

CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGÍA
SANTA CLARA, VILLA CLARA

ARTÍCULO DE REVISIÓN

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA TUBERCULOSIS.

Por:

Dra. Calixta Rosa Hernández Del Sol¹ y Lic. Hilda Roque De Escobar Marín²

1. Especialista de I Grado en Microbiología. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología. Santa Clara, Villa Clara. Asistente. ISCM-VC.
2. Licenciada en Microbiología. Departamento de Microbiología del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología. Santa Clara, Villa Clara.

Descriptores DeCS:

TUBERCULOSIS/diagnóstico
TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE
LABORATORIO

Subject headings:

TUBERCULOSIS/diagnosis
LABORATORY TECHNIQUES AND
PROCEDURES

La tuberculosis (TB) es una enfermedad contagiosa a causa de la cual han muerto millones de personas a lo largo de los siglos. En la actualidad sigue siendo un problema de salud pública. En el mundo, siete de cada cien fallecidos se deben a esta enfermedad, y son los países subdesarrollados los más afectados, pues en ellos ocurre el 99 % de las defunciones¹.

En Cuba, de 1992 a 1994, la incidencia se incrementa: de una tasa de 5 por cada 100 000 habitantes en 1991, a 14,3 por cada 100 000 en 1994. En 1995 se logra detener el incremento y se inicia la recuperación progresiva y la declinación en la detección de casos²; en el año 2002 se registró una tasa nacional de 7,6 por 100 000 habitantes³.

El diagnóstico por el laboratorio de TB es una de las estrategias fundamentales para el control de la enfermedad, y la rapidez en proporcionar resultados incide en la atención inicial al paciente y en el control de la cadena de transmisión; implementar, desarrollar o evaluar nuevas tecnologías es una actividad importante en el laboratorio de referencia de TB, como medio para realizar el diagnóstico rápido y preciso.

Baciloscopia

La baciloscopia es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de TB, en la detección de los casos y control del tratamiento, con un costo bajo y de rápida ejecución; es una prueba de tamizaje utilizada para detectar enfermos bacilíferos de los casos pulmonares positivos²; sin embargo, su sensibilidad deja que desear, ya que como regla deben existir entre 5 000 a 10 000 bacilos por mL de expectoración, para obtener 50 % de posibilidades de que puedan ser detectados al microscopio bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)^{2,4}.

El examen directo para visualizar micobacterias en los productos patológicos se efectúa según la técnica de Ziehl-Neelsen; asimismo, pueden utilizarse colorantes fluorescentes, como la auramina o rodamina⁵. La detección de BAAR en un examen microscópico solo proporciona un dato diagnóstico de presunción, debido a que la ácido alcohol resistencia no es específica de M. tuberculosis⁶. En la bibliografía se informa que la baciloscopia de dos muestras de esputos espontáneas logra diagnosticar 96,7% de los pacientes con TB pulmonar sintomática y examen

radiológico de tórax patológico⁷. El Programa Nacional de Control de la TB en Cuba establece indicar dos muestras de esputo a cada paciente que presente síntomas respiratorios, de más de catorce días de evolución².

La concentración de esputo por centrifugación, después de la licuefacción-descontaminación, incrementa la sensibilidad de la baciloscopia de 54,2 % mediante microscopia convencional directa a 63,1 luego de la centrifugación, y en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) positivos, de 38,5 % antes a 50 % después de la centrifugación⁸.

Cultivo

Es el método más sensible y específico para diagnosticar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*; puede detectar una cantidad tan pequeña como diez bacilos por mL de muestra clínica digerida y concentrada. El cultivo puro es necesario para poder identificar las especies de las cepas aisladas⁹, permite asegurar la negativización, así como la curación del paciente¹⁰, y adquiere una gran relevancia en la TB extrapulmonar¹¹.

El cultivo sigue siendo el patrón de oro estándar^{12,13}. Previo a él, es necesario eliminar de las muestras los microorganismos contaminantes y lograr la licuefacción de los restos orgánicos, los cuales interfieren en el crecimiento de las micobacterias; con este fin se utilizan diferentes métodos de digestión y descontaminación^{5,6}. La elección de cualquiera de ellos depende no solo del tipo de muestra, sino de la utilización de determinado medio de cultivo líquido y la realización de técnicas moleculares.

Existen varias técnicas de cultivo: una que utiliza medios sólidos, adecuados para el desarrollo de las micobacterias, como el clásico UIT (Löwenstein-Jense modificado), el Stonebrink y el medio Ogawa². Asimismo, los medios de agar semisintéticos, como el Middlebrook 7H10, 7H11; otros emplean medios líquidos que suponen un mejor crecimiento de las micobacterias, y en la actualidad se recomienda el cultivo primario de todas las muestras en medios líquidos, como el 7H9 y 7H12 de Middlebrook, en frascos cerrados que incorpora una sustancia, generalmente ácido graso, como el ácido palmítico, marcado con carbono radiactivo (¹⁴C). El crecimiento de las micobacterias se comprueba en este último caso al detectar, mediante un aparato adecuado, la aparición de CO₂ radiactivo en el frasco de cultivo (Sistema BATEC). Esto se produce en un período de tiempo muy inferior al necesario para visualizar la aparición de colonias en el medio Löwenstein-Jense^{5,6}; además, tiene una mayor sensibilidad que los métodos bacteriológicos tradicionales⁴. Actualmente se comercializan sistemas de cultivos líquidos, de lecturas completamente automatizadas (BACTEC MGIT 960^{14,15} y MB/Bact); este último llega a tener una sensibilidad y especificidad del 100 %, en comparación con los métodos de cultivo tradicionales; utiliza un sensor colorimétrico y refleja la luz para detectar presencia y producción de CO₂ disuelto en el medio de cultivo, si la muestra contiene CO₂ como producto del metabolismo bacteriano¹⁶.

El sistema Septi-Chek MB (Becto Dickinson) es un método bifásico de lectura manual, que ofrece la posibilidad de disponer de un crecimiento sobre la fase sólida, y puede utilizarse para practicar pruebas de identificación sin necesidad de realizar resiembras adicionales; además, facilita la detección de cultivos mixtos, pero frecuentemente falla el sistema de identificación presuntiva de tuberculosis que lleva incorporado en su fase sólida, y no permite realizar pruebas de sensibilidad *in vitro*⁹.

En un estudio realizado comparativamente, se evaluó el medio MGIT (mycobacterial growth indicator tube), con el cultivo de Ogawa-Kudoh y el de agar de capa delgada (CD) para el diagnóstico de TB, y concluyeron que el MGTI y CD son alternativas para incrementar la rapidez en el diagnóstico de TB, y el MGTI posee mayor sensibilidad en muestras paucibacilares^{15,17}.

Cultivos de sangre para micobacterias

Los pacientes con mayores tasas de VIH poseen las mayores tasas de TB¹⁸, y se incrementan las infecciones diseminadas por *M. avium intracellulare* y *M. tuberculosis* en pacientes con SIDA; esto ha estimulado la introducción de técnicas de detección de micobacterias en sangre; las más eficientes son los métodos de lisis centrifugación y radiométricos, ambos con igual sensibilidad, pero el primero permite cuantificar el número de micobacterias por mL de sangre y controlar

seriadamente la eficacia del tratamiento. Los métodos radiométricos evitan muchas manipulaciones peligrosas que son necesarias en la técnica de lisis centrifugación^{9,11,17}. Puede realizarse centrifugación de la sangre e inoculación de la capa eritrocítica con lisis de desoxicolato de las células o sin ellas, en medios de cultivos sólidos o líquidos². Su uso está indicado en enfermos de SIDA, con linfocitos CD₄ por debajo de 50 cel/mm³ y fiebre de origen desconocido^{9,17}.

Pruebas de identificación de Mycobacterium tuberculosis

A todas las cepas aisladas se les realizará:

1. Frotis y coloración de Zielh-Neelsen para confirmar que se trata de BAAR.
2. Prueba de niacina: además de la técnica convencional que emplea solución alcohólica de bencidina y bromuro de cianógeno, han sido comercializadas por laboratorios Difco, tiras de papel para la detección de niacina, que resulta un método sencillo y eficaz para el diagnóstico de M. tuberculosis; el mismo elimina el riesgo que implican los reactivos de alta toxicidad que se utilizan en el método anterior.
3. Prueba de catalasa 68°C pH = 7.
4. Reducción de nitratos.

Las cepas de M. tuberculosis producen niacina, reducen nitratos a nitritos y poseen catalasa termolábil^{2,5}. Las evidentes limitaciones de las técnicas de identificación bioquímicas estándares (complejidad y lentitud), han estimulado el desarrollo de técnicas alternativas de identificación rápida

Cromatografía

Las micobacterias se caracterizan por poseer una pared celular extraordinariamente rica en lípidos; entre ellos se destacan una serie de ácidos grasos, como los ácidos micólicos, algunos de los cuales son característicos de este género. Se encuentran, además, diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición lipídica de diferentes especies^{5,11,19}, la cual se estudia por técnicas cromatográficas^{5,11,20,21}, de las que existen tres tipos que se aplican a la identificación de micobacterias: la cromatografía de capa fina (CCF), la de gases (CG), y la líquida de alto poder de resolución (HPLC)²¹. De ellas, CG y HPLC son las que mejores resultados han dado; se trata de técnicas muy rápidas que ofrecen resultados en menos de dos horas y son las más eficaces en la identificación. Tienen como inconveniente que el equipo que requieren es caro y no se puede realizar a partir de aislamiento en medios líquidos, por lo que se hace necesario pasar a medios sólidos²⁰.

En la CG, la identificación se basa en el perfil de ácidos grasos de las micobacterias, permite la identificación de prácticamente todas las especies descritas y se realiza en unas pocas horas. Por su parte, la HPLC se basa en el perfil de ácidos micólicos, requiere muy poco inóculo y la identificación puede llevarse a cabo tan pronto como las colonias sean visibles^{9,19}. Estas técnicas han logrado hacer el diagnóstico precoz de la meningitis tuberculosa, mediante la determinación de bandas específicas en líquido cefalorraquídeo²¹. Técnicamente es sencilla y rápida, la interpretación de los patrones obtenidos se ha facilitado por la existencia de programas informáticos, que permiten la comparación de los patrones de ácidos micólicos con los de una colección de 45 especies de micobacterias, que comprenden las más habituales en la clínica humana^{9,19}. No obstante, estas técnicas no dejan de ser un método complejo, que requiere una estructura costosa y gran entrenamiento. La HPLC ha sido útil también en la determinación sanguínea de rifampicina, en pacientes con respuestas lentas al tratamiento antituberculoso²².

Identificación genotípica

La identificación genotípica parece ser la mejor alternativa, precisa y rápida. La sonda genética es un reactivo biológico constituido por un fragmento de ADN, que posee una secuencia de bases complementarias a la del genoma de un microorganismo. Las sondas están marcadas con diversos

indicadores fáciles de detectar²³: isótopos radiactivos (sondas calientes) y sustratos cromógenos (sondas frías).

Cuando se libera el ácido nucleico de un microorganismo y después de desnaturalizar el ADN liberado, se separan las dos hebras que forman la molécula por procedimientos físicos (temperatura 90-140°C); si existe la sonda complementaria ocurre la hibridación, que es el proceso de unión de dos hebras complementarias de ácido nucleico, cuyo origen es distinto; una de ellas será el ácido nucleico diana y la otra, la sonda empleada para localizar este ácido nucleico. Si esta unión ocurre, se detecta fácilmente gracias al marcador que se ha incorporado^{19,24}.

En la última década han aparecido sondas comerciales de ADN (AccuProbe®, GenProbe Inc., San Diego, Estados Unidos) no radiactivas, que permiten identificar por hibridación el ARN ribosómico micobacteriano de forma rápida (dos horas) y específica del complejo M. tuberculosis: el grupo M. avium intracellulare, M. avium, M. intracellulare, M. kansasii y M. gordonae. No existen sondas comerciales para el resto de las especies¹⁹.

Un grupo de estas técnicas requiere de la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de una zona de ADN concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos o de un posterior análisis postamplificación mediante restricción, hibridación o secuenciación^{19,23}.

Desde su introducción en 1985, la PCR –que permite sintetizar por vía enzimática millones de copias de un fragmento específico de ADN– se vislumbró como una técnica que podía revolucionar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, por su rapidez y sensibilidad²⁴.

El diagnóstico de la enfermedad por M. tuberculosis tiene como principal inconveniente lo tardío de los cultivos y la baja sensibilidad de los exámenes directos; en algunas situaciones, las técnicas de biología molecular –como la PCR–, si bien tienen mayor sensibilidad en muestras con baciloscopia positivas, en extrapulmonares no bacilíferas mejoran notablemente su detección y son más sensibles que la técnica convencional, además de aportar rapidez para el diagnóstico^{25,26}.

La extraordinaria sensibilidad es su principal atractivo e inconveniente.

Sus ventajas fundamentales son: una aplicación universal sobre todos los aislamientos, la posible detección rápida y específica directamente de muestras, incluidas las que contienen hematíes o de cultivos recientes, ya sean en medios líquidos o sólidos, la identificación de microorganismos de difícil cultivo, el reconocimiento preliminar de nuevos taxones micobacterianos, la reducción del riesgo biológico derivado de la manipulación de cultivos y una adecuada relación costo-beneficio en los laboratorios clínicos de nivel III, y constituye uno de los modelos de referencia de identificación micobacteriana clínica habitual en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados^{23,27}.

Entre las desventajas de estas técnicas, puede mencionarse que no pueden sustituir completamente los métodos tradicionales, puede existir contaminación potencial y ser baja su comercialización^{11,19,20}.

En la actualidad existe variedad de técnicas con diferentes niveles de aplicación, algunas de las cuales pueden ser perfectamente instauradas en los laboratorios de diagnóstico con un desembolso inicial asumible, un escaso mantenimiento y un rendimiento óptimo^{19,27}.

Condiciones indispensables para su realización²⁷:

1. Personal altamente entrenado.
2. Muestras clínicas adecuadas: esputo purulento o mucoide, en los exudados (líquidos pleurales, pericárdicos, ascíticos) que tienen poca concentración de bacilos, se necesitan por lo menos 5 mL, en LCR 2 mL, y lavados bronquiales muy útiles en el diagnóstico.
3. Laboratorios con estructura apropiada; tres áreas separadas y aisladas (aislamiento, amplificación y detección)²⁷.

En el aislamiento es imprescindible elegir la secuencia diana amplificada. En las micobacterias existen regiones bien conservadas de ADN específicas de género; en la actualidad, las más estudiadas son el gen hsp65, que codifica la proteína micobacteriana de 65KDa y regiones genómicas de la subunidad ribosómica 16S. No obstante, existen otras zonas útiles, como la región intergenética 16S-23S ribosomal y los elementos de inserción, entre otros¹⁹. El ADN se puede extraer directamente de la muestra clínica o de medios de cultivo sólidos o líquidos; los métodos

más sencillos y prácticos son: hervir una suspensión de colonias micobacterianas durante 20 min o rotura mecánica de la célula por ultrasonido^{23,24,27}.

La amplificación es el proceso que permite múltiples copias de ADN específicos (target)²⁷, mediante la adición de enzimas ADN polimerasa con cebadores o iniciadores de la reacción, que son dos oligonucleótidos que van a delimitar la secuencia de ADN que se quiere amplificar^{23,24}.

La detección se logra mediante el análisis de postamplificación, que puede ser por los siguientes métodos: restricción, secuenciación e hibridación.

La restricción se basa en el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), el cual permite la identificación rápida, precisa y económica de todas las cepas de micobacterias en los laboratorios clínicos²⁸.

La secuenciación automática con iniciadores marcados con fluoresceína representa un avance sustancial y soluciona la identificación de muchos microorganismos que es imposible detectar por métodos convencionales. Representa el patrón de oro de referencia de las identificaciones genotípicas, pero es un método caro y laborioso, cuyo uso queda limitado para los laboratorios de referencia^{15,19}.

La hibridación en fase sólida es una técnica basada en sondas cortas de ADN específico de especie y presentadas en formatos más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc.). En una sola prueba se aplica el producto de amplificación sobre diversas sondas de los microorganismos aislados con más frecuencia, y que poseen importancia clínica^{29,30}.

Las técnicas de amplificación y detección en tiempo real se comenzaron a utilizar con fines diagnósticos; estos métodos se basan en la realización simultánea de la amplificación de una zona diana concreta y el reconocimiento mediante hibridación, que detecta y cuantifica por medio de diferentes fluorocromos. Las mayores ventajas residen en su rapidez³ y la posibilidad futura de aplicación para una amplia variedad de especies, así como la detección e identificación directa de muestras clínicas^{24,31,32}.

Diferentes sistemas se han comercializado, como Cobas Amplicor MTB (Roche Diagnostic Systems), el cual permite la detección de *M. tuberculosis* en muestras respiratorias con una buena sensibilidad y especificidad, y disminuye en las no respiratorias^{12,31}, y el sistema Gen-Probe Amplified MTD (Gen-probe, Inc., USA) que se puede utilizar tanto en muestras respiratorias como en líquidos estériles, aspirados gástricos, orinas, sangre y otros¹⁷. Ambos sistemas ofrecen sensibilidad y especificidad que exceden el 95 % en los casos de frotis positivos; la especificidad para casos con frotis negativos es extremadamente alta, pero la sensibilidad varía entre 40 - 77%¹⁷. Nuevos sistemas de amplificación están siendo estudiados, como Q β replicasa (Galileo-Probe Amplification, Gene-Trak), Nasba Amplification System (Organon Técnica, NY.)³¹.

En la actualidad existen diversos sistemas de amplificación y marcaje, aunque solo uno está comercializado: BD Probe Tec ET (Becton Dickinson, Sparks, EE.UU.)¹⁶.

En un estudio internacional, donde se utilizaron varios métodos de amplificación, se usaron 20 muestras ciegas de esputo que contenían 0, 100, y 1000 *M. bovis* (con una sola copia de target IS6110) y fueron enviadas a laboratorios de 18 países diferentes. Solo 5 (16 %) de 30 laboratorios identificaron la presencia o ausencia de micobacterias y 17 (57 %) hallaron falsos positivos¹⁷. A pesar de esto, se informa la utilidad de estas técnicas en la identificación de *M. tuberculosis* en localizaciones de difícil diagnóstico, tales como la TB ocular²⁸ TB meníngea^{33,34} y TB miliar³⁵.

Estudio de sensibilidad *in vitro*

Los estudios de sensibilidad *in vitro* pueden realizarse a partir de muestras, cuando en ellas se observan abundantes bacilos en el examen microscópico (método directo), o a partir de cultivos en fase exponencial (método indirecto)³¹.

Los métodos estandarizados para el estudio de la sensibilidad son: el de las proporciones y diluciones múltiples de Canetti, actualmente empleado como patrón de oro^{36,37}, el de la concentración absoluta de Meissner y el de nivel de resistencia de Mitchison; los tres métodos emplean el medio de Löwenstein-Jense; tienen el inconveniente de la demora en obtener sus resultados y de que son trabajosos^{5,11}.

Los estudios de sensibilidad pueden realizarse por técnicas radiométricas BACTEC, las cuales son más rápidas (5 a 8 días)^{5,11,38}; también se pueden utilizar otros métodos rápidos de detección de resistencia en *M. tuberculosis*, entre los que se encuentran: sistemas de luciferasas, pruebas

colorimétricas^{11,38} y técnicas moleculares para la detección de mutaciones que le confieren resistencia^{24,39}.

La magnitud y el impacto futuro del actual problema de la resistencia de las micobacterias a los medicamentos antituberculosos son aún desconocidos. El programa de vigilancia de la TB de la OMS informó en 1994 la existencia de multidrogorresistencia en todo el mundo, con prevalencia de 1,4 % para la multidrogorresistencia primaria y 13% para la secundaria⁴⁰; esto explica la importancia del empleo de técnicas cada vez más rápidas para determinar la susceptibilidad de *M. tuberculosis*.

Pruebas serológicas

En los últimos años se avanzó en el diagnóstico serológico de la TB, porque se ha trabajado con técnicas más sensibles y antígenos purificados más específicos. La técnica de enzoinmunoanálisis (ELISA), parece ser la que ofrece mejores perspectivas, pero no ha mostrado sensibilidad y especificidad como para ser útil, y tiene un valor predictivo escaso cuando se utiliza en una población que presumiblemente presenta una probabilidad baja de enfermedad^{27,41,42}. En pacientes infectados con VIH, la determinación de anticuerpos A60 resultó útil para el diagnóstico de la infección por *M. tuberculosis*⁴³.

Técnicas como ayuda en la epidemiología de la TB

Susceptibilidad a micobacteriófagos.

Solo dos métodos han demostrado tener cierta utilidad clínica: la LPR (Luciferase Reporter Phage) y el FAST/aqueTB o PhageTek MB, los cuales se diferencian básicamente en la detección de células micobacterianas infectadas por el fago; en el primero se utiliza la emisión de luz que es codificada por el gen de la luciferasa, el cual se encuentra incorporado en el genoma del fago; en el segundo, la detección se basa en la presencia de múltiples células micobacterianas viables infectadas tras una amplificación fágica.

Estas técnicas han mostrado, además, utilidad en el diagnóstico de TB en muestras respiratorias, en la identificación de *M. tuberculosis* a partir de cultivos, y en las pruebas de susceptibilidad a la rifampicina e isoniacida. Se trata de técnicas sencillas, rápidas (48 h), relativamente económicas, que requieren poco entrenamiento técnico; sin embargo, se deben tener en cuenta los problemas de sensibilidad y especificidad en los escasos estudios realizados^{19,44}.

Técnicas moleculares

Estas técnicas permiten establecer con precisión las cepas circulantes en una población. Se han utilizado la macrorrestricción genómica, seguida de electroforesis con alternancia de campo, los patrones de restricción hibridación con sondas complementarias de secuencias repetidas en el genoma de *M. tuberculosis* o el polimorfismo de amplificación por PCR. El resultado final de estas técnicas ofrece una imagen, que a la vista del observador ha sido comparada con las huellas dactilares de los seres humanos; es por eso que se les conoce como "huellas de ADN"²³. El marcador más utilizado ha sido el estudio del polimorfismo de restricción-hibridación, que utiliza la frecuencia de inserción IS6110^{36,45,46}.

El genoma de *M. tuberculosis* contiene en general un elevado número de copias de IS6110 (de 5-20), localizadas en posiciones variables a lo largo del cromosoma; la ubicación de estos segmentos se determina mediante la digestión de ADN con enzimas endonucleasas de restricción y, posteriormente, se separan los fragmentos por electroforesis de gel de agarosa; seguidamente son transferidos a una membrana (southern-blot), que sirve como soporte para realizar la reacción de hibridación, donde se utiliza una sonda complementaria. Las cepas no relacionadas epidemiológicamente presentan patrones de restricción hibridación propios y, por tanto, un elevado grado de polimorfismo; contrariamente, las cepas relacionadas muestran patrones idénticos, y puede establecerse fácilmente una relación de clonalidad^{24,31}.

En las cepas de *M. tuberculosis* sin ninguna copia de IS 6110 en su cromosoma o con un número muy reducido de ellas normalmente en posiciones constantes, no ocurre lo mismo; en estos casos

es necesario diferenciar las cepas no relacionadas epidemiológicamente con otros marcadores moleculares, como puede ser el IS6107, que parece ser específico del complejo *M. tuberculosis*⁴⁷. Los marcadores epidemiológicos pueden utilizarse para conocer el patrón epidemiológico general en una población, en el control de epidemias, en la diferenciación entre reinfecciones exógenas y endógenas, en las recidivas y en el estudio de las contaminaciones cruzadas en los laboratorios³¹.

Referencias bibliográficas

1. González Ochoa E, Armas Pérez L. Tuberculosis: procedimientos para la vigilancia y control. La Habana: Ciencias Médicas; 2002.
2. Marrero Figueroa A, Carreras L, Valdivia Álvarez JA, Montoro Cardoso E, González Ochoa E, Torres Peña R, et al. Programa nacional de control de la tuberculosis: Manual de normas y procedimientos. La Habana: Ciencias Médicas; 1999.
3. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Estadísticas. Anuario estadístico de salud 2003. La Habana. MINSAP; 2003.
4. Jaime Roberto R, Mejías GI. Actualidad en el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio. *Infecto*. 2001;5(4):251-9.
5. Jawetz E, Melnick JL, Edgard AA. Micobacterias. En: *Microbiología médica*. México: El Manual Moderno; 1999, p.343-56.
6. Auxina Ruiz V. Tuberculosis en enfermedades infecciosas bacterianas. En: Farreras Rosean. *Medicina interna vol 2*. 14 ed. Barcelona: Mosby Doyma; 2000.236-49.
7. Wu ZL, Wang AQ. Diagnosis view of repeated smear microscopy examinations among patients suspected of pulmonary tb in Shandong province of China. *Int J Tub Lung Dis*. 2000;4(11):1086-7.
8. Bruchfeld J, Aderaye G, Palme IB, Bjovanta B, Kallenius G, Lindquist L. Sputum concentration improves diagnosis of tuberculosis in a setting with a high prevalence of HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(6):677-80.
9. Casal M, Guerrero A, Martín N. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. En: *Recomendaciones de la SEPAR Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Barcelona: Doyma; 1999, p.325-54.
10. Vidal R, Rey R, Espinar A. Tratamiento y retratamiento de la tuberculosis. En: *Recomendaciones SEPAR*. Barcelona: Doyma; 1998, p156-66.
11. Montoro Cardoso G, Suárez Moreno JA. Micobacterias. En: Llop Hernández A, Valvés Dapena Vivanco MM, Zuazo Silvia JL. *Microbiología y parasitología*. Vol. 1. La Habana: Ciencias Médicas; 2001, p.363-85.
12. Jonson B, Ridell M. The Cobas Amplicor MTB test for detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and non-respiratory clinical specimens. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(6-7):372-7.
13. Parvez MA, Hasan KN, Rumi MA, Ahmeds C, Salimullah M, Thahera Y, et al. PCR can help early diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34(1):147-53.
14. Kantos F, Penitiaki E, Nicolaou S, Gitti Z, Anagnostou S, Maniati M, et al. Multicenter evaluation of the fully automated bactec MGIT 960 system and three molecular methods for the isolation and the identification of mycobacteria from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46(4):299-301.
15. López LM, Vélez CI, Zuluaga LM, Mejía GI, Estrada S, Posada P, et al. Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. *Infectio*. 2001;5(4):235-40.
16. Bergmann JS, Keating WE, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbeTecET system for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2000;38:863-5.
17. Hass DW. Micobaterium tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and practice of infection diseases*. Vol. 2. 5th ed. New York: Harcourt Health Sciences Company; 2000; p, 2576-607.
18. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report. Geneva WHO; 2001, p. 287-360.

19. Alcaide Fernández de Vega F. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. En: Control de la calidad SEIMC [monografía en Internet]. Barcelona; 2002 [citado 4 Feb 2004]. Disponible en:
<http://www.seimc.org/control/revi-Micobact/Nmetvk.htm>
20. Marrero Lozano MC, Calvo Martín A, Garrigó Fullola M. Diagnóstico rápido de tuberculosis. Rev Enferm (ROL). 2000;23(1):75-8.
21. Victorino Farga C. Otras técnicas de diagnóstico de la tuberculosis [monografía en Internet] . 2001 [citado 4 Feb 2004]. Disponible en:
http://www.med.uchile.cl/otros/dra_ancic/capitulo25.html
22. Mehta JB, Shantaveerapa H, Byrd RP, Morton SE, Fountain F, Roy T. Utilidad de la determinación de la concentración sanguínea de rifampicina en pacientes con respuestas lentas al tratamiento antituberculoso. Infecto. 2001;5(4):203-12.
23. Maestres Mesa JL. Aplicaciones de la biología molecular a la microbiología médica. En: Llop Hernández A, Valdés-Dapena Vivanco MM, Zuazo Silva JL. Microbiología y parasitología médica. Vol.3. La Habana : Ciencias Médicas; 2001, p. 619-30.
24. Negrín Martínez S, Ayala Ávila M, Sosa Espinosa AE, Diosdado Salces E, Herrera Martínez L, Berovides Álvarez V. Historia y repercusión de un descubrimiento. La estructura espacial de la molécula de ADN. Universidad para todos. La Habana: Editorial Academia; 2003, p. 30-1.
25. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Millar WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol. 2003;41(7):3233-40.
26. Parvez MA, Hasan KN, Rumi MA, Ahmed S, Salimullah M, Tahera Y. PCR can help early diagnosis of pulmonary tuberculosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003;34(1):147-53.
27. Qué son las técnicas de biología molecular [monografía en Internet]. 2004 [citado 4 Feb 2004]. Disponible en:
<http://www.funcei.org.ar/pdf/simposio/Técnicas%20moleculares%20en%20la%20practica%20diaria.pdf>
28. Biswas J, Shorne D. Choroidal tubercles in disseminated tuberculosis diagnosed by the polymerase Chain reaction of aqueous humor. A case report and review of the literature. Ocul Immunol Inflamm. 2002;10(4):293-8.
29. Suffys PN, da Silva Rocha A, de Olivera M. Rapid identification of mycobacteria to the species level using Inno-LIPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. J Clin Microbiol. 2001;39:4477-82.
30. Ruiz P, Gutiérrez J, Zerolo FJ, Casal M. Genotype mycobacterium assay for identification of mycobacterial species isolated from human clinical samples by using liquid medium. J Clin Microbiol. 2002;40:3076-8.
31. Caminero JA, Casal M, Ausina V, Pina JM, Sauret J. Diagnóstico de la tuberculosis. En: Recomendaciones SEPAR. Barcelona: Ediciones Doyma; 1999, p.225-50.
32. Warren RM, Víctor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, van Pittius NC. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169(5):554-5.
33. Rafi A, Naghily B. Efficiency of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis meningitis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003;34(2):357-60.
34. Desai MM, Pal RB. Polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Indian J Med Sci. 2002;56(11):546-52.
35. Taci N, Yurdakul AS, Ceyhan I, Berktaş MB, Ogretensoy M. Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA from peripheral blood in patients with HIV-seronegative and new cases of smear-positive pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction. Respir Med. 2003;97(6):676-81.
36. Gómez RI, Díaz R, García N, Valdivia A. Estudio epidemiológico-molecular de un brote de tuberculosis en el hospital psiquiátrico de La Habana. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2000;38(3):2001-9.
37. Guerrero MI, Suffys PN, Vanderborcht B, De Olivera MM, Cohen IB, León CI. Comparación de métodos moleculares útiles en la detección rápida de Mycobacterium tuberculosis multirresistente (MTB-MRD). Infectio. 2001;5(4):203-12.

38. Casal M. Microbiología de las enfermedades infecciosas ocasionadas por micobacterias [monografía en Internet]. Córdoba: Centro de Referencia de Micobacterias; 2000 [citado 5 May 2004]. Disponible en:
<http://www.seimc.org/control/revi Micobac/bkrev.html>
39. Pina A, Orru M, Masia MD, Sotgiu G, Muresu E, Maida A. Detection of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis strains by single-strand conformation polymorphism analysis and restriction fragment length polymorphism. *New Microbiol.* 2003;26(4):375-81.
40. Tobón AM. Tratamiento de la tuberculosis multirresistente. *Infectio.* 2001;5(4):260-5.
41. Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK. Diagnosis of tuberculosis: available Technologies, limitations, and posibilidades. *J Clin Lab Anal.* 2003;17(5):155-63.
42. Hawkey PM, Simith EG, Evans JT, Monk P, Bryan G, Mohamed HH. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis compared to IS 6110 base restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3514-20.
43. Blanco JR, Martínez V, Rosel L, Gómez Cordañanos R, Otero JA. Determinación de anticuerpos A-60 para el diagnóstico de la infección por M. tuberculosis. Una herramienta útil para la racionalización de quimioprofilaxis en pacientes VIH. *An Med Int.* 2001;18(3):127-31.
44. Mole RJ, Maskell TW. Phage as diagnostic-the use of phage in TB diagnosis. *J Chem Technol Biotechnol.* 2001;76:683-8.
45. Iñigo J, Chávez F, Arce A, Alonso M, Palenque E, Jaén F, et al. Transmisión reciente de la tuberculosis en Madrid : utilidad de técnicas moleculares. *Med Clin.* 2000;115(7):141-5.
46. Fernández JI, Fernández K, Catalán S, Alonso M, Chávez F. Transmisión de la tuberculosis en las prisiones de Madrid. *Med Clin.* 2000;115(7):246-50.
47. Dziader J, Wolinska I, Sajduja A, Dela A, McFadden JJ. IS 6107, a single-copy insertion sequence-related element of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Int J Tuberculosis Lung Dis.* 2000;4(11):1078-81.