estado latente, así como los involucrados en la sobrevivencia y en la reactivación, son fundamentales para plantear una nueva estrategia para erradicar la enfermedad ^{31, 32, 33,34}.

En fisiología bacteriana, el término “latencia” se emplea para definir un “estado reversible de la baja actividad metabólica en el cual las células pueden persistir por períodos largos sin dividirse. Algunos de los factores que han sido considerados para el inicio de la latencia incluyen la falta de nutriente, los valores extremos de pH y la falta de oxígeno ^{31, 32, 33,34}.

La hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) y la inmunidad mediada por células (IMC) inhiben el crecimiento intracelular de los bacilos tuberculosos en el caso de la IMC los monocitos se reclutan primero en el tubérculo o granuloma por citocinas producidas por las células T sensibilizadas, y a continuación activan otras citocinas para que destruyan a los microorganismos intracelulares. Los monocitos se diferencian en células epitelioides durante este proceso. La HTR es un mecanismo por medio del cual se destruyen los macrófagos no activados cargados de bacilos. Esto elimina un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano, pero ocurre por un proceso de necrosis caseificante y a costa de los tejidos del huésped. Si se licua el foco caseoso, el ambiente vuelve a convertirse favorable para el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis* ^{35, 36, 37, 38,39}.

Se ha demostrado en estudios experimentales que después de la inmunización de ratones con BCG o cepa Erdman de *M. tuberculosis* los linfocitos esplénicos transfieren al ratón virgen, de manera adoptiva inmunidad protectora a esta infección contra una carga aerógena de *M. tuberculosis* virulenta.

La transferencia de inmunidad protectora y HTR es dissociable, pues cada fenómeno resulta mediado por diferentes poblaciones de linfocitos esplénicos. Desde el punto de vista funcional, los linfocitos CD4+ se pueden dividir en células T protectoras, que aparecen pronto, producen grandes cantidades de IFN- γ se relacionan temporalmente con el principio de eliminación bacteriana, y las células T citolíticas que se incrementan en número más tarde. Las células CD8+ producen también IFN- γ y desempeñan una función menor en la inmunidad protectora^{35, 36, 37, 38,39}.

Como agente patógeno intracelular facultativo, *M. tuberculosis* se duplica dentro de los fagocitos mononucleares. El interferon Gamma (IFN- γ). Estimula la destrucción intracelular de *M. tuberculosis*. Dada la interacción compleja de las citocinas para regular la función efectora del fagocito mononuclear contra las micobacterias es de gran interés que la ingestión de micobacterias induce expresión de citocinas activadoras y desactivadoras de macrófagos^{35, 36, 37, 38,39}.

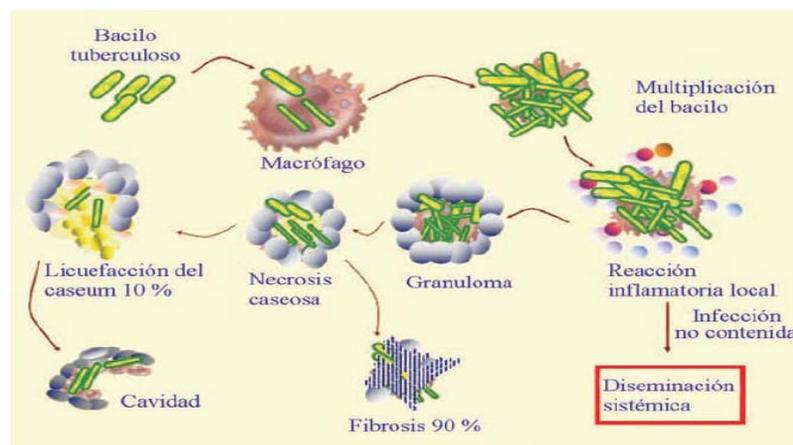


Fig. 3. Respuesta inmunitaria de Mycobacterium tuberculosis. Bacteriología Médica

Durante la primo infección el 95% de los pacientes permanecen asintomáticos y solo el 5% desarrollan enfermedad aparente, este proceso puede tener lugar en cualquier momento de la vida y se inicia con la inhalación de partículas cargadas de bacilos por parte de una persona no expuesta previamente. Los bacilos tuberculosos se encuentran en la región alveolar con tres tipos de células que potencialmente se oponen a la infección los macrófagos alveolares en la luz y las células “natural killer” las mycobacterias inhiben los sistemas bactericidas de estas células se puede comprender que en esta fase predomine el crecimiento bacteriano todos los mecanismos bactericidas macrófagos son anulados por productos derivados de las mycobacterias, así los glicolípidos inhiben la fusión fagolisosomal, otros componentes alteran el pH ácido lisosomal dificultando la acción enzimática , la catalasa destruye al peróxido de hidrogeno y diversos componentes micobacterianos inhiben la generación de superóxido esta fase termina con la destrucción de los macrófagos y el crecimiento intracelular de los bacilos ^{35, 36, 37, 38,39}.

1.5 Características de la tuberculosis

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infecciosa causa por micobacterias del “Complejo Mycobacterium tuberculosis” (MTC), que incluye a las especies *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti*, y *M. tuberculosis*. Afecta principalmente a los pulmones (tuberculosis pulmonar) pero también al sistema nervioso central, al sistema linfático, al sistema circulatorio, al aparato genitourinario, a los huesos y a las articulaciones ^{40,41}

Se denomina tuberculosis al reconocerse que la lesión pulmonar característica consistía en la formación de un nódulo limitado ó “tubérculo”, en el que existe una proliferación celular reactiva, junto al depósito de una materia amorfa, amarilla y densa, parecida al queso: “materia caseosa” Fig. 4.

Los principales síntomas de la tuberculosis pulmonar son: tos productiva con duración de más de tres semanas, dolor al respirar y toser, pérdida de peso, fatiga, fiebre ligera, sudoración nocturna, estornudos y pérdida de apetito ^{40, 41,42}.

Para que se establezca la infección pulmonar, los microorganismos deben llegar por inhalación a los espacios alveolares, donde son fagocitados por los macrófagos pulmonares. La pared celular micobacteriana, tiene una gran cantidad de enzimas capaces de detoxificar radicales libres y la capacidad de las micobacterias de interferir con los eventos de tráfico y señalización intracelular, les permite ocupar un fagosoma inmaduro, por lo que escapan de los mecanismos microbicidas del macrófago no activado y se replican en su interior. Sin embargo, las micobacterias son internalizadas también en células dendríticas locales, que migran a los nódulos linfáticos cercanos donde activan células T, las cuales retornan al pulmón e incrementan la respuesta antimicrobiana mediante el reclutamiento y activación de macrófagos adicionales. ^{40, 41,42}

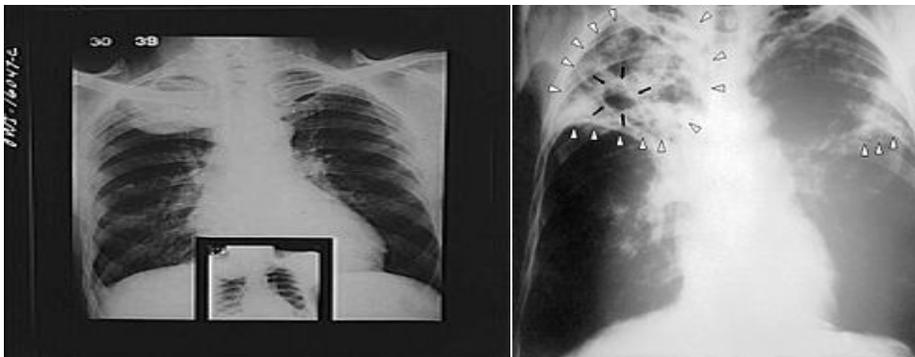


Fig. 4 Las lesiones típicas radiológicas son apicales, en hemitorax derecho, en segmentos posteriores y generalmente formando cavidades tomado de la Enciclopedia libre wikipedia

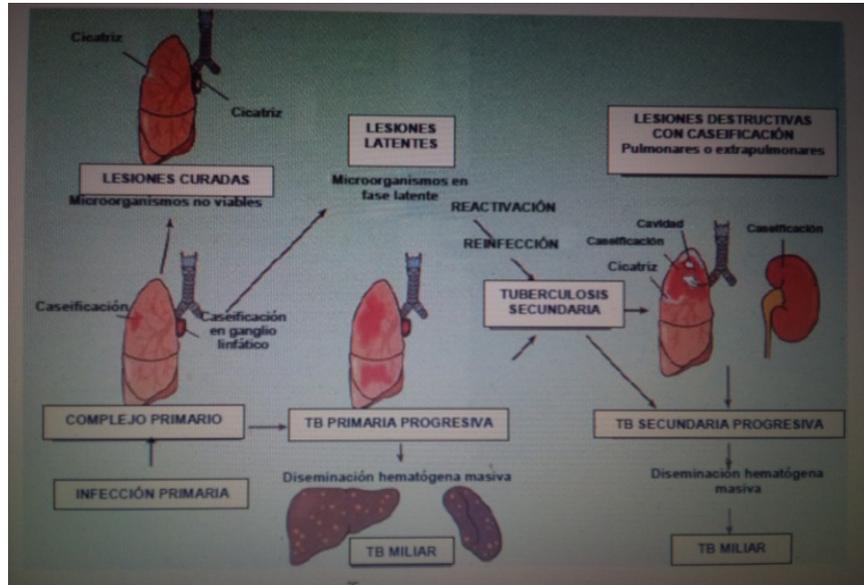
Esta capacidad de la micobacteria para interferir con la maduración celular está disminuida cuando este microorganismo se internaliza en los macrófagos que han sido activados por interferon gamma (IFN- γ). En la mayoría de los individuos, esta comunicación entre las ramas innatas y adaptativas del sistema inmunológico pueden controlar la infección sin que el huésped presente una sintomatología perceptible.

El control de la infección ocurre mediante la formación de granulomas en el sitio de primoinfección y en los ganglios linfáticos del hilio pulmonar, dichas estructuras son producto de una reacción de hipersensibilidad tipo IV inducida por las micobacterias, y consiste de un núcleo central de necrosis caseosa amorfa rodeada por una primera capa de macrófagos activados y células de Langhans, que contienen dentro de sus fagosomas a las micobacterias ^{43.44 45}.

Hacia el exterior del granuloma se encuentran capas mixtas de linfocitos T y B, células dendríticas, neutrófilos, fibroblastos y componentes de la matriz extracelular que sellan el granuloma y que participan en su mantenimiento y en el aislamiento de la infección ^{43.44 45}.

El 95% de los individuos infectados con TB controlan al bacilo mediante la formación de granulomas, sin embargo, las micobacterias no son eliminadas de su interior y pueden persistir por periodos largos conservando el potencial de reiniciar el crecimiento y eventualmente causar una tuberculosis activa. Se estima que del 5 al 10% de las tuberculosis primarias pueden reactivarse causando progresión de las lesiones primarias a una enfermedad diseminada e incluso la muerte. Se sabe también de individuos con tuberculosis pueden sufrir una reinfección por una cepa diferente (Fíg.5). ^{43.44 45}.

El espectro de la tuberculosis inicia con una infección pulmonar primaria autolimitada, pasa por fases intermedias de la enfermedad hasta producir tuberculosis diseminada y muerte ^{43,44 45}.



Fíg.5 Evolución de la tuberculosis, Mycobacterium llega por inhalación a los espacios alveolares estableciéndose así la infección primaria en pulmón esta es controlada por la formación de granulomas donde las micobacterias permanecen en latencia, y en cualquier momento se activa y que puede progresar a una enfermedad diseminada.

La infección en niños es paucibacilar y el contagio se produce desde un adulto bacilífero a un niño. El cuadro predominante es el pulmonar, la mayor parte de los niños que se infectan no desarrollan síntomas. Otra proporción de los pacientes tienen bajo grado de fiebre, tos escasa y decaimiento, la lesión segmentaria del pulmón se desarrolla con mayor frecuencia en los niños < 1 año (40%) contra un 15% en los niños mayores ^{40, 41,42,43,44 45}.

Cuando el paciente presenta síntomas puede observarse: fiebre de predominio nocturno y de bajo grado, tos seca y luego expectoración purulenta, disminución de

peso, anorexia sudoración nocturna, irritabilidad y falla en el crecimiento, taquipnea y disnea se presenta cuando existe afectación del parénquima en forma significativa.

La forma clínica más frecuente es la afectación lobar puede estar afectado cualquier lóbulo y en un 25% puede haber más de un foco. La neumonía y la caverna tuberculosa se presentan con poca frecuencias en niños es más frecuente en adultos
40, 41,4243.44 45

1.6 Diagnóstico de Tuberculosis

1.6.1 El diagnóstico inicial es **clínico** se realiza con alta sospecha de acuerdo al cuadro clínico del paciente pero no es específico al igual que la radiografía es una técnica muy sensible para el diagnóstico de TB pulmonar en pacientes inmunocompetentes, aunque es completamente inespecífica ya que no hay ningún signo patognomónico por muy sugestivo que parezca. Es por ello aunque existan lesiones radiológicas altamente sugestivas de TB, esto sólo indicara que se deben realizar los estudios microbiológicos oportunos para confirmar el diagnóstico ^{45,46}.

El diagnóstico de la TB se debe basar en un conjunto de métodos accesorios y la confirmación del mismo mediante técnicas microbiológicas, los métodos accesorios son muy inespecíficos e incluyen las manifestaciones clínicas, radiológicas y la prueba de tuberculina (PT). La TB carece de síntomas, hallazgos exploratorios, o datos analíticos propios que permitan diferenciarla con claridad de otras enfermedades respiratorias. El comienzo es, la mayoría de las ocasiones, insidioso y poco alarmante, por lo que pueden pasar varios meses hasta que se llegue al diagnóstico^{45, 46}.

El diagnóstico es clínico, radiológico y microbiológico, a la exploración física encontramos eritema nodoso, adenopatías, fístulas cervicales y submaxilares,

afección osteoarticular, disfonía, ante un paciente con sospecha de TB se le deben realizar siempre radiografía de tórax.

1.6.2. Prueba de tuberculina (PT) tiene un valor muy limitado en el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa, Sin embargo en niños, sobre todo en menores de 5 años, donde la prevalencia de la infección por *M. tuberculosis* es muy baja, la presencia de una PT positiva, indica, una infección muy reciente, con elevada probabilidad de producir enfermedad por progresión o primo infección. (fig. 5). Nunca una PT negativa puede excluir ya que el paciente puede encontrarse en alguna de las situaciones que pueden deprimir la respuesta a la tuberculina entre las que se incluyen la TB diseminada, TB pleural y los pacientes de edad avanzada frecuentemente tienen la PT negativa ^{45, 46, 47, 48,49}.



Fig. 6 Prueba de Tuberculina mediante la Técnica de Mantoux test cutáneo
Tomada de 200px.Mantoux
tuberculin skin test
Utiliza PPD como reactivo

Lectura e interpretación de la prueba de tuberculina la lectura se realiza a las 48 y 72 horas midiendo la induración consideramos positiva si el diámetro de la induración es mayor a 10mm.

Por lo tanto es necesario realizar un seriado de baciloscopias de esputo. Si estas son positivas se asume el diagnóstico. La base del diagnóstico en los países de escasos y medios recursos económicos sigue siendo la baciloscopia mediante la

tinción de Ziehl-Neelsen (Fig. 6) en base a su sencillez, rapidez, reproductibilidad, bajo costo su principal inconveniente es su baja sensibilidad que está condicionada por el grado de afectación, la calidad de la muestra y el tiempo que dedica el observador para informar una baciloscopia como negativa ^{46,47,48}.

Otra técnica básica en el diagnóstico de la TB es el cultivo sobre medio de Löwestein-Jensen (LW) único método que puede asegurar la certeza de TB y el único que es completamente válido tienen mayor sensibilidad que la baciloscopia, sin embargo los inconvenientes de la larga espera necesaria para obtener el resultado es de 6 a 8 semanas mínimo ^{46,47,48}.

El diagnóstico microbiológico convencional de la TB se base en cuatro etapas sucesivas: la tinción de la muestra para visión directa a través del microscopio (baciloscopia), el cultivo de medio sólido, la identificación por técnicas bioquímicas y las pruebas de sensibilidad a fármacos ^{46,47,48}.

Los frotis para la captura directa de las micobacterias pueden brindar la primera confirmación del diagnóstico clínico, y a menudo esto se logra en unas cuantas horas después de recolectar una muestra de esputo temprano por la mañana. Los frotis deben prepararse después de la digestión y descontaminación y de concentrar las muestras que tienden a estar contaminadas por flora normal, o directamente a partir de muestras estériles después de procedimientos de trituración o concentración.

En cierta época la tinción preferida era la de Ziehl-Neelsen pero en la actualidad es preferible emplear uno de los preparados de coloración fluorescente son más sensibles para identificar los bacilos acidorresistentes según el tiempo requerido para revisar la laminilla.

1.6.3 Baciloscopia *M. tuberculosis* es desde el punto de vista técnico tintorial, un germen Gram-positivo frecuentemente incoloro, por lo que habitualmente no es visualizado en muestras procesadas en forma rutinaria. La técnica clásica de Ziehl-Neelsen es la aconsejable y aporta al clínico una confirmación preliminar del diagnóstico, en la que *M. tuberculosis* se ve como pequeños bastones curvados de color rojo sobre un fondo de tonos azulados. Esta técnica es sencilla muy económica y reproducible. La no observación de Bacilos-ácido-alcohol-resistentes (BAAR) en muestra clínica no descarta el diagnóstico porque la baja sensibilidad de la baciloscopia puede dar muchos falsos positivos^{46, 47, 48, 49,50}.

La especificidad de la baciloscopia es muy elevada condicionada porque la ácido-alcohol resistencia es una propiedad común a todas las especies del género *Mycobacterium* y algunos hongos, por ello el resto de micobacterias ambientales se verán igual en la visión del microscopio, en la lamina y confundir al técnico poco experto. Una baciloscopia positiva sirve para admitir un caso de TB e indicar tratamiento (Fig. 6)

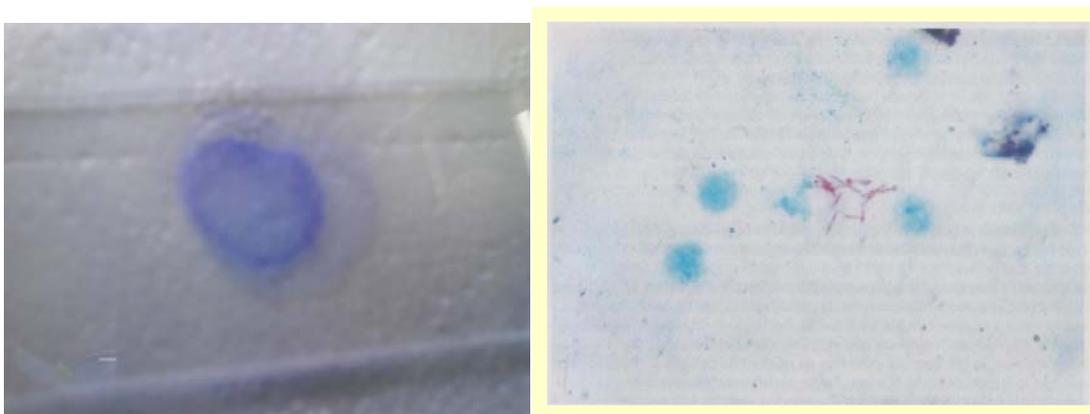


Fig. 7 Baciloscopia con Tinción de Ziehl-Neelsen requiere de calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene cerasAl suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias. Por otro lado, el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a las bacterias. Las bacterias que resisten la decoloración son de color rojo y la que no se ven de color azul, ya que se utiliza azul de metileno como tinción de contraste BARR es de color rojo.

1.6.4 El cultivo es el único método que puede asegurar el diagnóstico de certeza de TB y este depende en gran parte de los pasos previos de digestión y descontaminación de las muestras. La mayor parte de las muestras clínicas contienen una gran cantidad de microorganismos de la flora comensal que crecen con mayor rapidez que *M. tuberculosis* es necesario eliminar de la muestra estos microorganismos contaminantes que impedirán el desarrollo de las micobacterias, es importante conseguir la licuefacción de los restos orgánicos (tejidos, moco, suero y otros materiales proteínicos) que rodean a los microorganismos, para que los agentes descontaminantes puedan destruir las bacterias no deseadas. Así, sobrevivirán las micobacterias y podrán tener acceso a los nutrientes del medio. Las micobacterias son más resistentes a los ácidos y bases fuertes que otros microorganismos, lo que permite utilizar con éxito estas técnicas de digestión-descontaminación ^{48, 49,50}.

De manera tradicional, la micobacteriología ha empleado medios de cultivo a base de huevo (Lowenstein-Jensen) y a base de agar (Middelbrook 7H10 o 7H11) incubados en 5 a 10% de CO₂ durante seis a ocho semanas. Cada medio tiene ventajas y desventajas y se complementan entre sí. El sistema BACTEC para la identificación radiométrica de las micobacterias apareció a finales del decenio de 1970 y ha reunido a las categorías de las alternativas ordinarias en vez de considerarse nuevo ^{53,54}.

El fundamento de Löwenstein-Jensen los nutrientes de este medio basal, más los aportados por el agregado de mezcla de huevos, constituyen un rico soporte para el crecimiento de una gran variedad de micobacterias. El verde malaquita inhibe a gran parte de la flora acompañante. Con el agregado de glicerina se estimula el

crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, aunque gran parte de los *M. bovis* es inhibido. Agregando un 5% de Cloruro de Sodio (NaCl) se pueden seleccionar micobacterias tolerantes a la sal, sembrar previamente decontaminada sobre la superficie del medio de cultivo, incubar a 35 y 37°C a los 7 días de incubación se observa por primera vez si hubo crecimiento, luego observar cada semana hasta un total de 8 semanas. Las características morfológicas de las colonias de *Mycobacterium* son grandes, secas, amarillentas granulares y de *Mycobacterium avium* son lisas sin pigmentos ^{551, 52, 53,54}.

El cultivo tiene una serie de importantes ventajas que lo sitúan como el “patrón de oro” del diagnóstico y seguimiento de los casos de TB, los cultivos son mucho más sensibles que la baciloscopia, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por centímetro cúbico de muestra, el aislamiento en cultivo puro es necesario, permite, asegurar con certeza, la negativización y curación del paciente con el tratamiento (Fig.7).

Sus limitaciones son fundamentalmente el mayor inconveniente del cultivo deriva de la lenta capacidad de división de *M. tuberculosis*, el tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra y la emisión del resultado no sea inferior a 4-6 semanas en los medios sólidos convencionales tiempo excesivamente elevado para esperar un diagnóstico de certeza. Su lento crecimiento y su lectura manual han llevado a la búsqueda de técnicas más rápidas y sensibles.



Fig. 8. Cultivo en Medio de Löwestein-Jensen constituido por huevo, verde de malaquita, glicerol, asparaginasas, crece muy lentamente de 30 a 90 días a 37°C.

Los métodos de cultivo tradicionales siempre se han efectuado en medio sólido, utilizando como base el huevo coagulado (Löwenstein-Jensen), o el agar (7H10 y 7H11 DE Middlebrook) ^{51,52,53,54,55,56}.

Tiene ventajas, como recuperación incrementada, en especial cuando se combina con uno de los medios de cultivo ordinarios y disminución del tiempo para identificar los cultivos positivos; muchos laboratorios informan un tiempo promedio para la identificación de ocho a 14 días. Tienen también la ventaja de ser adecuado para empleo directo con pruebas de sonda de ácido nucleico, y por tanto reducen el tiempo requerido para la identificación de los microorganismos ácido-alcohol-resistentes una vez que se han descubierto. La desventaja principal del sistema BACTEC es el empleo de sustratos radioactivos y la necesidad de medidas instrumentadas especializadas. La adición más reciente a las alternativas de cultivo ha sido la adaptación del sistema Septi-Chek Becton Dickinson Microbiology Systems Hunt Valley MD para la micobacteriorología ^{56, 57, 58,59}.

En este se emplea el sistema de Middlebrook en caldo con una paleta que tiene medio de agar chocolate, agar Middlebrook y huevo semejante al agar de Lowenstein-Jensen. En diversos se ha demostrado que la recuperación en este sistema es comparable o superior a la lograda con el sistema BACTEC, y mejor que con cualquier medio ordinario; se puede combinar también con un medio adicional para incrementar la recuperación global^{56, 57, 58,59}.

El aspecto macroscópico de las colonias micobacterianas en medios sólidos ayuda a identificar al microorganismo y puede sugerir también la presencia de más de una especie, la morfología de las colonias se determina mejor en el medio de agar de Middlebrook 7H-10 translúcido en el cual se puede ver la textura.

Las pruebas bioquímicas más usadas en el laboratorio de micobacteriología es la prueba de niacina todas las micobacterias producen niacina pero la mayor parte siguen procesando este metabolito, M. tuberculosis no tiene esta capacidad y se acumula niacina en el desarrollo de las colonias como resultado de una vía metabólica bloqueada^{56, 57, 58, 59,60}.

De manera sistemática se emplean casi otras 20 pruebas bioquímicas en los laboratorios de 3 niveles para identificar a las micobacterias recuperadas de las muestras clínicas. Estas pruebas pueden requerir entre 20 minutos (catalasa termoestable) y varias semanas (catalasa semicuantitativa) para terminarse y a menudo requiere subcultivos en medios selectivos adicionales.

El cultivo líquido tiene la ventaja de tener una mayor sensibilidad sin embargo sus limitaciones más importantes son que tiene mayor tasa de contaminación, dificultad para reconocer cultivos mixtos y la incapacidad de observar la morfología de las colonias que los métodos sólidos si nos permiten^{56, 57, 58, 59,60}.

En ocasiones, ante casos de difícil interpretación con bacteriología negativa (diseminaciones hematógenas, TB extrapulmonar), o ante la sospecha de enfermedad neoplásica, es necesario recurrir a obtener muestras de biopsias para realizar el diagnóstico anátomo-patológico. Aquí el diagnóstico se basa en la observación de granulomas caseificantes, pero es necesario destacar que otras enfermedades pueden producir granulomas muy similares sobre todo el resto de micobacterias ambientales y algunos hongos. Esto hace que siempre sea necesario enviar una muestra de la biopsia al laboratorio de microbiología para que sea cultivada. En cualquier caso, es diagnóstico de alta probabilidad, que justifica iniciar tratamiento si el cuadro clínico y radiológico es sugestivo en espera de los cultivos^{56, 57, 58, 59,60}.

Existen diversos estudios realizados en diferentes partes del mundo con respecto a la sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) de los diversos métodos diagnósticos para *Mycobacterium tuberculosis* y los resultados fueron los siguientes (tabla 1).

TABLA 1.- Estudios de métodos diagnósticos para *Mycobacterium tuberculosis* utilizando baciloscopia y cultivo en diversos países.

AUTOR	PAIS	MUESTRA	BACILOSCOPIA	CULTIVO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
FONTANA	ITALIA	ORINA	SI	LWJ	100%	91%	86%	100%
BERGMANN	EEUU	SB	SI	LWJ	100%	93.4%	89.4%	100%
MUCIAL	EEUU	SB	SI	LWJ	96%	100%		
OSUMI	JAPON	SB L.PLEURA LCR	SI	LWJ	92%	80:85%		
PORTAELS	BELGAS RUANDA COLOMBIA	SB	SI	LWJ	86.9% 98%	92.2% 100%	52.5% 100%	99.3% 92%

1.6.5 Identificación mediante sondas genéticas

El desarrollo de la biología molecular ha permitido identificar secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) específicas de cada especie micobacteriana. Para hibridar con estas secuencias se ha preparado sondas genéticas, fragmentos de ácidos nucleicos complementarios marcados con isótopos radiactivos o sustancias cromógenas^{61, 62, 63}.

La sonda es un reactivo biológico constituido por un fragmento de ADN que posee una secuencia de bases complementaria a la de un fragmento del genoma de un microorganismo. Las sondas están marcadas con diversos indicadores fáciles de detectar: isótopos radioactivos (sondas calientes) o sustratos cromógenos (sondas frías). Cuando se libera el ácido nucleico de un microorganismo y después se desnaturaliza el ADN liberado se separan las dos hebras que forman la molécula de

ADN por procedimientos físicos a temperatura de 90 y 140 °C la sonda es capaz de fijarse (hibridarse) con un fragmento homólogo, si existe. La hibridación de la sonda a su fragmento homólogo se detecta fácilmente gracias al marcador que se ha incorporado ^{64,65,66,67,68}

Actualmente se dispone de sondas frías comercializadas por Gen-Probe para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*

El marcador más utilizado, por su gran poder discriminativo, ha sido el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), utilizando secuencias de inserción IS61.

10. El genoma de *M. tuberculosis* contiene entre 5 y 20 copias de IS6110 localizadas en posiciones variables a lo largo del cromosoma debido a su capacidad de transposición ^{68,69}.

Un gran progreso hacia la identificación rápida de las micobacterias fue el logrado cuando se introdujeron sondas de (Ácido desoxirribonucleico) ADN en el laboratorio clínico. En la actualidad solo una compañía comercial produce sondas de ADN. El sistema de prueba Gen.Probe.Accuprobe (Gen-Probe Inc. San Diego CA) se basa en la hibridación de ADN marcado conocido como (Ácido ribonucleico) ARN y (ARNr) ribosómico en el blanco del genoma de cultivo (o “desconocido”). El sistema de prueba emplea un éster de acridina unido a la sonda de ADN conocida como detector. Se produce luz cuando este éster se oxida por acción del peróxido de hidrógeno y se hidroliza con álcalis potentes, y el descubrimiento se efectúa al medir esta reacción quimioluminiscente. En numerosos estudios se indica un rendimiento elevado de las sondas micobacterianas. La sensibilidad y la especificidad de este sistema de prueba

se deben a diversos factores: el sistema de descubrimiento es muy sensible, puesto que la quimioluminiscencia es cerca de un millón de veces más sensibles que la fluorescencia temperatura y contracción de sal de la reacción se controla de modo que puedan efectuarse limitación a la hibridación el empleo de ARN como ácido nucleico blanco permite una amplificación de 1 000 veces las moléculas blanco, por último el ARNr se conserva en gran medida a través de las líneas filogenéticas lo que vuelve mínimos los efectos de los cambios mutacionales. La sonda para el complejo de la TB tiene especificidad y sensibilidad que se aproximan a 100% y solo se han informado desigualdades rara vez. Se dispone de sondas adicionales para el complejo de *M. avium*, *M. Kansaii* y *M. gordonae* con una sensibilidad y especificidad del 95% cuando se combina con el cultivo la identificación de las micobacterias con sondas pueden constituir un instrumento poderoso para las pruebas rápidas ^{70,71}.

Existen estudios donde se realizo detección directa con Gen-Probe de *Mycobacterium tuberculosis* en Cadiz donde se realizo el análisis de sensibilidad y especificidad utilizando el cultivo como medio líquido de referencia, se obtuvieron resultados positivos en 23 muestras todos fueron esputos excepto un aspirado bronquial. El cultivo en medio líquido y sólido fue positivo e n 19 y 15 muestras respectivamente la tinción fue positiva en 13, la sensibilidad fue del 100%, 98.2%, 82.6%, y 100% respectivamente. Ruiz reporta una sensibilidad y especificidad y valor predictivo positivo y valor predictivo, de 100%, 82.6% y 100% respectivamente realizados en cultivo, Sahagún reporta una sensibilidad del 40% cuando la muestra se trabaja directo con Gen Probe, Sánchez un 35-40% de sensibilidad Gen Probe en forma directa esto es mencionados por diversos estudios (Tabla 2). Que se han realizado

la sensibilidad y especificidad utilizando gen probe posterior a cultivo es del 98 % a 100% ^{72, 73, 74,75.76,77,78,79,80, 81, 82, 83, 84, 85, 86}

Tabla 2.- Estudios realizados con diversos métodos diagnósticos para *Mycobacterium tuberculosis* baciloscopia, Cultivo y Gen probé.

PRUEBA	BACILOSCOPIA	CULTIVO	GEN PROBE	GEN PROBE RESPIRATORIAS	GEN PROBE NO RESPIRATORIAS	GEN PROBE DIRECTO
SENSIBILIDAD	75-65	84/80	95			83
ESPECIFICIDAD	94-95	100-100	76	100	75	89
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	89-90	100-90	71			65
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	86-90	90-85	76			95

La técnica molecular MTD (GEN-PROBE AMPLIFIED *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test, bioMérieux), basada en la amplificación de rRNA del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, permite realizar el diagnóstico de la enfermedad con una especificidad cercana al 100%, aumentando además la sensibilidad respecto a la técnica de Ziehl-Nelseen (ZN) tanto en muestras respiratorias como no respiratorias. La Detección Directa de *Mycobacterium tuberculosis* (MTD) es positiva en aproximadamente la mitad de los esputos con ZN negativo y cultivo positivo; sin embargo, la utilidad de la misma en formas extrapulmonares es más limitada, y aunque su sensibilidad es mayor que la de la tinción, un resultado negativo de MTD no excluye el diagnóstico de tuberculosis. Una de las restricciones de esta técnica es su ineficacia para monitorizar el curso de la enfermedad, pudiendo proporcionar falsos positivos al detectar rARN de bacilos no viables hasta meses después del inicio del tratamiento. En estos casos la respuesta debe valorarse mediante cultivo, pues el resultado de éste no se ve afectado por la presencia de dichos bacilos ^{85,87.88, 89, 90,91.}

Es necesario señalar que la práctica de la MTD debe ir siempre acompañada de tinción y cultivo, y que los resultados de la misma han de valorarse junto con la información clínica de cada caso^{92,93}.

La alta sensibilidad y especificidad de la MTD hacen de ella una técnica excelente para el diagnóstico de tuberculosis, mejorando de forma notable la sensibilidad del ZN, especialmente en muestras poco bacilares. La técnica de MTD no es útil para monitorear el tratamiento^{94, 95}.

La positividad conjunta de ZN y MTD permite el diagnóstico de tuberculosis con casi total certeza sin necesidad de otras pruebas, los casos con ZN positivo y MTD negativa el diagnóstico de tuberculosis una vez descartado el falso positivo son sugestivos de infección por micobacterias diferentes del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (micobacterias atípicas)^{94,95}.

Existen diversos estudios realizados con Gen-Probe amplificado MTD (*Mycobacterium tuberculosis* prueba directa) pero ninguno es concluyente aun existen discrepancias respecto a esto y siempre se están sugiriendo correlación con el cultivo, siempre se han aplicado para la detección del complejo de *M. tuberculosis* en material clínico en paralelo a la microscopia directa o se han evaluado con MTD posterior a la obtención del cultivo, el método de MTD se basa en la amplificación de un determinado segmento de 16S rRNA. La detección del segmento amplificado se ve facilitada por las sondas de cadena sencilla etiquetados con éster de acridina. Los resultados de la hibridación se interpretan en RLU (relative Luz Unit) y las lecturas de los valores son superiores a 30 000 RLU se consideran positivos⁹⁶.

Gen probe es la primera prueba directa aprobada por la FDA para ayudar a diagnosticar las muestras con baciloscopia positiva y negativa, recientemente los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) le otorgan la importancia de la prueba de amplificación MTD en el diagnóstico de pacientes con sospecha de tuberculosis.

Existen diversos estudios donde reportan una sensibilidad de MTD 96.9% especificidad del 100% Valor Predictivo Positivo (VPP) 100% VPN 87.5% bactec 96.9% de sensibilidad, 100% especificidad 100% VPP 100% y Valor Predictivo Negativo (VPN) 887.5%, Lowestein Jensen 87.5% especificidad 100% VPN 100% Mildebrook sensibilidad 96.7% especificidad 100% VPP 100% VPN 87.5^{96, 97, 98}.

Las técnicas con capacidad de amplificar los ácidos nucleicos son rápidas con resultados en menos de 1 día y altamente sensibles pero tienen importantes limitaciones como su elevado costo, aportación de falsos negativos que hay que asociar siempre con la clínica.

El estudio realizado por Danrosoro valoró la utilidad de MTD-2 para Tuberculosis realizó la prueba de amplificación MTD-2 en 146 muestras (128 respiratorias y 18 no respiratorias) correspondientes a 136 pacientes.

Se procesaron 4.625 muestras para cultivo de micobacterias, obteniéndose 128 cultivos positivos para M. tuberculosis que correspondían a 70 pacientes.

La prueba de MTD-2 se realizó siempre que se obtuvo una baciloscopia positiva (47 muestras) y/o siempre que el clínico la solicitó expresamente (19 muestras). De las 75 que resultaron positivas, tras el estudio de las historias clínicas, se

valoraron como verdaderas positivas 53, y en 22 ocasiones los resultados fueron falsos positivos. En 47 ocasiones se aisló *M. tuberculosis* de modo que en 6 casos diagnosticados de tuberculosis el único resultado positivo fue el de la MTD.

De las 71 ocasiones en que la MTD resultó negativa, en 3 se aisló *M. tuberculosis* en cultivo (falsos negativos). En otras 5 ocasiones, los cultivos resultaron positivos aislándose micobacterias distintas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, las baciloscopias en 4 de ellos habían sido positivas, por lo que el resultado negativo de la MTD sirvió para discriminar el diagnóstico.

Finalmente, el número de resultados verdaderos negativos fue de 68. La valoración global de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba de MTD fue respectivamente: 95, 76, 71, y 96%. Los mismos parámetros para el cultivo fueron: 84, 100, 100 y 90% y para las baciloscopias: 75, 94,89y86%.

2.- Planteamiento del problema

El recrudecimiento de la Tuberculosis en años recientes y los escasos recursos han llevado a investigar la elaboración de técnicas simples para aumentar la sensibilidad de aislamientos de mycobacterias, pero muchos de estos requieren de demasiado tiempo para su aislamiento, otras técnicas tienen alto índice de error ya que algunas se basan en la percepción sin embargo la baja sensibilidad y especificidad de estas pruebas limitan la detección definitiva de la infección por lo que es necesario buscar pruebas para su identificación inmediata, el estándar de oro es el cultivo pero se requiere de 21 días y para como máximo a su identificación el retraso del diagnóstico significa mayor costo por estancia hospitalaria. Gen probe (MTD) ha demostrado buena exactitud diagnóstica en países de baja prevalencia analizando distintos tipos de muestra aspirado bronquial, líquido pleural, líquido peritoneal, orina, líquido cefalorraquídeo otorgando los resultados en 24 a 48 horas.

No se ha documentado la exactitud diagnóstica en México considerando un país de alta prevalencia, lo cual podría modificar el rendimiento de la prueba.

3.-Justificación

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis se ve limitado por la lentitud del cultivo 6 a 8 semanas y la baja sensibilidad de la baciloscopia por lo que es necesario contar con una prueba diagnóstica que nos de resultados inmediatos.

Gen Probe MTD se ha utilizado en diversos países de baja y alta prevalencia considerando a México como un país de alta prevalencia es importante evaluarlo y considerarlo como una herramienta diagnóstica inmediata, esto nos permitiría un diagnóstico más rápido por lo tanto permite iniciar tratamientos tempranos evitando incrementar más las resistencias y las estancias hospitalarias de los pacientes que permanecen en estudio disminuyendo los costos por estancia intrahospitalaria así mismo a menor estancia menor riesgo de adquirir alguna infección nosocomial Gen probe MTD no se ha probado en México que es de alta prevalencia considerando que la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica son dependientes de la prevalencia de la enfermedad.

En nuestro hospital los pacientes tienen patologías complejas y inmunocompromiso, se realiza trasplante renal, hepático, en su protocolo se requiere descartar presencia de tuberculosis las sondas de hibridación nos permitirían toma decisiones inmediatas en los pacientes con inmunocompromiso como son los pacientes con VIH en los que se les diagnostica co-infección con tuberculosis de acuerdo al estado de inmunosupresión se inicia o se retarda el tratamiento antirretroviral ya que en caso de combinar ambos tratamientos se corre el riesgo de presentar síndrome de reconstitución inmunológica por lo que consideramos que MTD puede ser una buena herramienta esto permitiría que ante la mínima sospecha de tuberculosis en cualquier

paciente se pudiera tener de inmediato el resultado esto evitaría que el paciente tuviera que esperar de 21 a 90 días para conocer el resultado, en los casos cuando el transplante está en límite de tiempo es complejo esperar perdiéndose oportunidades y aumentando la morbimortalidad por lo que Gen Probe MTD puede ser una opción en el futuro.

En pacientes oncológicos un resultado inmediato evitaría la toxicidad de drogas quimioterapéuticas incompatibles con los antifímicos o orientarnos a otras etiologías. Las infecciones del sistema nervioso central por el daño tan catastrófico que causa *Mycobacterium tuberculosis* a este nivel contar con una alternativa diagnóstica con resultado inmediato sería muy beneficioso una baciloscopia negativa no descarta el diagnóstico y habrá que esperar el cultivo para saber si fue o no correcto el manejo.

Este trabajo permitiría evaluar su utilidad y ver la factibilidad de incorporarla como una herramienta diagnóstica en nuestro hospital para ayudar en el diagnóstico, control de la enfermedad, porque el tener un resultado inmediato identificaría a los portadores y así disminuiría su diseminación que ha futuro los costos estimados asociados con un diagnóstico inexacto de la tuberculosis se ha documentado que es de 11.57 dólares.

Los métodos moleculares de identificación del bacilo, disponibles hoy en día, permiten la obtención de resultados en pocas horas, y esta rapidez conlleva un diagnóstico precoz que: evita las exploraciones complementarias, acorta el tiempo de hospitalización, disminuye el riesgo de contagio y permite iniciar un tratamiento específico sin necesidad de utilizar tratamientos empíricos

4.-Pregunta de investigación

¿Cuál es la validez de Gen probe MTD para diagnosticar *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pacientes del Centro Médico Nacional la Raza?

5.-Hipotesis

Existe una concordancia mayor al 80% entre la prueba de detección rápida gen probé MTD cuando se utiliza directamente en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con baciloscopia positiva o negativa y el cultivo.

6.- Objetivos

6.1 Objetivo general.

- ▶ Evaluar la exactitud de Gen Probe MTD para diagnosticar Mycobacterium tuberculosis en pacientes del Centro Médico Nacional la Raza.

6.2 Objetivos específicos.

- ▶ Determinar la presencia de BAAR en muestras clínicas mediante tinción Ziehl-Neelsen.
- ▶ Establecer diagnóstico (positivo o negativo) de *M. tuberculosis* según cultivo.
- ▶ Calcular la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud (likelihood ratio) de Gen Probe MTD respecto a cultivo.
- ▶ Calcular la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud (likelihood ratio) (positivas y negativas) de baciloscopia respecto a cultivo.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Prueba diagnóstica

7.2 Lugar del estudio: Laboratorio de Microbiología del Hospital General “Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional la Raza.

7.3 Población de estudio

Todas las muestras que se reciban en el laboratorio de Microbiología para búsqueda de *Mycobacterium tuberculosis* durante el período de Junio de 2010 al Marzo 2011

7.4 Selección de la muestra

Se procesaron muestras clínicas de origen pulmonar y extra pulmonar, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido de ascitis, médula ósea y orina se sembraran sin descontaminación previa si la toma fue supra púbrica, si la muestra tiene 2 ml se concentra por centrifugación.

7.5 Preparación de la muestra

Los materiales procedentes de biopsia se trituraran en el mortero en forma estéril y sembrada directamente. Esputos, lavados gástricos y abscesos normalmente contaminados se descontaminaran por medio de la técnica de Petroff con hidróxido de sodio al 4%. Las muestras se sembraran en 2 tubos de Löwestein -Jensen, previamente se realizara Gram con técnica de Zielh-Neelsen.

.

7.6 Técnica

La metodología se llevará a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor

- ▶ En un tubo de 200µl de tapón de lisis se añaden 15µl del producto decontaminado concentrado.
- ▶ Se sónica para destruir la membrana de una célula es un método físico posteriormente luego se agregan 25µl del reactivo de amplificación reconstituido.
- ▶ 200µl de aceite y 50µl. del lisado añadiéndolo por debajo de la capa de aceite.
- ▶ Los tubos se incuban a 95 grados durante 5 minutos y a 42 grados por 5 minutos.
- ▶ Después se añaden 25µl de la muestra enzimática y se incuba a 42 grados durante 2 horas y por último se
- ▶ adiciona 20µl. de reactivo de terminación y se somete a 42° grados por 10 minutos.
- ▶ Finalizada la incubación se vierten 100µl de la sonda reconstituida y se incuba a 60 grados por 15 minutos.
- ▶ Posteriormente se añaden 300µl de reactivo de selección y se mantiene a 60 grados por 5 minutos para hidrolizar el éster de acridina no hibridado.
- ▶ Se enfrían los tubos a temperatura ambiente 10 minutos y se leen por luminiscencia

FUNDAMENTO

En la actualidad, sólo una compañía comercial produce sondas de ADN. El sistema de prueba Gen probe.Accuprobe (Gen-Probe Inc., San Diego CA) se basa en la hibridación de ADN marcado conocido con ARN ribosómico (ARN r) en el blanco del genoma de cultivo (o desconocido). El sistema de prueba emplea un éster de acridina unido a la sonda de ADN conocida como detector. Se produce luz cuando este éster se oxida por acción del peróxido de hidrógeno y se hidroliza con álcalis potentes y el descubrimiento se efectúa al medir esta reacción quimioluminiscente.

7.7 Lectura:

- ▶ RESULTADOS
- ▶ Limite 30 000 RLU
- ▶ Incertidumbre: 20 000-29999 RLU
- ▶ Control Negativo:< 10,000
- ▶ control positivo >30,000

Al cultivo se le realizaran lecturas a los 5, 10, 15, 20, 25, 30,45 y 60 días de incubación a 37oC.

7.8 Criterios de inclusión

- 1.- Todas las muestras clínicas que se reciban en el Laboratorio Central del Hospital General Centro Médico Nacional la Raza que soliciten búsqueda de Mycobacterium tuberculosis.
- 2.- Muestras que cumplan con todos los requisitos de identificación y condiciones de transporte
- 3.- Todas las muestras que se les realizo Gram con técnica de Ziel-Neelsen positivos y negativos
- 4.- Todas las muestras que se les realizo cultivo en Löwestein-Jensen

7.9 Criterios de exclusión

- 1.-Cultivos contaminados
- 2.-Pacientes con antecedentes de haber recibido tratamiento previo con antifimicos aunque previa a la toma ya estuviera suspendido el tratamiento

7.1.1 Criterios de eliminación

1. Muestras en las que no se realice alguna de las pruebas establecidas (baciloscopia, cultivo, Gen Probe).

7.1.2. Variables

VARIABLE PREDICTORA

Gen-Probe MTD

VARIABLE DE RESULTADO

Cultivo

VARIABLE	TIPO	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICION
Gen Probe MTD	Variable predictora	Prueba diagnóstica para detección de ADN por medio de sondas de hibridación	≥ 30,000 URL en prueba gen probe	POSITIVO / NEGATIVO
Cultivo	Variable de resultado	Prueba para detección de crecimiento en medio enriquecido específico	crecimiento de Mycobacterium tuberculosis en medio de Löwestein-Jensen	POSITIVO / NEGATIVO

VARIABLE	DEFINICION	ESCALA DE MEDICION
Gen probe ordinal	Prueba diagnóstica para detección de ADN por medio de sondas de hibridación	Nominal
Baciloscopia	Método diagnostico que utiliza tinción para detectar Bacilos ácido- alcohol resistentes	Nominal dicotómica
Cultivo		Nominal dicotómica
Sensibilidad	Capacidad de la prueba para identificar correctamente la presencia de enfermedad	Intervalo
Especificidad	Capacidad de la prueba para identificar ausencia de enfermedad	intervalo
VPP	Probabilidad de que siendo la prueba positiva el sujeto tenga realmente la enfermedad	escalar
VPN ordinal	Probabilidad de que siendo la prueba negativa no presente el padecimiento	nominal

7.1.3 Cálculo del tamaño de muestra.

- ▶ Cálculo de la muestra

$$\text{Fórmula: } N = \frac{4z\alpha^2 P (1-P)}{W^2}$$

- ▶ 136 pruebas
- ▶ Proporción esperada P de 0.10 (10%) y una amplitud del intervalo de confianza de 0.10.

7.1.4. Método estadístico utilizado

El análisis de los datos se llevará a cabo mediante la utilización de estadística descriptiva

- ▶ El análisis de los datos se llevará a cabo mediante la utilización de estadística descriptiva frecuencias, moda, media, mediana.
- ▶ Se calcularán sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo a la prueba de detección rápida considerando el cultivo como “estándar de oro”.
- ▶ Se efectuarán pruebas de concordancia

7.1.5 Consideraciones éticas.

Investigación con riesgo mínimo.

- Riesgo para el sujeto de estudio
 - Riesgo mínimo
 - Riesgo mayor al mínimo

- Artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación
- Investigación con riesgo mínimo.

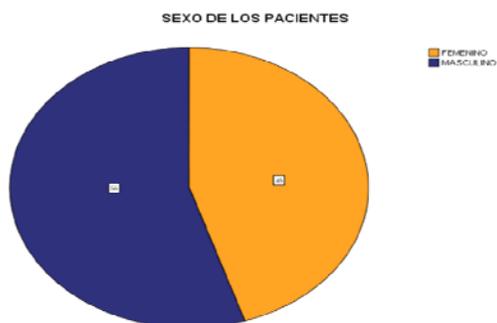
- Registro institucional del proyecto
 - Comités de Investigación y Ética

7.1.6 Equipo y recursos

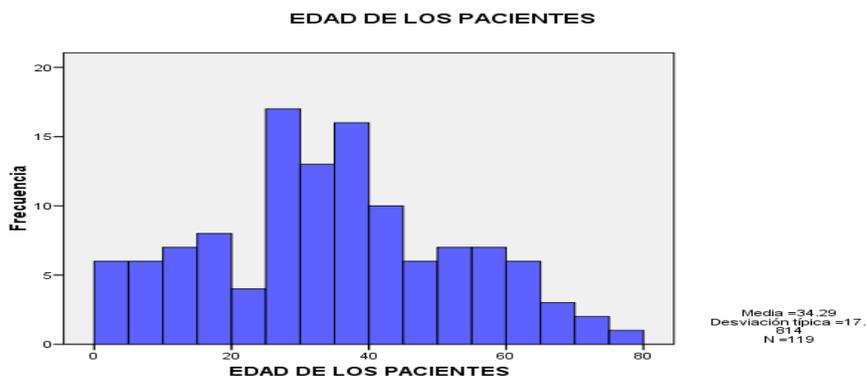
Todo el material empleado durante la elaboración de este proyecto, equipo y personal, serán proporcionados y financiados por el Instituto Mexicano del Seguro Social

7. Resultados

En el periodo comprendido de julio del 2010 a Abril del 2011 se realizó la prueba de amplificación MTD-2 en 93 muestras respiratorias y 27 no respiratorias correspondientes a 120 pacientes, en este período se procesaron 1200 muestras en el hospital para cultivo de micobacterias. El 54 (45%) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 66 (55%) al sexo masculino.



El promedio de edad de los pacientes fue 34.9 años con un intervalo de 4 meses a 76 años

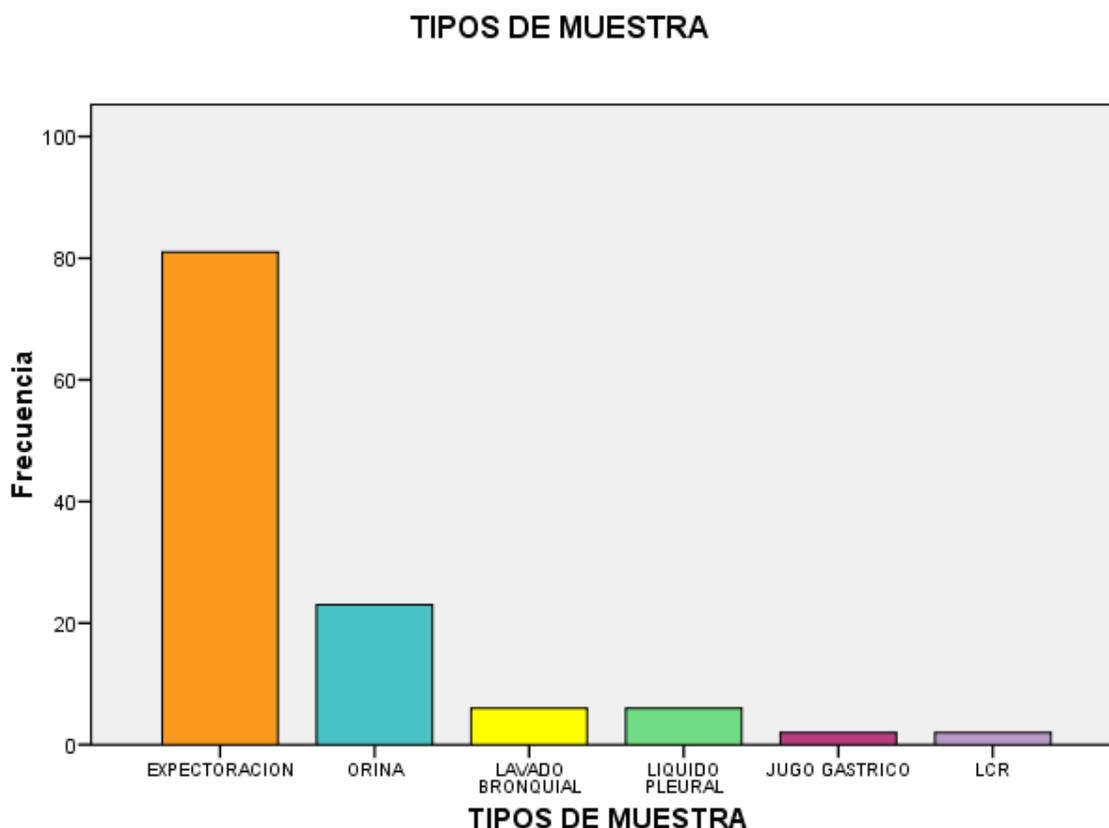


Los diagnósticos clínicos de las muestras que se procesaron en búsqueda de *Mycobacterium tuberculosis* fue en pacientes con insuficiencia renal y el mayor número de muestras se procesó en pacientes con transplante renal, en un 40 (33%).

TABLA I. DIAGNOSTICOS DE LOS PACIENTES DE ESTUDIO

DIAGNOSTICO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
PROTOCOLO DE TRANSPLANTE RENAL	40	33%
DONADORES DE TRANSPLANTE	32	26.7%
PROBABLE TUBERCULOSIS PULMONAR	13	10.7%
PROTOCOLO DE TRANSPLANTE HEPATICO	4	3.3%
PROBABLE TUBERCULOSIS URINARIA	3	2.5%
DERRAME PARANEUMONICO	3	2.5%
DERRAME PLEURAL	3	2.5%
HEMATURIA	3	2.5%
NEOPLASIA PULMONAR EN ESTUDIO	3	2.5%
FIBROSIS QUISTICA	3	2.5%
HEMOPTISIS	3	2.5%
PROBABLE TUBERCULOSIS URINARIA	2	1.7%
OTROS	8	6.6%

Los tipos de muestras enviadas para la búsqueda de *Mycobacterium tuberculosis* fueron en expectoración 81 (67.5%), orina 23 (19.2%), Lavado bronquial 6 (5%), jugo gástrico 2 (1.7%), Líquido Pleural 6 (5%), Líquido cefalorraquídeo 2 (1.7%).



De las 81 muestras de esputo examinadas por **método de Ziehl-Neelsen** 16(19.7%) de las muestras fueron positivas y negativas 65 (80.3%), de las 6 muestras de lavado bronquial 4 (66.6%) fueron positivas y negativas 2 (33.4%), de las 2 muestras de jugo gástrico 1(50%) fue positiva y negativa 1 (50%), de las 6 muestras de Líquido pleural 2 (33.4%) positivas y 4 (66%) negativas, de las 23 muestras de orina 4(17.3%) y negativas 19 (82.7%) y las dos de liquido cefalorraquídeo fueron negativas.

De las 81 muestras de esputo examinadas con el **estándar de oro cultivo Löwestein-Jensen** 7 (8.6%) de las muestras fueron positivas y negativas 74 (91.4%), de las 6 muestras de lavado bronquial 4 (100%) fueron positivas, de las 2 muestras de jugo gástrico 1(50%) fue positiva y negativa 1 (50%), de las 6 muestras de Líquido pleural 1 (16.4%) fueron positivas y 5 (83.6%) negativas, de las 23 muestras de orina 3 (13.0%) fueron positivas y negativas 20 (87%) y las dos muestras de liquido cefalorraquídeo fueron negativas.

De las 81 muestras de esputo examinadas con el **Gen-Probe MTD-2** 7 (8.6%) fueron positivas y negativas 74 (91.4%), de las 6 muestras de lavado bronquial 2 (33.3%) fueron positivas y 4 (66.7%) negativas, de las 6 muestras de Líquido pleural 1 (16.4%) positivas y 5 (83.6%) negativas las muestras de jugo gástrico, y orina fueron negativas todas.

TABLA II. MUESTRAS POSITIVAS EN LAS DIVERSAS PRUEBAS

PRUEBA	ESPUTO	LAVADO BRONQUIAL	JUGO GASTRICO	LIQUIDO PLEURAL	ORINA	LCR	TOTAL
Zielh- Neelsen	16	4	1	2	4		27
Cultivo	7	4	1	1	3		16
Gen Probe	7	2		1			10

TABLA III. GLOBAL DE LOS 3 METODOS UTILIZADOS EN LA DETECCION DE Mycobacterium tuberculosis.

BACILOSCOPIA		GEN PROBE-MTD		CULTIVO		TOTAL
Positiva	Negativa	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
27	93	10	110	16	104	120

La sensibilidad de la baciloscopia en este estudio fue de 20%, con una especificidad 86.6%, el VPP 67.5%, VPN 52%, Razón de verosimilitud positiva 1.42 y razón de verosimilitud negativa 0.93.

La sensibilidad de Gen-Probe MTD-2 en este estudio fue de 20%, con una especificidad 86.6%, el VPP 67.5%, VPN 52%, Razón de verosimilitud positiva 1.42 y razón de verosimilitud negativa 0.93

8. Discusión

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis se ve limitado por la lentitud del cultivo y la falta de sensibilidad de la baciloscopia. El desarrollo de procedimientos de cultivo en medios líquidos, con sistemas sensibles de detección y el empleo de sondas de hibridación en la identificación, han supuesto un gran avance ya que han acortado el tiempo de diagnóstico de 24 a 48 horas cuando el tiempo mínimo para el aislamiento de *Mycobacterium* es de 3 semanas en medio sólido de Löwenstein-Jensen.

El desarrollo de la ciencia y la tecnología mediante técnicas de hibridación son una alternativa para realizar el diagnóstico sin embargo debe ser sometida a un análisis crítico debido por una parte a su elevado costo y que no en todos los centros cuentan con estos recursos.

En nuestro estudio la sensibilidad de la baciloscopia fue de 20% menor a la reportada en diversos estudios con una especificidad de 86.6%, la baja de sensibilidad en la detección de casos positivos es que siempre se realiza en pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar, pero en el caso de nuestros pacientes fueron pacientes que la tuberculosis no era el diagnóstico de sospecha si no como prueba de screening en muchos casos para la realización del transplante de diversos órganos para saber si el paciente tiene la enfermedad y debe recibir tratamiento antes de ser transplantado se puede utilizar como prueba diagnóstica inicial pero se requiere de una prueba más precisa si se desea diagnosticar tuberculosis.

En nuestro laboratorio, los valores de sensibilidad y especificidad respectivamente para la MTD han sido de 83% y 90%. Estos resultados varían ampliamente entre los distintos autores que además pueden emplear estrategias diversas para resolver las discrepancias entre los resultados de la MTD y el cultivo. Así por ejemplo,

hay autores que elevan el rango de lectura de 30.000 RLU, definido por el proveedor como límite de lectura positiva, a otros rangos más elevados con lo que consiguen aumentar la especificidad. Sin embargo, en nuestra experiencia en 6 casos esta aproximación no ha resultado fiable ya que se han obtenido resultados falsos negativos con lecturas negativas cuando en realidad son verdaderos positivos quizás esto se deba a que el tipo de muestra tiene menor sensibilidad como es el caso de las muestras urinarias para búsqueda de *Mycobacterium tuberculosis* que fueron positivas en cultivos y negativas en Gen Probe MTD lo que quizás nos explique esta discrepancia aunque la sensibilidad de la prueba también varía entre los diversos autores ya que los diversos estudios que lo mencionan utilizaron en un inicio las pruebas que aprobó la FDA (Food and Drugs Administration) aprobó en un principio pruebas de amplificación para el estudio de muestras respiratorias con baciloscopias positivas: la MTD (Gen Probe) y la Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Roche). La FDA llegó a esta conclusión sobre la base de los resultados de los estudios iniciales que demostraron la baja sensibilidad y especificidad de estas pruebas⁹. Sin embargo, la nueva versión MTD-2 aumenta la sensibilidad y es recomendada en muestras respiratorias y de otro tipo en las muestras analizadas MTD-2 fue positiva en 7 muestras de esputo y cultivo positivo en las 7 confirmándose la presencia de la enfermedad estas muestras presentaron baciloscopia positiva en 6 casos por lo que coincide con otros autores que esta prueba debe utilizarse solo en pacientes con baciloscopia positiva y la expectoración es la muestra que más susceptibilidad demostró este tipo de muestra este estudio está limitado porque fue mayor el número de muestras de expectoración que de otros fluidos por lo que no podemos concluir el realizarla o no en otro tipo de muestras quizás Gen probe no sea

adecuado utilizarlo en orina en nuestro estudio fue negativa para la sonda de hibridación pero positiva en el cultivo que fue el estándar considero que esto no es concluyente la muestra fue pequeña y pudiéramos estar ante un sesgo de selección de muestra.

9. Conclusiones

En resumen, teniendo en cuenta nuestros resultados, concluimos que la prueba es útil y su gasto está justificado, si se limita su uso a las muestras con baciloscopias positivas, ya que comprobando que la muestra no contiene inhibidores, lo que podemos conseguir colocando una concentración de M. tuberculosis tal como recomienda el proveedor para el control positivo de la muestra problema, podemos afirmar o descartar el diagnóstico de una tuberculosis en unas horas. La prueba no debe realizarse indiscriminadamente en muestras con baciloscopia negativa, y en estos casos, siempre que obtengamos un resultado positivo, será necesario repetir la prueba con otra muestra para confirmarlo considero que este estudio tiene debilidades pero se podría reforzar con una investigación más amplia.

11.-Bibliografía

- 1- Richard J, O'Brien MD. American Thoracic Society. Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S221-S247.
- 2.-Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al Exogenous reinfection of tuberculosis on an European Island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 717-720.
- 3.-Lugones-Botell M, Ramírez Bermúdez M, Pichs García LA, Miyar Pieiga E. Apuntes históricos sobre la epidemiología, la clínica y la terapéutica de la tuberculosis en el mundo. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol* 2007; 45(2).
- 4.-Moreno-Altamirano L. Desde las fuerzas mágicas hasta Roberto Koch: un enfoque epidemiológico de la tuberculosis. *Rev Inst. Nal. Enf.Resp.Mex.* V.17 n.2 México jun.2004
- 5.-Dannenberg AM. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis *Rev. Infect Dis* 1989; 2 supply 2): S369-S378.
- 6.-Karlson AG, Pfuetze KH, Carr DT, Feldman WH, Hinshaw HC. The effect of combined therapy with streptomycin, para-aminosalicylic acid and promin on the emergence of streptomycin resistant strains of tubercle bacilli: a preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1949, 24:510-515.
- 7.-Treatment of pulmonary tuberculosis with para-aminosalicylic acid and streptomycin a preliminary report. *Br Med* 1949; 2:1521.
- 8.-Caminero-Luna JA. Breves reseñas históricas sobre la Tuberculosis. En: *Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas, Union International Contra la Tuberculosis y Enfermedades respiratorias (VICTER); 2003. P.17-24.*

- 9.-Daniel TM. The origins and pre-colonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:395-400.
- 10.-Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is mycobacterium tuberculosis 15000 years? *J Infect Dis* 1994; 170:1348-1349.
- 11.-Farer L.S The current status of tuberculosis control efforts. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:402-407.
- 12.-Varela-Martinez C. Plan Estratégico Nacional para el Control de la Tuberculosis *Rev. Med. Hondur.*2010; Vol.78 No.2; 39-48.
- 13.-Caminero-Luna JA. Epidemiología de la tuberculosis. En: *Guía de la Tuberculosis para Medicos Especialistas*. Paris: Union Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (VICTER); 2003 p.25-51.
- 14.-Kochi A: The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1992; 72:1
- 15.- Organizaciòn mundial de la salud 2009, <http://www.who.int/research/en/>
- 16.-Tapia CR, Ruiz MC, Ferrerira GE, Epidemiologia de la tuberculosis en México. *Temas de Medicina Interna: Tuberculosis*. Asociación de Medicina Interna de México,Ed. Interamericana McGraw-Hill Vol. III, 1995, pp.761-788.
- 17.-Orozco-Andrade I, Nesbitt-Falomir C, González-Ortiz S. Tuberculosis en Pediatría. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2009; Vol. XXII Núm. 87:83-90.
- 18.-42.-OMS. Mundial contra la Tuberculosis de control. WHO/HTM/TB/2008.393. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2008.
- 19.-Organización Panamericana de la salud
<http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/tuberculosis.htm>.

- 20.-Raviglione M, Snider D, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995;273:220-226.
- 21.-Morales-Aguirre JJ, Ornelas-Carsolio ME, Infección de M. tuberculosis en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, Bol Med Hosp Infant Mex, vol 61, núm 1,2004, pp.87-98.
- 22.-Comité Nacional de Lucha contra la Tuberculosis y Enfermedades del Aparato Respiratorio. La tuberculosis y su tratamiento. Noviembre 1996.
<http://www.inetcorp.net.mx/tuberculosis/puntos.htm>.
- 23.- Wayne LG, Kubica GP: Family Mycobacteriaceae, in Holt JG, Sneath PHA Bergey's Manual of Determinative Bacteriology section 16, 9th ed. Baltimore, Williams&Wilkins, 1986, pp 1435.
- 24.-Cotran SR, Kumar V, Collis T. 2004 Robins, Patología estructura y funcional Sexta edición. Mc. Graw Hill-Interamericana, México pág 370-375; 754-757.
- 25.-Azuma I, Yamamura Y, Misaki A . Isolation and characterization of arabinos mycolate from firmly bound lipids of micobacteria. J Bacteriol. 1969; 98:331-333.
- 26.-Bacteriología Clínica, Keith Struthers, Roger P.W ISBN 84-458-1449 Barcelona España 2005, pag 103 a 108 Masson.
- 27.-Koneman EW, Mycobacterium in Balows A. ed. Manual of Clinical Microbiology 5ª.ed. Washington DC: American Society Microbiology, 1991:304-339.
- 28.-Carballo-Cruz M, Chavarria-Mondragòn K, Meza-Morales A. Inmunología y patogénesis de la Tuberculosis Alergia e Inmunol Pdiatr 1995; 4:147-149.
- 29.-Stewart GR, Robertson DB, Young BD. Tuberculosis: a problem with persistence, Nature Microbiology 2003;1:97-105.

30.-Lurie MB, Heppleston SA, Swartz IB: An evaluation of the method of quantitative airborne infection and its use in the study of the pathogenesis of tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1950; 61:765.

31.-Artman M, Bekierkunst A, Goldenberg I: Tissue metabolism in infection: biochemical changes in mice treated with cord factor. *Arch Biochem Biophys* 1964; 105:80.

32.-Chan J, Fan X, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR: Lipoarabinomannan a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* 1991; 12:228.

33.-Muller I, Cobbold S, Waldmann H, Kaufmann SME: Impaired resistance to *M. tuberculosis* after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect Immun* 1987;55:2037.

34.-Orne IM, Collins FM: Adoptive of the *M. tuberculosis*-infected lung: dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell Immunol* 1984; 84:113.

35.-Orne IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *M. tuberculosis* *J Immunol* 1987; 138:293.

36.-Orne Miller ES, Robert AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos EM Chi D, et al T lymphocyte mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *M. tuberculosis* infection. *J. Immunol* 1992;148:189.

37.-Flesch I, Kauffmann SHE: Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *M. tuberculosis*. *J immunol* 1987;138:4408.

38.-Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, Fujita M, Nomoto M, Mitsuyama M: IFN- γ producing ability as a possible marker for the protective T cells against *M. Bovis BCG* in mice. *J Immunol* 1992; 148:2887.

- 39.-Shiratsuchi H, Ellner JJ: Bidirectional effects of cytokines on the growth of *M. avium* within human monocytes. *J Immunol* 1991; 146:3165.
- 40.-Lucas H, Brikmann E, Ernest HJ, Friemann W, Gaerther W, Gülck W. et al El aparato respiratorio y sus enfermedades. En el gran libro de salud 8ª. Ed. 1979 Reader Digest, México, 412-419.
- 41.-Jacobs RF, Starke JR. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Long S, Pickering L, Prober CG. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases 2nd edition, Churchill Livingstone, 2003, Pag: 791-810.
- 42.-Paganini H, González F, Santander C, et al. Tuberculous meningitis in children. Clinical features and outcome in 40 cases *Scan J Infect Dis* 2000;32:41.
- 43.-Murray JF. Un programa contra la tuberculosis emerge: agenda de investigaciones, incluyendo el impacto de la infección VIH. *Bol Union Int Tuberc Enf Resp.* 1991; 66:229-31.
- 44.-Morales-Aguirre JJ, Ornelas-Carsolio ME, Gomez-Barreto D. Infección por *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana *Bol Med. Hosp Infant Méx* 2004;Vol.61(1):87-98.
- 45.-Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:15-21
46. - Tuberculin skin test. En: American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-1975.
- 47.-Ausina V. Actualidad de la tuberculosis. Una visión crítica de las nuevas técnicas diagnósticas. *Enf. Infect Microbiol Clin* 1992; 10:249-254.
- 48.-Hernández-Méndez JT, Aparicio-Azores G. Manual de prácticas de Bacteriología Médica, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas 2003.
- 50.-Wolinsky E. Conventional diagnostic method for tuberculosis . *Clin Infect Dis* 1994; 19:396-401.

- 51.-Caminero JA, Casal M, Ausina V, Pina JM, Sauret J. Normativa SEPAR sobre diagnóstico de la Tuberculosis. Arch Bronconeumol 1996; 32:85-99.
- 52.-Heubner RE, Good RC, Tokars JI. Current practices in mycobacteriology: results of survey of state public health laboratories. J Clin Microbiol 1993; 31:771-775.
- 53.-Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159:15-21.
- 53.- Tuberculin skin test. En: American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161:1376-1975.
- 54- .-Gil-Setas A, Torroba L, Fernandez JL, Martinez Artola L. Evaluación of the MB/Bact system compared with Middlebrook .7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. Microbiology Clinic infection ISSN 2004: Vol 10 No. 3 pag 224-228.
- 55.-Gil-Setas A, Torroba L, Fernandez JL, Martinez Artola L. Evaluación of the MB/Bact system compared with Middlebrook .7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. Microbiology Clinic infection ISSN 2004: Vol 10 No. 3 pag 224-228.
- 56.-Indigoras P, Beristain X, Inturzaleta A, Vicente D. Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 System with Lowenstein Jensen Coletsos and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of Mycobacterium European J of Clin Microbiol 19;5:350-354.
- 57.-Casal M. Sistema radiométrico semiautomatizado (Bactec 460 TB) para microbiología clínica de tuberculosis y micobacteriosis. ENF Infect Microbiol Clin 1987; 5:46-51.
- 58.-Jackson K, Sievers A, Dwyer B. Effect of agitation of Bactec 13 A b blood cultures on recovery of Mycobacterium avium complex. J. Clin Microbiol 1991;29:1801-1803.
- 59.- Wolinsky E. Conventional diagnostic method for tuberculosis . Clin Infect Dis 1994; 19:396-401.

- 60.-Ugarte-Gil C, Ponce-Alvarez M, Moore DA. Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis* Acta méd peruana v.25 n3 Lima jul 2008.
- 61.-Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction analysis. J Clin Microbiol 1993; 31:175-8.
- 62.-Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EM, Chang CH. Detección and identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in Bactec media using DNA probes. J Clín Microbiol 1989; 27:
- 63.- Thierry D, Brisson-Nöel A, Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium* insertion sequence IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 1990;28:2673-2688.
- 64.-Goto M, Shinichi O, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K. Evaluation of acridinium, ester labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clín Microbiol 1991; 29:2473-2476.
- 65.-Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, Alonso R, Fenner T, Schirm J et al. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20:724-31.
- 66-Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. Actualización: pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para la tuberculosis. 2000. MMWR 49:593-594.
- 67.-Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997; 35:2969-73.
- 68.-Devallois A, Picardeau C N, Paramasivan V, Vincent V, Rastogi N. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16S rRNA sequencing, and DT1-DT6 PCR. J Clin Microbiol 1997; 35:2767-72.
- 69.-Frothingham R, Wilson KH. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium*

complex demonstrates clinically meaningful divisions. *J Infect Dis* 1993; 169:305-12.

70.-Gamboa F, Manterola JM, Viñado B, Matas L, Gimenez M, Lonca J et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 1997;35:307-10.

71.- Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from Bactec TB broth cultures. *J Clin Microbiol* 1994;32:2995-8.

72.-Schluger NW. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2020-4

73.-Wang, S.X. y L. Tay. 1999. Evaluación de tres métodos de amplificación de ácidos nucleicos para la detección directa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias. *J. Clin. Microbiol.* 37:1932-1934.

74.-Peterson EM, Lu R Floy C, Nakasone A, Friedly G.M de la MazaL. Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in Bactec media using DNA probes. *J. Clin Microbiol* 1989;27:1543-1547.

75.- Pfyffer GE. Amplification techniques: hope or illusion in the direct detection of tuberculosis. *Med Microbiol Lett* 1994; 3: 335-347.

76.-Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-1163.

77.-Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; 338: 364-366.

78.-Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Knott CA, Lankford R et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2410-2416.

- 79.-Doern GV. Diagnostic Mycobacteriology: Where are we today? J Clin Microbiol 1996; 34: 1873-1876.
- 80.-Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EM, Chang CH. Detección and identification of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare from amplified primary cultures in Bactec media using DNA probes. J Clín Microbiol 1989;27:
- 81.- Dowdy DW, Maters A, Parrish N, Beyrer C, Dorman SE. Cost-effectiveness analysis of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. J Clin Microbiol 2003; 41: 948-953.
- 82.- Bodmer T, Gurtner A, Schopfer K, Matter L. Screening of respiratory tract specimens for the presence of Mycobacterium tuberculosis by using the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol 1994; 32: 1483-1487.
- 83.- La Rocco MT, Wanger A, Ocera H, Macias E. Evaluation of a commercial rRNA amplification assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in processed sputum. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 726-731.
- 84.- CDC. Nucleic acid amplification test for tuberculosis. MMWR 1996; 45: 950-951.
- 85.-Welch K, Brown G, Jonas V, Ferraro MJ. Performance of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test in a laboratory that infrequently isolates Mycobacterium tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 1995, 22: 297-299.
- 86.-Perfecto B, Dorronsoro I, López-Goñi I. Confirmación mediante tipificación molecular de contaminaciones cruzadas en el laboratorio de micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000; 18: 12-15.
- 87.-Burman WJ, Reves RR. Review of false-positive cultures for Mycobacterium tuberculosis and recommendations for avoiding unnecessary treatment. Clin Infect Dis 2000; 31: 1390-1395.
- 88.- Vlaspolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 1995; 33: 2699-2703.

- 89.-Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, Alonso R, Fenner T, Schirm J et al. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:724-31.
- 90.-Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. Actualización: pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para la tuberculosis. 2000. *MMWR* 49:593-594.
- 91.-Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2969-73.
- 92.- Frothingham R, Wilson KH. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. *J Infect Dis* 1993; 169:305-12
- 93.- Gamboa F, Manterola JM, Viñado B, Matas L, Gimenez M, Lonca J et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol* 1997;35:307-10.
- 94.- Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from Bactec TB broth cultures. *J Clin Microbiol* 1994;32:2995-8.
- 95.- Schluger NW. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2020-4
- 96.- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:175-8.
- 97.- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *PNAS* 1997; 94:9869-9874.

98. CDC. Notice to readers: Update: Nucleic Acid Amplification Test for Tuberculosis. MMWR 2000; 49; 593-594.
99. Alcalá L, Ruiz-Serrano MJ, Hernangomez S, Marín M, García de Viedma D, San Juan R et al. Evaluation of the upgraded amplified Mycobacterium tuberculosis direct test (gen-probe) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 41: 51-56.
- 100.- Gamboa F, Fernández G, Padilla E, Manterola JM, Lonca J, Cardona PJ et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 684-689.
101. O'Sullivan CE, Miller DR, Schneider PS, Roberts GD. Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. J Clin Microbiol 2002; 40: 1723-1727.
102. Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EM, Welscher HM, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996; 34: 834-841.
103. Woods GL. Molecular methods in the detection and identification of Mycobacterial infections. Arch Path Lab Med 1999; 123: 1002-1006.
104. Artiles F, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Lafarga B. Valoración clínica de la prueba Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct 2. (AMTD-2, GenProbe) en el diagnóstico rápido de la tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 53-56.
105. Zheng X, Pang M, Engler HD, Tanaka S, Reppun T. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in contaminated BACTEC 12B broth cultures by testing with Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol 2001; 39: 3718-3720.

- 106.- Wang, S.X. y L. Tay. 1999. Evaluación de tres métodos de amplificación de ácidos nucleicos para la detección directa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias. *J. Clin. Microbiol.* 37:1932-1934.
- 107.-Bermann, J.S., G. Yuoh, Pesca y G. G. L. Woods. 1999. Evaluación clínica de la mejora de Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* directo de prueba para el diagnóstico rápido de la tuberculosis en los reclusos. *J. Clin Microbiol.* 37:1419-1425
108. - Strickler HD, Goedert JJ, Flemming M . Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens using an automated DNA J Clin Pathol 1999 52(3):193-7.
- 109.- 106.-Salman H. Siddiqi, Ph. *Mycobacteria Growth Indicator Tube MGIT Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects, Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(Supl 1):8-13.
- 110.- Schaechters Mechanisms of Microbial Disease Ed. 3ª. Lyppincott Williams&Wilkins, United States of America 1999.
111. Cambanis A, Ramsay A, Wirkom V, Tata E, Cuevas LE. Investing time in microscopy: an opportunity to optimise smear-based case detection of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11:40.
112. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:3233.
113. Flores LL, Pai M, Colford JM, Jr, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol.* 2005; 5:55.
114. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax.* 2006; 61:783.
115. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *N Engl J Med.* 2010; 363:1005.
116. Davis JL, Huang L, Kovacs JA, Masur H, Murray P, et al. Polymerase chain reaction of *secA1* on sputum or oral wash samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2009; 48:725.
117. Cattamanchi A, Davis JL, Worodria W, Yoo S, Matovu J, et al. Poor performance of universal sample processing method for diagnosis of pulmonary tuberculosis by smear microscopy and culture in Uganda. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:3325.]

118. Worodria W, Davis JL, Cattamanchi A, Andama A, den Boon S, et al. Bronchoscopy is useful for diagnosing smear-negative tuberculosis in HIV-infected patients. *Eur Respir J*. 2010;36:446.
119. Zelazny AM, Calhoun LB, Li L, Shea YR, Fischer SH. Identification of Mycobacterium species by secA1 sequences. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:1051.
120. Geneva: World Health Organization, and the Stop TB Partnership New Diagnostics Working Group; 2009. Pathways to better diagnostics for tuberculosis.
121. Dowdy DW, Chaisson RE, Moulton LH, Dorman SE. The potential impact of enhanced diagnostic techniques for tuberculosis driven by HIV: a mathematical model. *AIDS*. 2006; 20:751.
122. Keeler E, Perkins MD, Small P, Hanson C, Reed S, et al. Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature*. 2006; 444(Suppl 1):49.
123. Kambashi B, Mbulo G, McNERney R, Tembwe R, Kambashi A, et al. Utility of nucleic acid amplification techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001; 5:364.
124. Pai M, O'Brien R. Tuberculosis diagnostics trials: do they lack methodological rigor? *Expert Rev Mol Diagn*. 2006; 6:509.
- 125.-Tekaida F, Badcock k, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin k, Feltwell T, Gentles S, Hamun N, Holdroy S, Homsby T. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393:537-544.

12. Anexos.

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS