



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos

Betzaida Cuevas-Córdoba^{a,b,*} y Roberto Zenteno-Cuevas^a

^a Laboratorio de Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

^b Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de marzo de 2009

Aceptado el 14 de diciembre de 2009

On-line el 9 de abril de 2010

Palabras clave:

Tuberculosis
Drogorresistencia
Diagnóstico

Keywords:

Tuberculosis
Drug resistance
Diagnosis

RESUMEN

Pese a que la tuberculosis (TB) viene acompañando a la humanidad desde el neolítico, ésta se mantiene como un serio problema de salud pública, agravado en los últimos años por el fenómeno de la resistencia a los antibióticos.

La OMS establece que el diagnóstico de la tuberculosis drogorresistente (TB-DR) es fundamental para su control y al mismo tiempo considera que los procedimientos diagnósticos tradicionales han llegado a un límite resolutivo. Ante este crítico escenario, el entendimiento de los mecanismos moleculares que explican el fenómeno de la TB-DR, combinado con novedosas técnicas moleculares, están permitiendo desarrollar de toda una nueva generación de procedimientos diagnósticos de TB-DR.

Sin embargo, ¿cuáles son estos mecanismos genéticos generadores de TB-DR? y ¿cuáles son las características, ventajas y limitaciones de estas nuevas metodologías diagnósticas? son las preguntas que se pretenden responder con el presente trabajo.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Drug resistant tuberculosis: molecular mechanisms and diagnostic methods

ABSTRACT

Drug resistant tuberculosis: Molecular mechanisms and diagnostic methods.

Despite the fact that Tuberculosis (TB) has been found in humans since the Neolithic Age, it still remains serious public health problem, increased in the last few years due to the phenomenon of drug resistance (DR).

The World Health Organization (WHO) established that the diagnosis of tuberculosis drug resistance (DR) is essential for its control, and at the same time considers that the traditional diagnostic procedures have reached their limit. In view of this critical scenario, the understanding of the molecular mechanisms that explain the phenomenon of the TB-DR, in combination with novel techniques in molecular biology, are allowing a new generation of diagnostic procedures to be developed for TB-DR.

However, this work sets out to answer the questions of what these molecular mechanisms TB-DR are, as well as their characteristics, advantages and limitations of these new diagnostic methodologies.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La TB es una enfermedad reemergente causada por bacterias del género *Mycobacterium*. De acuerdo a la OMS en 2007, se reportaron 9,27 millones de casos nuevos y 1,78 millones de defunciones. Se estiman 13,7 millones de casos prevalentes^{1,2}.

Uno de los factores que dificultan el manejo y control clínico de la TB a nivel mundial es la drogoresistencia, la OMS estima que el 20% de los casos de TB son resistentes a un antibiótico (TB-DR) y el 5,3% son resistentes a isoniacida y rifampicina (TB-MDR)³.

De manera general, los bacilos de *Mycobacterium* desarrollan mutaciones espontáneas en genes específicos. Estos mutantes son seleccionados tras la exposición a un tratamiento farmacológico mal aplicado, pasan a constituir la población microbiana predominante y son causa de fracaso clínico^{4,5}. Por sus implicaciones terapéuticas y pronósticas, resultan especialmente relevantes las cepas TB multidrogorresistente y las denominadas TB extensamente resistentes, es decir, con resistencia a isoniacida, rifampicina, alguna fluoroquinolona y un antibiótico inyectable de segunda línea^{1,3}.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la TB-DR requiere de 4–9 semanas para ser confirmatorio, lo cual permite el contagio de los contactos del paciente con TB-DR y favorece su dispersión^{5–7}.

En función de lo anterior, los últimos años han evidenciado la aparición nuevos métodos diagnósticos fundamentados en el

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: betcuevas@uv.mx, betsaida_20@hotmail.com (B. Cuevas-Córdoba).

cultivo de *Mycobacterium* en medio líquido, con una marcada reducción de los tiempos diagnósticos, alta especificidad y economía. Por otra parte, la identificación de los mecanismos moleculares y las mutaciones en genes asociados al fenómeno de resistencia, así como el empleo de nuevas técnicas en biología molecular, han permitido desarrollar novedosos métodos diagnósticos de TB-DR, específicos y rápidos. Sin embargo, poseen limitaciones que requieren de un adecuado análisis, si es que se desean incorporar en los programas de lucha contra TB.

El objetivo de este trabajo es hacer una descripción de los mecanismos moleculares responsables de resistencia a fármacos de primera línea en *Mycobacterium tuberculosis* y de los métodos diagnósticos desarrollados para su detección.

Mecanismos moleculares generadores de drogorresistencia a fármacos de primera línea

La «isoniacida» es un potente fármaco antituberculoso y bactericida que se utiliza contra la TB desde 1952⁵, actúa específicamente contra bacterias que se encuentran en fase de replicación activa⁸. Su mecanismo de acción aún no está del todo aclarado, pero se sugiere que la isoniacida se transforma en su principio activo gracias a la enzima catalasaperoxidasa, inhibiendo la síntesis de ácido micólico de la pared bacteriana, lo cual permite que el microorganismo sea susceptible a la acción de radicales de oxígeno reactivo y a otros elementos externos de respuesta del huésped^{5,8} (tabla 1).

El gen *katG* codifica para la enzima catalasa-peroxidasa. La presencia de mutaciones o deleciones en este gen se ha relacionado con el 60% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida^{5,9}. El *katG* tiene un tamaño de 1.771 pares de bases (pb); no obstante, del 30-65% de las mutaciones se localizan en el

codón 315 Ser⁸, el cual cambia a Thr, Asn o Arg¹⁰; otras mutaciones de menor frecuencia se han reportado en los codones 300, 321, 418, 463, 501, 525, 587 y 700^{11,12} (tabla 1).

La 2.^a causa de resistencia a isoniacida se explica por mutaciones que afectan al gen *inhA* y con mayor frecuencia a su regulador^{13,14}, el cual codifica para la proteína *inhA*, responsable de la producción de ácidos grasos^{5,9}; recientemente, se ha propuesto a este gen como el responsable de la corresponsabilidad a isoniacida y etionamida⁸. Las mutaciones en los genes *katG* e *inhA* están asociadas al 70-80% de los aislados resistentes a isoniacida⁸; pero alrededor del 15-25% de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco poseen el genotipo silvestre tanto en el gen *katG* como *inhA*⁵, por lo cual se piensa debe existir otro mecanismo de resistencia.

En este sentido, se ha observado que un 15% de cepas resistentes a isoniacida presentan mutaciones en el locus *kasA*¹⁵, lo cual implica que otro posible objetivo de isoniacida es la proteína *kasA*, involucrada en el mecanismo de elongación de los ácidos grasos⁵. También se han reportado con menor frecuencia mutaciones involucradas en la adquisición de resistencia a isoniacida en el gen *oxyR-ahpC*^{4,8,9}.

La «rifampicina» es otro fármaco importante, que debido a su fuerte actividad bactericida ha sido empleado desde 1970^{5,8}; desafortunadamente, su mala administración ha generado un incremento considerable en cepas resistentes⁸.

Respecto a su mecanismo de acción, la rifampicina se une a la ARN polimerasa de la micobacteria e interfiere durante el proceso de replicación y síntesis de ácido nucleico^{5,8,16}. La ARN polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades: α , β , β' y σ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente. Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad β de la ARN polimerasa, disminuyendo la afinidad por rifampicina y otorgando resistencia al fármaco⁸, (tabla 1).

Tabla 1
Genes asociados a TB DR

Fármaco	Gen	Mecanismo de resistencia	Frecuencia de mutaciones	Mutaciones reportadas	Cita
Isoniacida	<i>katG</i>	Codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, encargada de transformar la isoniacida en el principio activo, inhibiendo la síntesis del ácido micólico	50-68%	315 (Ser→Thr, Asn, Arg), 300 (Trp→Gly), 321 (Trp→Gly), 418 (Arg→Gln), 463 (Arg→Leu), 501 (Pro→Arg), 525 (Glu→Pro), 587 (Leu→Pro) y 700 (Ser→Pro)	8-11,60,61
	<i>inhA</i>	Codifica la síntesis de la proteína enoil ACP reductasa, implicada en la producción de ácidos grasos de la micobacteria	21-34%	94 (Ser→Ala), 21 (Ile→Thr,V), 258 (Ile→Thr)	12-15,60
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, a la cual se une la rifampicina, interfiriendo en la síntesis del ácido nucleico en el proceso de replicación bacteriana	96-98%	región de 81 pb (507-533) 531 (Ser→Leu, Thr), 498 (Val→Ala), 511 (Leu→Pro), 512 (Ser→Thr), 513-516 (Gln,Phe,Met,Asp→His), 513 (Gln→Leu), 514 (Phe→Val), 515-518 (Deletado), 516 (Asp→Val), 524-527 (Leu,Thr,His,Lis→Trp,Pro,Gln), 526 (His→Asp,Leu,Asn,Pro,Gln,Arg), 456 (Ser→Leu), 531 (Ser→Gln,Trp), 533 (Leu→Pro)	3-5,8,9, 15-20,60
Pirazinmida	<i>pncA</i>	Codifica para la enzima pirazinaminidasa, la cual transforma la pirazinamida en ácido piracinoico, resultando un pH ácido que parece ser el causante del efecto contra M. Tuberculosis	72-97%	57(His→Asp)	5,20,21,60
Estreptomina	<i>rpsL</i>	Codifica para la unidad ribosomal S12, al cual se une la estreptomina para inhibir la síntesis proteica	64-67%	43 (Lys→Arg, Thr), 88 (Lys→Gln, Arg, Thr)	5,8,24,60
	<i>rrS</i>	Codifica para el ARNr 16S, al cual se une la estreptomina para inhibir la síntesis proteica	8-21%	516 (C→T), 1.400 (A→G), 1.539 (A→G)	60,61
Etambutol	<i>embB</i>	Codifica la síntesis de la enzima arabinosiltransferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular, lo cual incrementa la permeabilidad y la entrada en mayor cantidad de los otros medicamentos	47-65%	297 (Ser→Arg), 306 (Met→Ile, Leu, Val), 328 (Asp→Gly, Tyr), 330 (Phe→Val), 334 (Tyr→His), 406 (Gly→Ala, Asp), 497 (Gln→Lys, Arg), 745 (Gly→Asp), 959 (Asp→Ala), 1.000 (Mer→Arg), 1.024 (Asp→Asn)	3,8,23,47,60

Pese a que el gen *rpoB* tiene un tamaño de 3.534 pb, el 96 o 97% de las mutaciones que causan resistencia a rifampicina están localizadas en una región de 81 pb^{4,8,10,15,16} entre los codones 507–533^{9,16} y consisten por lo general en mutaciones puntuales no sinónimas¹⁷. De acuerdo con los resultados de diversos estudios, en el 40–70% de los aislados, se observaron mutaciones puntuales en el codón 531 Ser^{5,8,16} por Leu (TCG → TTG) o por Thr (AGC → ACA)¹⁷. Del 32–36% de las cepas estudiadas mostraron cambios en el codón 526 His; y del 7–9% en el codón 516 Asp^{16,17}. También se han reportado mutaciones o deleciones de menor frecuencia en otros codones como: 498, 511–518, 524–527, 456, 531, 533¹⁸ (tabla 1). En los últimos años se han observado algunos aislados resistentes cuya mutación no se localiza en la región de 81 pb¹⁹, por lo cual se propone la existencia de mecanismos adicionales generadores de resistencia^{5,8}.

Las cepas resistentes a rifampicina presentan resistencia cruzada a drogas químicamente relacionadas o con sitios de acción similares dentro de la célula, como rifapentina y parcialmente a rifabutina y rifalacina²⁰.

Finalmente, el diagnóstico de resistencia a rifampicina es especialmente importante debido a su fuerte asociación con la resistencia a isoniacida, considerándose como un marcador importante de TB-MDR⁵.

El empleo de la «pirazinamida» se inició en el año de 1952, funciona específicamente contra bacilos semilantes que no son afectados por ningún otro medicamento antituberculoso. Una de sus principales ventajas es que disminuye el tiempo de tratamiento, debido a su sinergia con isoniacida y rifampicina; sin embargo, su principal desventaja radica en su alta especificidad en contra de *M. tuberculosis*, de manera que si la cepa infectante es diferente, como pudiera ser *Mycobacterium bovis*, el tratamiento no es efectivo^{5,8}.

Respecto a su mecanismo de acción, la pirazinamida es transformada por la enzima pirazinamidasa a su principio activo, ácido pirazinoico, el cual genera un pH ácido intrabacteriano, al parecer causante del efecto contra *M. tuberculosis*^{5,21} (tabla 1). La pirazinamidasa es codificada por el gen *pncA*, mutaciones en este gen explican el 80% de las cepas resistentes a este fármaco⁵. Para el caso particular de *M. bovis* en el codón 57 del gen *pncA* se ha identificado una mutación puntual (C → G), que resulta en la sustitución de His por Asp, suficiente para inactivar la enzima pirazinamidasa^{8,21} (tabla 1).

La «estreptomina» se descubrió en 1943, fue el primer fármaco con actividad antituberculosa probada, actúa específicamente en la forma extracelular de la micobacteria⁵. El mecanismo de acción de este fármaco se basa en su unión al ARN ribosomal (ARNr) con lo cual inhibe la síntesis proteica de la bacteria. La resistencia a este fármaco se asocia con mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* (o *rrnS*), los cuales codifican respectivamente la síntesis de la subunidad proteica 12S y el ARNr 16S^{8,9}. EL gen *rpsL* presenta mutaciones con mayor frecuencia, encontradas en los codones 43 (Lys → Arg y/o Thr) y 88 (Lys → Gln, Arg y/o Thr)⁹ (tabla 1). Al igual que ocurre con otros fármacos, en estreptomina, se cree que existen mecanismos adicionales de resistencia, en este caso probablemente relacionados con la permeabilidad de la pared y membrana bacteriana, ya que el 30% de las cepas resistentes no muestran mutaciones en los genes *rrs* o *rpsL*⁵.

El «etambutol» es otro fármaco empleado en contra de TB, se utilizó por 1.ª vez en 1961, tiene actividad bacteriostática, es un buen antimicobacteriano y solo actúa contra bacterias en fase de multiplicación activa⁵. Se recomienda para tratar infecciones diseminadas con bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium*, especialmente en personas infectadas con VIH, que cursan con DM, o con antecedentes de abandono o recaída^{8,22}. La probabilidad de resistencia es más baja que con otras drogas, por lo cual se incluye en la pauta básica de tratamiento primario en

los países con una tasa elevada de resistencia primaria a otro fármaco de primera línea²².

El mecanismo de acción de este medicamento no ha sido claramente definido, se cree que está relacionado con la interferencia en el metabolismo del ARNr, la síntesis de fosfolípidos, la síntesis de ácido micólico y la síntesis de polisacáridos de la pared celular bacteriana⁵. Evidencias experimentales y clínicas indican que el etambutol ejerce un efecto sinérgico con otros fármacos antituberculosos como consecuencia del incremento en la permeabilidad bacteriana, permitiendo el ingreso en mayor cantidad de otros medicamentos⁸ (tabla 1).

La resistencia a etambutol se encuentra asociada a mutaciones en tres genes: *embA*, *embB*, y *embC* localizados en un locus de 10.000 pb (*embABC*), que codifican para la enzima arabinosil-transferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular^{5,8,23}. Cerca del 70% de las cepas resistentes a etambutol presentan una mutación puntual en el codón 306 Met del gen *embB*, causando la sustitución por Val, Leu o Ile^{4,23}. Otras mutaciones reportadas se encuentran en los codones 297, 306, 328, 330, 334, 406, 497, 745, 959, 1.000 y 1.024²⁴ (tabla 1).

Métodos diagnósticos de TB-DR

Dada la importancia de actuar de forma rápida y efectiva ante la sospecha de estar frente a una cepa de TB-DR y gracias al conocimiento de los mecanismos genéticos generadores de resistencias, así como al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular, ha sido posible desarrollar en los últimos años una nueva serie de técnicas enfocadas al diagnóstico de drogoresistencia a fármacos antituberculosos, buscando aquellas con alta sensibilidad y especificidad, que al mismo tiempo sean rápidas y de bajo costo (tablas 2A,B). En términos generales, se ha establecido una clasificación de estos métodos, en fenotípicos, considerando el cultivo microbiológico de la muestra a diagnosticar, y genotípicos, basados en el empleo de ADN de micobacterias provenientes de la muestra.

Métodos fenotípicos o asociados a cultivo bacteriano

Método de las proporciones BACTEC

Este método descrito por Canneti y Groset, mide la proporción de colonias que han crecido en medios con concentraciones críticas de antibióticos, en relación con el crecimiento observado en un medio sin antibiótico. Dicho método es la base del sistema automatizado BACTEC, el cual consiste en el sembrado de los bacilos previamente cultivados en un medio líquido Middlebrook, rico en ácido palmítico con carbono 14 (C¹⁴). El C¹⁴ es un isótopo radioactivo natural que emite radiaciones beta, de manera que cuando las micobacterias metabolizan el ácido palmítico liberan al medio ambiente dicho isótopo en forma de CO₂, marcado con C¹⁴. Este CO₂ es aspirado y llevado a una cámara de ionización, en donde se transforma en una corriente eléctrica que se cuantifica y es proporcional a la cantidad de bacilos que se encuentran en crecimiento, es decir la señal eléctrica se expresa como «índice de crecimiento»²⁵. En cuanto al diagnóstico de resistencia, se emplean frascos con medio de cultivo, en los cuales se inocular la cepa a estudiar y se agrega el fármaco antituberculoso a evaluar, de modo que la emisión de radioactividad en un medio de cultivo con determinada droga, significa que el bacilo se está multiplicando y por tanto es resistente²⁵. Este es un sistema completamente automatizado y presenta sensibilidad y especificidad superiores al 90%. Entre sus inconvenientes se encuentran el generar desperdicios radioactivos, la importante inversión inicial en la compra de equipo, reactivos y materiales, y la necesidad de

Tabla 2A
Métodos de diagnóstico de TB-DR

Método	Descripción	Principal(es) desventajas	Cita
<i>Fenotípicos</i>			
Bactec	Método radiométrico basado en la identificación del crecimiento de micobacterias en medios de cultivo con determinada droga, mediante el marcaje con C14	Disponibilidad de desperdicios radioactivos, altos costos, personal capacitado, 3 semanas para obtener resultados	25
Bactec MGIT	Método fluorométrico basado en la identificación de crecimiento de micobacterias en medios con antibiótico, mediante un sensor de fluorescencia sensible al consumo de O ₂	Altos costos, personal capacitado, tiempo para crecimiento de los bacilos	25-29
MODS	Método basado en el rápido crecimiento de bacilos en placas de cultivo líquido, inoculadas con muestras de esputo y antibiótico; detectando la forma de cordón de las microcolonias de TB con microscopio de luz invertida	Necesidad de microscopio invertido y personal capacitado	28,30
Alamar azul	Método colorimétrico que identifica la presencia de micobacterias en medios con antibiótico, con base en reacciones de óxido reducción evidentes por el colorante alamar azul	No hay resultados contundentes para drogas bacteriostáticas como estreptomycin y etambutol	31-33
Resazurina	Método similar al Alamar azul, que emplea el indicador reazurina, detecta cambio de coloración de azul a rosa	Genera aerosoles biocontaminantes, falsos positivos por contaminación de placas	28,34-36
Nitroreductasa	Cuantifica la actividad de la enzima oxirreductasa, que reduce el nitrito en nitrato en medio líquido, detecta bacilos resistentes por un cambio en la coloración de rosa a rojo o violeta	Genera aerosoles biocontaminantes	28,36-38
LPR	Método basado en la identificación de micobacterias mediante la emisión de luz por luciferina, como respuesta a la infección de bacilos con fagos que tienen inserto el gen <i>fflux</i>	Requiere de personal capacitado	39-41
<i>Genotípicos</i>			
Secuenciación	Método que identifica y analiza la secuencia nucleotídica de un fragmento de gen específico mediante un paquete de computo, con la finalidad de identificar mutaciones que se sabe causan drogoresistencia	Alto costo, personal altamente capacitado	6,9,17,39
Q-PCR	Método que permite la detección de mutaciones en fragmentos de genes causantes de drogoresistencia mediante el uso de sondas de ADN marcadas con fluorescencia	Alto costo, personal altamente capacitado, conocimiento de posibles lugares de mutación, baja sensibilidad para la identificación de resistencia fenotípica	15-18,43
SSCP	Método que identifica cepas mutadas con base en que las diferencias en la secuencia de hebras individuales de ADN en condiciones no desnaturalizantes, ocasionan diferencias en autoplegamiento y por tanto distinto patrón de migración en geles de poliacrilamida en comparación con cepas sensibles	Baja sensibilidad en especial para mutaciones en isoniacida, rifampicina y etambutol	44-48
LiPA	Sistema colorimétrico que identifica mutaciones basado en la hibridación reversa de fragmentos de PCR de <i>Mycobacterium</i> biotinilados, con sondas de nucleótidos colocados en línea en una tira de membrana	Comercialmente solo hay disponibilidad para detección de mutaciones de resistencia a rifampicina	28,49,50
GenoType	Técnica similar a LiPA, detecta resistencia a rifampicina e isoniacida	Solo está disponible para diagnóstico de resistencia a isoniacida y rifampicina	28,53
MTBDRplus	Fundamentado en el diagnóstico de drogoresistencia en la hibridación de ADN de <i>Mycobacterium</i> con múltiples sondas específicas con fluorocromos adheridas a una membrana, permitiendo el análisis de miles de genes en un solo ensayo	Conocimiento previo de todas las mutaciones causantes de drogoresistencia, alto costo, personal altamente capacitado	52,53

personal altamente capacitado. Quizá su principal desventaja es el tiempo requerido para confirmar una negatividad, pues incluye por lo menos de 3-4 semanas para el cultivo y una semana más para obtener resultados de farmacoresistencia, contribuyendo a la transmisión de la TB-MDR y poniendo en entredicho su pertinencia futura en programas de salud específicos contra TB-DR y MDR^{5-6,25}.

Bactec MGIT 960

El método del tubo indicador de crecimiento micobacteriano o Bactec MGIT 960[®] (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc). Es un sistema para crecimiento y detección de *Mycobacterium* completamente automatizado; funciona mediante un sensor especial de fluorescencia sensible al consumo de O₂, que permite monitorear el crecimiento microbiano, presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 89,8%, para estreptomycin. Al compararlo con el sistema BACTEC tiene la ventaja de detectar el crecimiento micobacteriano en forma más rápida²⁶⁻²⁸ y evita la producción de desechos radioactivos; no

obstante, mantiene varias de sus desventajas como requerir personal capacitado y altos costos de inversión en equipo, materiales y reactivos^{26,29}.

Microscopic Observation Drug Susceptibility assay (MODS)

Este método detecta la resistencia de *M. tuberculosis* a isoniacida y rifampicina, directamente de las muestras de esputo. Tomando como base que el crecimiento del bacilo es más rápido en medio líquido que en medio sólido, esta técnica consiste en examinar mediante un microscopio de luz invertida, placas de cultivo con medio Middlebrook 7H9 y el antibiótico a evaluar, inoculadas con muestras de esputo; detectando en un promedio de 7 días la forma de cordón de las microcolonias características de TB^{28,30}.

Estos últimos 2 factores, además de su bajo costo, son sus principales ventajas, ya que reduce considerablemente el tiempo de diagnóstico y posee una mayor sensibilidad y especificidad que el medio sólido, al evidenciar el crecimiento característico de *M. tuberculosis*^{28,30} (tablas 2A,B).

Tabla 2B
Métodos de diagnóstico de TB-DR

Métodos	Tipo de muestra	Tiempo de resultados	Sensibilidad	Especificidad	Costos *	Cita
<i>Bactec</i>	Cultivo	28–42 días 60–90 días	> 90%	> 90%	20–50	25,26,30
<i>Bactec MGIT</i>	Cultivo	7–14 días	(SIREP) 100%	(S)89,8%–(R)100%	60	25–29
<i>MODS</i>	Espudo	7 días	(I,R) 86,6–97,8%	(I,R) 99,6–100%	2–3	28,30
<i>Alamar azul</i>	Cultivo, espudo	3–5 semanas	(I,R) 89%	(I,R) 100%	3–10	31–33
<i>Resazurina</i>	Cultivo, espudo	4–5 semanas	(I,R) 89,4–94%	(I,R) 100%	3–10	28,34–36
<i>Nitrato reductasa</i>	Cultivo	21–28	(I,R) 100%	(I,R) 100%	3–10	28,36–38
	Espudo	7–18 días	(R) 87,5%	(R) 100%		
<i>LPR</i>	cultivo	1–2 semanas	(I,R) 68–100%	(I,R) 73–99%	8–10	39–41
	espudo	12 días	97%			
<i>Genotípicos</i>						
<i>Secuenciación</i>	ADN de cultivo, espudo y extrapulmonar	8 h	100%	100%	15	6,9,17,39
<i>Q–PCR</i>	ADN de cultivo, espudo, y extrapulmonar	8 h	70–90%	> 85%	5–10	15–18,43
<i>SSCP</i>	ADN de cultivo	8–12 h	R 88% I 80%	R 98% I 100%	3–6	44–48
<i>LiPA</i>	ADN de cultivo y espudo	12 h	(R) > 95% (R) 80–100%	(R) 100% (R) 100%	45–50	29,49–50
<i>GenoType MTBDRplus</i>	ADN de cultivo y espudo	6 h	(R) 98,7% (I) 92% (R) 96,8% (I) 90,2% (IR) 98,4%	(IR) 99,1%	30–50	28,53
<i>Microdispositivos, «Microarray»</i>	ADN de cultivo y espudo	6–8 h	ND	ND	ND	52,53

E: etambutol; I: isoniácida; LiPA: ensayo de prueba en línea; LPR: Fagos reporteros de luciferasa; MODS: microscopic observation drug susceptibility assay; P: pirazinamida; Q–PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; R: rifampicina; S: estreptomina; SSCP: polimorfismos conformacionales de hebra sencilla.

* Por muestra en US dólares, no se consideran costos derivados de manejo, transportación, gastos de pago de personal y equipamiento.

Métodos de óxido reducción: alamar azul, resazurina y actividad nitroreductasa

El alamar azul es un método colorimétrico utilizado desde 1995 para medir cuantitativamente la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a agentes antimicrobianos. Se basa en la utilización del colorante alamar azul como indicador de óxido reducción; cuando hay presencia de células viables, dicha reacción se lleva a cabo y el medio de cultivo cambia de una coloración azul a rosa^{31,32}.

Estudios realizados con este método concluyen que, mediante el empleo de determinados puntos de corte, es posible generar una buena detección de cepas sensibles y resistentes a isoniácida y rifampicina (con una sensibilidad de 89% y especificidad del 100%) (tabla 2B); sin embargo, aún no hay resultados concluyentes para los casos particulares de estreptomina y etambutol, ya que estas drogas son bacteriostáticas y no bactericidas. Quizá la principal ventaja de esta técnica es su bajo costo y la fácil disponibilidad de los reactivos, por lo que bien podría apoyar programas de control de TB-DR en países con escasos recursos económicos^{32,33} (tabla 2A).

El ensayo de micro valoración con resazurina (o REMA por sus siglas en inglés), es un método colorimétrico que permite, a partir de bacilos aislados de espudo, determinar drogorresistencia en un periodo de una semana. Consiste en la incorporación del indicador resazurina a medio de cultivo líquido con diferentes concentraciones de antibiótico, si el bacilo se mantiene vivo, se detecta un cambio de color azul a rosa, como resultado de la reducción del indicador. Es una técnica barata, sencilla y con buenos resultados de sensibilidad y especificidad; entre sus inconvenientes está la producción de aerosoles y la posibilidad de transferir bacilos de un pozo a otro de la microplaca^{34–36} (tablas 2A,B).

Otra técnica similar es nitroreductasa o «prueba de Griess». Se fundamenta en la actividad de la enzima nitroreductasa, que le confiere a *Mycobacterium* la capacidad para reducir el nitrito en nitrato al emplear NaNO_3 en el medio de cultivo, detectando la resistencia mediante un cambio de color, que puede ir del rosa al violeta en función de la cantidad de bacilos. Ofrece resultados de 10–14 días a partir de un cultivo positivo o de muestras de espudo con baciloscopia positiva. Entre sus ventajas se encuentran que es

de bajo costo, requiere equipamiento microbiológico básico y posee buenos niveles de sensibilidad y especificidad^{28,37,38}, (tablas 2A,B).

Micobacteriófagos

El uso de micobacteriófagos para el diagnóstico de TB-DR ofrece resultados fenotípicos en poco tiempo y a bajo costo. Las 2 técnicas de mayor aceptación basadas en micobacteriófagos son la *phage-amplified biological assay* (phaB, 'amplificación biológica de fagos') y la *luciferase reporter phages* (LRP, 'identificación de fagos reporteros de luciferasa')³⁹.

Amplificación biológica de fagos. Esta técnica se basa en la amplificación de fagos en micobacterias sospechosas previamente tratadas con antibiótico, de manera que después del proceso fagoinfeccioso, los fagos extracelulares son retirados del medio, mientras los fagos que lograron ingresar a las bacterias que sobrevivieron aún con los fármacos, se replican; así nuevas partículas de fago serán liberadas dentro del medio y se podrá observar y cuantificar las placas de lisis en las células infectadas³⁹. De esta manera las placas aparecerán sólo en las células de micobacterias resistentes.

Con esta base, los laboratorios Biotec (Biotec Laboratories, Ltd. Reino Unido) desarrollaron recientemente un sistema comercial para la detección de *M. tuberculosis* con resistencia a rifampicina llamado prueba rápida de placa de TB-Rif (*FASTplaqueTB-Rif assay*), con la ventaja de requerir 48 h para proporcionar resultados confirmatorios, pero con el inconveniente de necesitar de un cultivo previo de la bacteria³⁹.

Fagos reporteros de luciferasa. Esta técnica permite determinar la susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante fagos reporteros de luciferasa. Se fundamenta en la infección de micobacterias con fagos que contienen inserto en su genoma el gen reportero *fflux*, el cual codifica para la luciferasa de luciérnaga. Estos fagos son capaces de replicar y expresar el gen *fflux* solo en células viables de *Mycobacterium*, de forma que la proteína

luciferasa, en presencia de ATP, cataliza una reacción que libera O₂ y luciferina, emitiendo fluorescencia³⁹⁻⁴¹.

En lo que se refiere a muestras clínicas con sospecha de contener TB-DR, estas se cocultivan con el panel de antibióticos y finalmente se infectan con LRP, de modo que solo aquellas cepas resistentes al fármaco sobrevivirán y serán detectadas fácil y rápidamente por su emisión de fluorescencia mediante un luminómetro o una película radiográfica. La primera opción ofrece una alta sensibilidad y resultados cuantitativos en aproximadamente 54 h (con una sensibilidad de 86-100% y especificidad del 73-99%, para rifampicina); mientras que la película radiográfica tiene similares valores de eficacia, pero su principal atributo es la disminución en costos; no obstante, requiere mayor tiempo (94 h) para proporcionar resultados confirmatorios³⁹⁻⁴¹.

Esta técnica también se ha aplicado sobre muestras de esputo, donde aporta resultados en aproximadamente 12 días, y su utilización resulta atractiva en los países en vías de desarrollo con alta prevalencia de TB-DR⁴¹.

Métodos diagnósticos genotípicos o moleculares

La aplicación de métodos de diagnóstico genotípicos ha sido posible, entre otras cosas, gracias a la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, y a la identificación y caracterización de genes asociados a drogoresistencia. Estos métodos ofrecen la posibilidad de identificar mutaciones asociadas a TB-DR de forma precisa y generar resultados a partir de 100 bacilos o menos por muestra. Quizá lo más importante es que permiten realizar el diagnóstico en cuestión de horas⁴², ya que al utilizar la muestra clínica directamente como material biológico, se elimina el tiempo relacionado con el crecimiento del bacilo.

En todas las técnicas moleculares el primer paso es la extracción del material genético y la amplificación, mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de acuerdo a sus siglas en inglés), de la región que contiene la(s) mutación(es) responsable(s) de la resistencia, para posteriormente identificarse mediante el empleo de alguno de los siguientes métodos:

Secuenciación genómica

Esta técnica es la más exacta y está considerada como el estándar molecular para definir genotípicamente a una cepa drogorresistente^{6,9,39}. Permite la ubicación concreta de la(s) mutación(es) y consiste en identificar y analizar la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN específico^{6,9,39}. Solo se requiere obtener el ADN de la cepa a estudiar, amplificar por PCR la región del gen de interés y este producto es analizado por un secuenciador automático, el cual finalmente presenta la sucesión de ácidos nucleicos^{6,39}.

Para el caso del diagnóstico de resistencia a fármacos en micobacterias, es posible secuenciar el gen involucrado en dicho mecanismo, e identificar la mutación o mutaciones específicas mediante comparación con el gen de una cepa sensible^{6,39}. Sin embargo, las limitaciones de esta técnica son los altos costos del equipo, los materiales y reactivos que se requieren, y la necesidad de contar con personal altamente capacitado. Pese a estas desventajas, varios estudios demuestran que la secuenciación es considerada la técnica de elección para la detección genotípica de resistencias en cepas de *M. tuberculosis*¹⁷.

Sistemas de detección por fluorescencia mediante PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real permite la detección de mutaciones con ayuda de sondas de ADN marcadas con diferentes tipos de fluorescencia. Para ello, se amplifica la región en donde se ubica la mutación causante de resistencia al fármaco y se analiza la fluorescencia del producto generado^{15-18,43}. De esta forma se

han identificado mutaciones en los genes *rpoB*, *katG*, *inhA* y *embB* (tabla 2A-2B).

Este sistema detecta el ADN de micobacterias provenientes de esputo, lavado bronco alveolar, fluido cerebro espinal, fluido pleural o muestras de tejido, lo que amplía su utilidad como técnica diagnóstica. Además, pueden emplearse en un mismo ensayo diversas sondas marcadas con diferentes fluorógenos, evidenciando, distintas mutaciones en varias muestras clínicas, inclusive si difieren por un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* [SNP, 'polimorfismo mononucleótido']), proporcionando una versatilidad y rapidez importante^{15-18,43,44}.

Para este procedimiento se han desarrollado diversos tipos de sondas, con diferentes características y niveles de eficiencia. Destacan las sondas «*Molecular Beacons*» y las sondas «*FRET*», ambas permiten detectar SNP de manera eficiente; sin embargo, comparten el inconveniente de ser costosas, requerir equipo sofisticado y personal altamente especializado. Las ventajas de esta técnica radican en el corto tiempo para obtener resultados y los valores de especificidad superior al 85%, con sensibilidad entre 70-90% en su aplicación al diagnóstico de resistencia a rifampicina e isoniacida^{15-8,39,43,44} (tablas 2A y B).

Polimorfismo conformacional de hebra sencilla por PCR (SSCP, Polymerase Chain reaction single stranded conformational polymorphism)

Este método ha sido utilizado en investigaciones con la finalidad de identificar de mutaciones relacionadas a enfermedades genéticas y recientemente se ha extendido su empleo al estudio de mutaciones asociadas con la resistencia a antibióticos en tuberculosis⁴⁵. Se fundamenta en que bajo condiciones no desnaturalizantes, un fragmento de una hebra de ADN adopta una conformación espacial, en función de su secuencia de nucleótidos; sin embargo, ante la existencia de una mutación, la secuencia nucleotídica y el plegamiento serán distintos, generando un patrón de migración electroforético diferente, detectable en una matriz de poliacrilamida³⁹.

Esta técnica se ha aplicado al estudio de TB-DR⁴⁴⁻⁴⁷. Si bien es de bajo costo y sencilla de realizar, existen estudios que cuestionan su sensibilidad y especificidad para la detección de mutaciones en los genes responsables de generar resistencia a isoniacida, rifampicina y etambutol^{44,46-48} (tabla 1).

Ensayo de prueba en línea (LiPA, Line probe assay)

Este método se utiliza para identificar aislados de micobacteria con diagnóstico previo por cultivo en BACTEC. Se basa en la hibridación de fragmentos biotinilados de ADN de una muestra sospechosa de ser TB-DR, sobre una tira de membrana en la cual se encuentran adheridos sondas de oligonucleótidos en línea, detectando dicho acoplamiento mediante un sistema colorimétrico vía biotina-streptavidina⁴⁹. El kit comercial para identificar resistencia a rifampicina contiene diez sondas con las cuales se puede determinar tanto la pertenencia al complejo *M. tuberculosis*, como la detección de cuatro mutaciones específicas en el gen *rpoB*⁵⁰. Estudios realizados mediante el empleo de esta técnica concluyen que es altamente sensible (95% o más) y específica (100%) para detectar tuberculosis resistente a rifampicina tanto de medios de cultivo como aislados y ligeramente menor para especímenes clínicos⁵⁰.

GenoType MTBDRplus

Es una técnica disponible comercialmente que permite la detección rápida de cepas del complejo *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniacida, detectando mediante hibridación con sondas específicas, una variedad de mutaciones en el fragmento

de 81 pb del gen *rpoB*, así como la mutación del codón 315 del gen *katG* y mutaciones en la región promotora del gen *inhA*^{28,51}.

Entre las ventajas que presenta se encuentra el poder aplicarse tanto en cultivo como directamente en esputo; además en cuanto a validez de la prueba ofrece una sensibilidad para detectar resistencia a rifampicina de 98,1% y para isoniacida de 90,2%, con una especificidad de 97,8% y 100% para cada droga respectivamente^{28,51}.

Microdispositivos de ADN (DNA Microarray)

Esta es una de las técnicas genotípicas más recientes que emplea la hibridación de sondas específicas marcadas con fluorocromos, con el ADN derivado de las muestras clínicas con sospecha de drogoresistencia. El sistema requiere el empleo de un microdispositivo, el cual consta de un cristal recubierto con una película de oro, sílice o algún otro material al que se adhieren genes o grupos de genes, silvestres y mutados, de modo que al colocar el material genético proveniente de una muestra, esta hibrida con la sonda complementaria y emite una señal fluorescente, cuyo análisis posterior permite identificar los genes portadores o carentes de las mutaciones, identificando así la resistencia o susceptibilidad por el antibiótico^{52,53}.

Quizá el mejor atributo de esta técnica es su capacidad de analizar de manera global, automatizada y simultánea cientos de mutaciones de un mismo o diferentes genes, en un sólo ensayo y por lo tanto generan un ahorro de tiempo considerable. Esta técnica actualmente esta abriendo un nuevo panorama en el diagnóstico de la drogoresistencia de TB^{52,53}; sin embargo, no se cuentan con estudios que evalúen su sensibilidad y especificidad. Por otro lado, los altos costos del equipo para el análisis, así como los relacionados con el diseño y construcción de los microdispositivos y la necesidad de contar con personal altamente calificado, limitan su utilidad en países con escasos recursos.

Discusión y conclusiones

Es importante resaltar las ventajas de las técnicas de diagnóstico fenotípico de drogoresistencia en tuberculosis, tales como su alta sensibilidad, especificidad y bajo costo, motivos por los que se ubican como las técnicas de referencia global. Sin embargo, su gran desventaja es que requieren de una gran cantidad de tiempo para generar resultados confirmatorios, factor considerado como el más importante a atender dentro de la dinámica de atención oportuna en contra de la TB-DR. El desarrollo de nuevas técnicas fenotípicas para diagnóstico de drogoresistencia, fundamentadas en el crecimiento de *M. tuberculosis* en medio líquido reducen los tiempos considerablemente respecto al medio sólido, además son más sensibles, específicas y económicas.

Por otro lado, las nuevas técnicas genotípicas poseen una alta especificidad y mayor disminución en los tiempos para obtención del diagnóstico; pero poseen importantes limitaciones que impiden su aplicación generalizada en el campo clínico, tales como elevado costo y necesidad de un laboratorio y personal altamente especializado.

Aunado a lo anterior, 2 temas están replanteando el futuro papel de los métodos genotípicos. En primer lugar, la resistencia a un fármaco está mediada por la participación de una o más mutaciones en uno o varios genes (tabla 1), inclusive varios de ellos aún no identificados. Esto hace que la especificidad de la técnica para la búsqueda de una mutación en un gen sea alta, pero la sensibilidad para la identificación fenotípica de resistencia sea baja. Es decir, el hecho de no encontrar ciertas mutaciones en un gen o genes no necesariamente se traduce en un diagnóstico confiable de sensibilidad. Se estarían diagnosticando falsos

negativos; por lo menos hasta que se logre la descripción de todas las mutaciones causantes de resistencia en todos los genes participantes.

Como segundo punto, en los últimos años el número de publicaciones relacionadas con la identificación de mutaciones en genes asociados con resistencia a TB se ha incrementado considerablemente^{19,54-59}. En ellas se aprecia que las frecuencias en las mutaciones poseen un amplio rango de variación dependiendo de la procedencia, por ejemplo la mutación 315 para *katG*, explica la resistencia para isoniacida en el 52% de las cepas provenientes de México¹⁹, en el 62% de cepas procedentes de España⁵⁴ y en el 100% de cepas originarias de Kazajistán⁵⁷.

Lo anterior obliga a desarrollar mayor número de estudios que identifiquen las mutaciones más frecuentes en cada país o región geográfica, con la finalidad de desarrollar o adaptar procedimientos diagnósticos moleculares específicos, incrementando los niveles de eficiencia y logrando un mayor impacto en los programas de estas regiones o países.

En este sentido, quizá la técnica de microdispositivos de ADN sea la única que permitirá analizar todas las mutaciones de un sólo gen o de combinaciones de genes, por lo que se coloca como una de las más viables de subsistir, siempre y cuando se disminuyan sus costos y se evalúe adecuadamente su sensibilidad y especificidad.

En conclusión, podríamos decir que las condiciones económicas y el escaso conocimiento sobre la frecuencia de las mutaciones en los genes asociados a la DR de varios de los países afectados por la nueva dinámica de la TB-DR, son tan solo 2 de los factores que proyectan un futuro incierto para las técnicas genotípicas y más aún si se comparan con las nuevas técnicas fenotípicas (MOD, alamar azul, reazurina, nitrato reductasa y LPR), cuyos atributos las situarían como aquellas con las mejores perspectivas.

Es por esto que resulta urgente desarrollar estudios clínicos amplios que confirmen la utilidad de dichas técnicas fenotípicas para finalmente establecer marcos normativos o reglas generales de operación que permitan su inclusión en los programas contra TB-DR, con énfasis en países con escasos recursos económicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado parcialmente por un financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondos CONACYT-SALUD, 2005-02-14380) y Universidad Veracruzana POA-UV 2007-2008. B. Cuevas-Córdoba es becaria de doctorado, CONACYT N.º 171183.

Bibliografía

1. World Health Organization. REPORT 2009. Global Tuberculosis Control. Epidemiology Strategy Financing. 1.8 Summary pp.32. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html.
2. Zenteno R. Tópicos Selectos de la Salud Pública. Tuberculosis: realidades y perspectivas. Universidad Veracruzana. Instituto de Salud Pública; 2006 pp 9-28.
3. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the world. Fourth Global Report. WHO 2008. Executive Summary. Result. Survey coverage and population-weighted means. pp 15. Disponible en: http://www.who.int/entity/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf.
4. Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. Dual-Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR. *Journal Clinical Microbiology*. 2004;42:5277-85.
5. Quirós-Roldán E, Airoldi M, Moretti F, Carosi G. Bases moleculares de resistencia de *M. tuberculosis*. *Rev Diagn Biol*. 2001;50:200-3.

6. Tapia R. El Manual de Salud Pública. Unidad II. Capítulo 6 Tuberculosis, 2ª ed. México: Editorial Interistemas; 2006 pp. 469–505.
7. Palma-Nicolás José P, Bocanegra-García V. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Arch Bronconeumol.* 2007;43:225–32.
8. Said S, Becerril P, Molina G, Barrios H. Tuberculosis causada por cepas de *M. tuberculosis* drogorresistentes. *Enf Emerg.* 2005;7:13–9.
9. Caws M, Drobniewski FA. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Ann NY Acad Sci.* 2001;953:138–45.
10. Soo-Young K, Yeon-Joon P, Won-Il K, Sun-Hwa L, Chulhun Ludgerus C, Seok-Jin K. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from south Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47:497–502.
11. Reviewed UniProtKB/Swiss-Prot Q08129 (KATG_MYCTU) July 22, 2008. Version 75. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q08129>.
12. Mo L. Three-dimensional model and molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and isoniazid-resistant KatG mutants. *Microb Drug Resist.* 2004;10:269–79.
13. García R, Lado L, Túnez V, Pérez Del Molin ML, Cabarcos A. Tratamiento actual de la tuberculosis. *An Med Interna Madrid.* 2003;20:43–52.
14. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P0A5Y6 (INHA_MYCTU) November 2008. Version 37. Disponible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A5Y6>.
15. Zhang M, Yue J, Yang Y, Zhang H, Lei J, Jin R, et al. Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. *Clin Microbiol.* 2005;43:5477–82.
16. Kocagoz T, Saribas Z, Alpaslen A. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6015–9.
17. Marin M, García de Viedma D, Ruiz-Serrano M, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrob Agents CH.* 2004;48:4293–300.
18. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P0A680 (RPOB_MYCTU) July 2008. Version 22. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A680>.
19. Zenteno-Cuevas R, Zenteno JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CL, Riviera JE, et al. Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Southeast of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:468–72.
20. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res.* 2001;2:164–8.
21. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pirazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:1–16.
22. WHO. Treatment of tuberculosis: Guidelines for National Programmes. 3rd Ed. Geneva, Switzerland, 2003.
23. Sreevatsan S, Stockbauer K, Pan X, Kreiswirth B, Moghazeh S, Jacobs W, et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents CH.* 1997;41:1677–81.
24. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P41196 (RS12_MYCTU) Last modified July 2008. Version 69. Disponible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P41196>.
25. Nava O, Prieto L. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar: revisión. *Kasmera.* 2001;29:51–63.
26. Sierra C, Sánchez E, Henao S, Saavedra A. Determinación de la susceptibilidad a drogas de primera línea en aislamientos de *M. tuberculosis* por la técnica del tubo indicador de crecimiento micobacteriano. *Rev Fac Med.* 2008;56:11–20.
27. Otu J, Antonio M, Cheung Y, Donkor S, De Jong B, Corrah T, et al. Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 with BACTEC 9000 MB and LJ for isolation of mycobacteria in The Gambia. *J Infect Developing Countries.* 2008;2:200–5.
28. Ugarte-Gil C, Ponce M, Moore D. Artículo de revisión: Pruebas de sensibilidad para *M. tuberculosis*. *Acta Med Per.* 2008;25:171–5.
29. Augustynowicz-Kopeć E, Jaworski A, Zwolska Z. Evaluation of Bactec MGIT 960 fluorescent method in diagnosis of tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol.* 2002;70:450–7.
30. Moore D, Evans C, Gilman R, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *N Engl J Med.* 2006;355:1539–50.
31. Yajko D, Madej J, Lancaster M, Sanders C, Cawthon V, Gee B, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol.* 1995;33:2324–7.
32. Acosta S, León C, Leal A. Determinación de la concentración inhibitoria mínima en cepas de *M. tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica de alamar azul. *Asociación colombiana de infectología.* 2004;8:194–202.
33. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1203–8.
34. Palomino J, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2720–2.
35. Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martin A, Portaels F, Ramarokoto H, et al. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11:683–8.
36. Affolabi D, Sanoussi N, Odoun M, Martin A, Koukpedemji L, Palomino J, et al. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Med Microbiol.* 2008;57:1024–7.
37. Affolabi D, Odoun M, Martin A, Palomino J, Anagonou S, Portaels F. Evaluation of Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance by a Nitrate Reductase Assay Applied to Sputum Samples in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2123–5.
38. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:56–64.
39. Hazbón M. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. *Biomédica.* 2004;24:149–62.
40. Hazbón M, Guarín N, Ferro B, Rodríguez A, Labrada L, Tovar R, et al. Photographic and Luminometric Detection of Luciferase Reporter Phages for Drug Susceptibility Testing of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4865–9.
41. Bardarov S, Dou H, Eisenach K, Banaiee N, Ya S, Chan J, et al. Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diagn Microb Infect Dis.* 2003;45:53–61.
42. Guzmán A, Juárez A, Zenteno R. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. *MedUNAB.* 2003;6:46–51.
43. Parashar D, Chahuan D, Sharma V, Katoh V. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res.* 2006;124:385–98.
44. Bobadilla M, Ponce de León A, Arenas C, Vargas G, Kato M, Small P, et al. *RopB* gene mutation in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polimerasa Chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:1010–3.
45. Estrada-Cuzcano A, Sandoval J, Guevara-Fujita M, Fujita R. Use of the SSCP technique to detect point mutations on human mtDNA. *Rev Peru Biol.* 2005;12:349–58.
46. Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, et al. A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2007;70:301–5.
47. Wu X, Liang J, Zhang J, Lu Y, Li H, Zhang G, et al. Detection and evaluation of the mutations of *embB* gene in ethambutol-susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Chin Med J.* 2005;118:1739–41.
48. Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, et al. A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2007;70:301–5.
49. Miller N, Infante S, Clary T. Evaluation of the LiPA *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1915–9.
50. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2005;5:1–9.
51. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus Assay for Rifampin and Isoniazid Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2635–40.
52. Betts JC. Transcriptomics and Proteomics: Tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. *IUBMB Life.* 2002;53:239–242.
53. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56:103–11.
54. Torres M, Criado A, González N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:160–3.
55. Nusrath A, Selvakumar N, Narayanan S. Molecular analysis of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:71–5.
56. Silva M, Senna S, Ribeiro M, Valim A. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4471–4.
57. Hillemann D, Kubica T, Agzamova R. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9:1161–7.
58. Höfling CC, Pavan EM, Giampaglia CM. Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9:87–93.
59. Bostanabad SZ, Titov LP, Bahrmand A. Detection of mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belarus. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26:143–7.
60. Arráiz N, Bermúdez V, Urdaneta B. Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: Bases moleculares. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 2005;24.
61. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al. Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Microbiol.* 2008;26:143–7.