



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO



INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO
SUBDIRECCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION
JEFATURA DE SERVICIOS DE INVESTIGACION

HOSPITAL REGIONAL "GRAL. IGNACIO ZARAGOZA"

TESIS PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN MEDICINA
INTERNA

TITULO

DETERMINACIÓN POR MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE
LA ESPECIE DE LAS MICOBACTERIAS OBTENIDAS POR CULTIVO
DE ESPECÍMENES CLÍNICOS EN EL LABORATORIO CENTRAL DEL
HOSPITAL REGIONAL "GRAL. IGNACIO ZARAGOZA".

INVESTIGADORA

DRA. ROSILDA SANTOS MONTERO

ASESORES DE TESIS

DR. BULMARO MANJARREZ TÉLLEZ
DR. MUSLIM SCHABIB HANY

México, Distrito Federal 2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. ALBERTO TREJO GONZÁLEZ.
PROF. TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA INTERNA.
UNAM-I.S.S.S.T.E.

DR. JUAN MANUEL BARRERA.
COORDINADOR DE MEDICINA INTERNA.

DR. MUSLIM SCHABIB HANY.
MEDICINA INTERNA -INFECTOLOGÍA.
ASESOR DE TESIS.



DR. BULMARO MANJARREZ TÉLLEZ
MEDICINA INTERNA- INFECTOLOGÍA.
ASESOR DE TESIS.





**M. EN C. CARLOS MIGUEL SALAZAR JUÁREZ.
JEFE DE CAPACITACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO**



**DR. JOSE GUADALUPE FLORES GALICIA.
COORDINADOR DE CAPACITACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO.**

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS DE LA SECRETARÍA DE SALUD Y EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DEL HOSPITAL REGIONAL "GENERAL IGNACIO ZARAGOZA" BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. HIRAM OLIVERA DÍAZ, EL QFB CARLOS A. VÁZQUEZ CHACON Y LA QFB. MARIA DEL ROCÍO LOPEZ ALVAREZ.

ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirubonucleico
Amika	Amikacina
Cipro	Ciprofloxacino
Claritro	Claritromicina
CMTb	Complejo micobacterium tuberculosis
DATP	DNA adenosin trifosfato.
DTTP	DNA timidin trifosfato.
DCTP	DNA citocin trifosfato.
DGTP	DNA guanidin trifosfato.
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Estrepto	Estreptomicina
Eta	Etambutol
Ganglio L.	Ganglio Linfático
HAIN	Isoniacida
HPLL	Cromatografía Líquida de alta resolución
L.derrame p.	Líquido de derrame pleural
M	Micobacterium
µL	Microlitros
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloruro de sodio
Ofloxa	Ofloxacino
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
Rif	Rifater
RFLP	Polimorfismo del tamaño de Fragmentos de Restricción
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TRIS	Hidroximetil aminometano hidrocloreto
STM	Estreptomicina
Tb	Tuberculosis
TBMDR	Tuberculosis multidrogo resistente
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

SUMMARY.

Tuberculosis infects 1,7 thousands of million people all over in the world, this is one third of the world-wide population, and causes three million deceases per year, the most representative number for an isolated infectious disease. Essential factors that allow a fast propagation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), are crowding and people with some kind of acquired immunocompromise. In addition to MTb, other nontuberculosis mycobacterias exist that appear most frequently, mainly in patients with specific immunocompromise. Many of these mycobacteria do not respond to the antifimic therapeutics.

In a effort to improve the quality of attention to public health patients and as in our means it is not possible to make the determination of species regularly, it was necessary to determine it by nonconventional means of molecular biology; we used a relatively new method - not yet implemented in our welfare medical units- that consist of extraction and amplification of DNA by PCR and enzymatic digestion by fragments of restriction RFLP. In this study 101 samples with isolation of *Mycobacterium* sp were analyzed in the Lowenstein culture. Due to the nonoptimal conditions in culture means, 23 stocks were only viable for the obtaining of DNA. Fifteen of these (65.21%) corresponded to *Mycobacterium tuberculosis* and 8 (34.78%) to nontuberculosis mycobacterias. 21 samples were from male patients (91.3%) and 2 (8.69%) female; in 17 (73.91%) there was comorbidity with HIV -12 with lymphocytes TCD4+ smaller to 250 cells/mm³ -: 10 (58.82%) had MTb, 6 (35.29%) *M. avium* and one *M. intracellulare*; _ in three with diabetes mellitus (13.04%) were identified 2 MTb and a *M. kansasii*; other 3 with another type of comorbidities were infected by MTb. We observed that there was an unexpected high proportion of nontuberculosis mycobacterias, mainly associated to infection with VIH with low TCD4 counts lymphocytes, nevertheless the complex tuberculosis, still predominant.

The identification of species of mycobacteria would be excellent in the clinical evolution subset of patients since it would improve election of the medical treatment and the answer to the same one, with improvement in mortality. Thus, continuity must be important to search faster and efficient diagnosis methods for this disease.

RESUMEN.

La tuberculosis infecta 1.7 miles de millones de personas en todo el mundo, es decir una tercera parte de la población mundial, y provoca tres millones de muertes por año, la cifra más representativa para una enfermedad infecciosa aislada. Los dos factores esenciales que permiten una propagación rápida de MTb, son el hacinamiento y la población que presenta algún tipo de inmunocompromiso adquirido. Además de *Mycobacterium tuberculosis* existen otras micobacterias no tuberculosas que se presentan con mayor frecuencia principalmente en pacientes con inmunocompromiso específico. Muchas de estas micobacterias no responden al tratamiento antifímico.

En un esfuerzo para mejorar la calidad de atención al derechohabiente y como en nuestro medio no es posible realizar regularmente la determinación de especie fue necesario determinarla por medios no convencionales de biología molecular; empleamos un método relativamente nuevo -aún no implementado en nuestras unidades médicas asistenciales- que consiste en extracción y amplificación de DNA por PCR y digestión enzimática por fragmentos de restricción (RFLP). En este estudio se analizaron 101 muestras con aislamiento de *Mycobacterium sp* en medio de Lowenstein. Debido a las condiciones no óptimas en el medio de cultivo, sólo fueron viables para la obtención de DNA 23 cepas. Quince de éstas (65.21%) correspondieron a *Mycobacterium tuberculosis* y 8 (34.78%) a micobacterias no tuberculosas. En su correlación clínica 21 muestras procedieron de pacientes de sexo masculino (91.3%) y 2 (8.69%) de casos de sexo femenino; en 17 (73.91%) hubo comorbilidad con VIH -12 con linfocitos TCD4+ menores a 250 células/mm³-; 10 (58.82%) tuvieron MTb, 6 (35.29%) *M. avium* y uno *M. intracellulare*; en tres con diabetes mellitus (13.04%) se tipificaron 2 MTb y un *M. kansasii*; los 3 restantes con otro tipo de comorbilidades fueron tuberculosos.

Por lo anterior observamos que hubo una proporción inesperada de micobacterias no tuberculosas, principalmente asociada a infección por VIH con bajas cifras de linfocitos TCD4+; sin embargo éstas no desplazaron a especies del complejo tuberculosis, aún predominante. La identificación de especie de micobacterias resultaría relevante en la evolución clínica de los pacientes ya que mejoraría la elección del tratamiento farmacológico y la respuesta al mismo con repercusión en la mortalidad de estas infecciones. Así debe darse continuidad a esta tarea y/o a la búsqueda de métodos más rápidos y eficientes de diagnóstico para este tipo de entidades.

INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis -TB-, designada también como tisis o peste blanca, es una infección, a menudo persistente, causada por especies de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* -CMTb- (en particular *M. tuberculosis* -MTb- y *M. bovis*); suele afectar cualquier órgano del cuerpo, comúnmente los pulmones, y por histopatología la caracterizan los granulomas tuberculosos.

Existen evidencias pre-históricas de TB espinal en restos humanos del período neolítico al igual que en momias egipcias y precolombinas. Sin embargo, esta infección se convirtió en un problema severo cuando el hacinamiento -rural y urbano- asociado a las malas condiciones de vida y alimentación, durante las épocas pre-industrial e industrial comportaron circunstancias epidemiológicas que favorecieron su propagación en las poblaciones y su agravamiento en cada sujeto. En los siglos XVII y XVIII, la TB causó una cuarta parte de las muertes de adultos ocurridas en Europa. (<http://www.state.nj.us/health/cd/tbhstry.htm>).

---Panorama epidemiológico mundial---

La era moderna de la entidad inició en 1946, al demostrarse el beneficio de la Estreptomicina -STM-; en 1952 se obtuvo la Isoniacida -HAIN-, fármaco más eficaz que hizo curable a esta enfermedad en la mayoría de los casos. En 1970, se descubrió que la rifampicina -RFM- era al menos tan efectiva como la isoniacida. La terapia exitosa redujo la prevalencia de la TB y estimuló la promoción de programas para su erradicación.

Sin embargo, actualmente este objetivo se ha tornado imposible debido a circunstancias inesperadas. En 1985, en los Estados Unidos, la frecuencia de casos de tuberculosis aumentó por primera vez en más de dos décadas y desde entonces se han observado índices crecientes, atribuibles en gran proporción al desarrollo de tuberculosis en sujetos afectados por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y a transmisión de MTb desde estos pacientes a otras personas de la comunidad. La frecuente interrelación de factores como el uso de drogas ilegales, el desempleo, la carencia de vivienda digna y la infección por el VIH predispone a la reactivación de focos de infección remota y a la adquisición o propagación epidémica de nuevos casos de enfermedad, motivados por la no adherencia de estos individuos al tratamiento prescrito, así como al desarrollo

y diseminación de cepas resistentes a drogas antifímicas de primera línea: se ha definido como "multidrogo-resistencia" a la resistencia a HAIN y RFM, los medicamentos fundamentales de la terapia antituberculosa (7). En la población citada ha surgido la tuberculosis resistente a múltiples fármacos -TBMDR- y se ha propagado a otros sujetos, sobre todo a personal del área de la salud. Así, muchos programas terapéuticos, exitosos previamente, resultaron deficientes a causa de la resistencia medicamentosa y a la falta de apego al tratamiento (8).

Actualmente la TB afecta a 1.700 millones de personas en el mundo, es decir una tercera parte de toda su población y provoca 3 millones de decesos cada año, las mayores cifras para una infección aislada. Las poblaciones más afectadas son las más depauperadas del planeta, condiciones que se agravan en forma recíproca y resaltan la relevancia de los estudios que indagan sobre esta situación y sobre su mejor abordaje clínico y epidemiológico.

---Epidemiología de la tuberculosis en México---

En el decenio de 1984-1993, el número de casos notificados de TB en la República Mexicana se mantuvo estable, con ligeras variaciones anuales en incremento o decremento en cuanto a la tasa de incidencia, mientras que la mortalidad mostró un descenso constante, lento y poco significativo.

En 1993 se notificaron 15,145 casos de tuberculosis en todas sus formas, cifra 4.6% superior a la de 1991; si la reducción observada en 1992 con respecto a 1991 (15,109 casos) se hubiera mantenido, al año siguiente el número de casos esperados sería 13,812; es decir que hubo un agravamiento en la situación epidemiológica de la tuberculosis debido a diferentes factores, entre ellos la infección por VIH y la desnutrición. En nuestro país el descenso en el número de casos se puede interpretar como abandono de las actividades de control, o bien como un subregistro. Actualmente hay en México evidencia para pensar que existe una baja detección de casos de tuberculosis, ya que en encuestas realizadas por la OMS en diversas partes del mundo a partir de los años 50 se estimaba una tasa anual de infección tuberculosa para América Latina de 0.5 a 1.5%. De esta manera, una tasa de infección de 0.5% estimada equivaldría a cerca de 500,000 infecciones anuales y a una prevalencia de más de 25 millones de infectados en total y con 25 mil casos nuevos de TB de los cuales solo se registraron el 60%.

Por otro lado, antes del tratamiento antituberculoso, por cada defunción atribuida a esta enfermedad se estimaban dos casos nuevos o sea una proporción de 1:2. Debido al tratamiento actual, oportuno y eficiente, la relación mortalidad incidencia se ha modificado alcanzando en los países desarrollados cifras de 1:15 y 1:20; en México, las tasas de mortalidad de 6.0 e incidencia de 16.6 por tuberculosis correspondientes a 1992 representan una razón de mortalidad-incidencia de 1:2.7 lo que traduce una subestimación en el registro. En nuestro país aún no ha sido determinada bien la influencia que el VIH tiene para con respecto al riesgo de desarrollar tuberculosis si bien se encuentran las condiciones para que esto ocurra en un buen porcentaje como son : a) prevalencia de infección tuberculosa superior al 30% en la población de 15 a 44 años de edad , b) bajas tasas de detección y curación de casos nuevos de tuberculosis y c) incremento de la multidrogo-resistencia (12).

MICROBIOLOGIA

El orden Actinomycetales comprende a la familia Mycobacteriaceae con su único género *Mycobacterium* que abarca al bacilo tuberculoso; el complejo *Mycobacterium tuberculosis* -CMTb- incluye al *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y otros. Estos microorganismos deben diferenciarse de muchas otras especies de micobacterias, asociadas con una patogenicidad y una importancia clínica variables, que comparten la característica de ácido-alcohol resistencia. Las características bacteriológicas y la homología del DNA de otras especies de micobacterias -*M. microti* y *M. africanum*- tienen relaciones muy estrechas y corresponden a los otros dos miembros del complejo *M. tuberculosis*. En la actualidad *M. bovis* infecta a poblaciones seleccionadas y esta asociada con resistencia uniforme a pirazinamida.

Los seres humanos constituyen el único reservorio de *M. tuberculosis*, este microorganismo se desarrolla lentamente con un tiempo de generación de 15 a 20 h. La formación de colonias visibles tarda como mínimo tres semanas y por lo general 4-6 semanas en medios estándares. Crece en grupos paralelos y produce colonias características en forma de cordones serpenteantes. En la primera mitad del siglo XX las micobacterias eran categorizadas por especies según su acción patógena en cobayos y se consideraba contaminantes a todas las micobacterias no tuberculosas; actualmente se demostró lo contrario (9). Aunque en la práctica la tuberculosis se diagnóstica mediante frotis-tinción de esputo y confirmación por cultivos, el advenimiento de medicamentos eficaces contra la enfermedad y la identificación de cepas resistentes a estos fármacos

crearon la necesidad de desarrollar métodos micobacteriológicos más precisos. La mayor precisión de los estudios bacteriológicos condujo a la identificación de aislamientos clínicos de micobacterias que desarrollaban colonias distintas a las tuberculosas, no son patógenas para cobayos y expresan resistencia a la isoniacida. Estas micobacterias "atípicas" o no tuberculosas difieren de *Mtb* por ser bacterias de vida libre, no asociadas a transmisión interpersonal significativa y con menor susceptibilidad a fármacos antifímicos. Basado en características de crecimiento y fisicoquímicas, E. Runyon conformó 4 grupos de micobacterias: fotocromógenas, escotocromógenas, no cromógenas y de desarrollo rápido. Nuevas técnicas de especiación han reemplazado este sistema de clasificación. *Mtb* se diferencia de otras micobacterias por pruebas bioquímicas, crecimiento lento con carencia de pigmento, producción de niacina, reducción de nitrato, producción de catalasa termosensible y sensibilidad a isonicida de manera regular. Los frotis teñidos preparados de frascos BACTEC revelan la formación de cordones en serpentina, hallazgo que tiene una especificidad de 95% para *M. tuberculosis*. Las no tuberculosas muestran una orientación aleatoria en la baciloscopia.

Existen diversos métodos alternativos para categorizar a las especies aisladas en un cultivo. Métodos de hibridación de ácidos nucleicos basados en el uso de sondas de DNA específicas permiten identificar a *M. tuberculosis* y a otras especies de micobacterias como el complejo *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*; estos métodos requieren varias horas y solamente son apropiados para microorganismos en cultivos puros. También puede realizarse la caracterización de especies mediante cromatografía líquido-gaseosa (GLC) asistida por computadora; ésta se realiza en laboratorios de referencia y no se efectúa de manera ordinaria en unidades médicas.

La aplicación reciente de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido la identificación precisa de especies; esta técnica permite detectar hasta 10 microorganismos por ml en muestras clínicas -ventaja comparada con los 10,000 necesarios para la obtención de resultados positivos en un frotis- pero no permite establecer diferencias entre bacterias vivas y muertas.

Las técnicas moleculares de huellas de DNA basadas en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se convirtieron en el estándar de oro para identificar cepas individuales de micobacterias: el método emplea fragmentos de DNA generados por una endonucleasa de restricción específica, separados por técnicas electroforéticas e identificados mediante una sonda que hibrida hasta llegar a una secuencia de DNA repetitiva, la secuencia de

inserción 6110. Dado que la localización cromosómica de esa secuencia es muy variable los aislamientos con un patrón RFLP muy semejante -aunque no sea idéntico- pueden considerarse representantes de una misma cepa. Esto hace posible la realización de estudios epidemiológicos. Un estudio nacional de comparación de tres técnicas para la determinación de especies de micobacterias: pruebas bioquímicas, cromatografía líquida de alta resolución y reacción en cadena de polimerasa mediante polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) se propuso un algoritmo: Si las pruebas bioquímicas determinan una bacteria no tuberculosa el aislado será analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); si la identificación no es clara la cepa se analizará mediante PCR-RFLP; si el aislado aún no denota su pertenencia definida a un patrón descrito se identificará por secuenciación de ADN (5).

Por décadas, microorganismos tuberculosis-like fueron ocasionalmente aislados y considerados en su momento contaminantes pasajeros. El desarrollo de quimioterapia efectiva, los cultivos y las técnicas de biología molecular han destacado el papel de esos organismos como causa de enfermedades humanas: afectan tanto a sujetos inmuno-competentes como a inmuno-comprometidos. Los pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) son especialmente vulnerables (8).

Las infecciones por MNTb muestran cambios crecientes por revisiones de su importancia médica como en el diagnóstico y tratamiento. En un estudio de 1948 cultivos obtenidos de muestras clínicas a nivel nacional con diagnóstico de tuberculosis, 12.8% correspondió a micobacterias "atípicas" y se encontraron cuatro especies potencialmente patógenas por métodos de biología molecular, con una mayor frecuencia en especímenes procedentes de zonas tropicales. Mapa 1;(4).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones causadas por micobacterias han tomado gran importancia en la actualidad, debido al número de casos nuevos, recaídas y malas respuestas al tratamiento dirigido contra especies principalmente tuberculosas. Se informa en la literatura mundial de la presencia de síndromes clínicos, ocasionados por MNTb, que se han aislado en áreas geográficas de los EUA hasta en 78 % de las micobacterias (8), y que producen cuadros similares a la infección por CMTb; que inclusive existen en co-morbilidad con esta. Esto hace necesaria la realización de pruebas especializadas para diagnóstico, especiación y sensibilidad para las micobacterias con la pregunta: ¿Son realmente los aislamientos reportados como *Mycobacterium sp.* en nuestro medio del complejo tuberculosis o son cepas "atípicas"?

JUSTIFICACION

En estudios previos se ha reportado una frecuencia creciente de drogo-resistencia en el tratamiento para la tuberculosis, así mismo se refieren otras micobacteriosis, como entidades patógenas en el ser humano. En este proyecto se analizó la presencia de otras especies de micobacterias no tuberculosas que pudieran condicionar cuadros "tuberculosis-like" y participar como causa de la resistencia o no respuesta al tratamiento antifímico. La no determinación de especie de manera rutinaria en los hospitales condiciona el inicio del tratamiento poco específico con claras desventajas, si la micobacteria no es del complejo tuberculosis.

La infección pulmonar o extrapulmonar por micobacterias es una causa frecuente de morbi-mortalidad entre los derecho-habientes diagnosticados en el HRG "Ignacio Zaragoza"; el aislamiento de *Mycobacterium sp.* en medio sólido no llega a la identificación de especie y representa la posibilidad de MNTb, sobretodo en pacientes con inmunocompromiso. Esto es un riesgo de fracaso para el tratamiento del paciente.

En el hospital no se cuenta con campana de flujo laminar ni reactivos para pruebas bioquímicas específicas en la identificación de especies; la información es deficiente para adecuar la terapia en los casos que no responden adecuadamente al tratamiento convencional contra complejo tuberculosis. Esto hizo necesario recurrir a la utilización de la biología molecular cuyo uso es cada vez más necesario.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la especie de las micobacterias obtenidas de cultivos de muestras clínicas y determinar la presencia de micobacterias atípicas mediante estudios de biología molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer la técnica de reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para identificar micobacterias a nivel de especie.
2. Identificar qué otras micobacterias pueden condicionar un cuadro de tuberculosis-like en la población derechohabiente del ISSSTE, en la zona oriente del área metropolitana.

HIPÓTESIS

Como se trata de una serie de casos no requiere hipótesis.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Serie de casos, descriptiva, observacional, ambispectiva: revisión retrospectiva de expedientes e identificación secuencial prospectiva de especies de micobacterias; Ambilectivo.

CRITERIOS DE INCLUSION:

Especímenes con aislamiento de *Mycobacterium sp* por cultivo en medio sólido procedentes de pacientes derecho-habientes del ISSSTE de cualquier edad y sexo.

VARIABLES

En la correlación de la identificación de las micobacterias aisladas con los casos clínicos de los que procedieron se estudiaron las siguientes variables:

Edad como variable ordinal con los siguientes rangos: 16-26; 27-36; 37-46; 47-56; 57-66; 67-76 en años cumplidos.

Sexo como variable cualitativa nominal: masculino y femenino.

Comorbilidad como variable cualitativa nominal con tres categorías: Diabetes, VIH y Otras (Actividad con estrés, desnutrición, etc.).

Especimen como variable nominal con las siguientes categorías: expectoración, líquido cefalo-raquídeo, líquido pleural, aspirado de médula ósea, biopsia de ganglio linfático y biopsia hepática.

Tipo de tratamiento como variable nominal que incluyó terapias combinadas iniciales o re-tratamientos en categorías designadas por el nombre de fármacos en las combinaciones utilizadas:

HAIN, Rifampicina, Pirazinamida (Rifater) más Etambutol, o: RIP+E;

Rifater + Etambutol + Estreptomina, o: RIP+E+S;

Rifater + Etambutol + Claritromicina, o: RIP+E+Cl;

Rifater + Etambutol + Ciprofloxacina, o: RIP+E+Cip ;

Rifater + Etambutol + Ofloxacina, o: RIP+E+O; y

Rifater + Etambutol + Amikacina, o: RIP+E+A;

Respuesta al tratamiento como variable nominal: curación o falla-deceso.

Micobacterias como variable nominal según las especies identificadas: Tuberculosas y No tuberculosas :kansasii, intracellulare y avium.

METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Lugar y duración.

El estudio descrito tuvo un periodo de realización de dos años a partir de muestras de cultivos puros en medios específicos para micobacterias obtenidos de muestras clínicas de esputo, líquido pleural, biopsia ganglionar, LCR y aspirado de médula ósea, de pacientes atendidos por el servicio de infectología del Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza del ISSSTE" y procesados en el laboratorio de microbiología del mismo nosocomio. Estas muestras se sometieron a estudios de Biología Molecular (PCR-RFLP) en el Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

Universo, Unidades de Observación, Métodos de Muestreo y Tamaño de la Muestra.

El universo del estudio comprende todas las muestras con aislamiento de *Mycobacterium sp.* procedentes de especímenes clínicos de pacientes derechohabientes del ISSSTE - H. Zaragoza.

Muestra: Los casos (especímenes) que se incluyeron en el estudio fueron los que permitieron aislamiento de especies de micobacterias sp en los 3 últimos años que fueron las únicas viables para la extracción de DNA debido a la conservación del medio. El cálculo de tamaño de muestra no procede por ser una serie de casos consecutivos abierta a la incorporación de más casos.

Descripción del Estudio

Material y Métodos.

Se incluyeron de forma consecutiva todas las muestras de expectoración, líquido pleural, AMO, biopsia ganglionar, biopsia hepática que se recibieron en el laboratorio central del HRG Ignacio Zaragoza desde agosto de 1999 a agosto del 2002 y permitieron aislamiento de *Mycobacterium sp.* en medio de Lowenstein - Jensen de las cuales no se pudo hacer en su momento la determinación de especie debido a la falta de recursos dentro de la Institución.

En todos los casos además de los resultados de microbiología se obtuvo información epidemiológica y clínica (edad, sexo, comorbilidad, diagnósticos clínicos, evolución, tipo de tratamiento y respuesta al mismo).

Procesamiento de los especímenes clínicos:

Los especímenes de pacientes con sospecha de infección tuberculosa, con cultivo positivo en medio de Lowenstein-Jensen, examinados microscópicamente con tinción de Ziehl-Nielsen y guardados en el laboratorio Central del Hospital Regional Gral. Ignacio Zaragoza fueron posteriormente llevados al INDRE para identificación de especie mediante los procedimientos siguientes:

Aislamiento de ácidos nucleicos.

Se colocó una asada de la cepa problema en 500 μ l de fenol saturado a pH de 8.0, bajo una campana de flujo laminar vertical para evitar contaminación; se centrifugó por 10 seg. y se agregaron 600 μ l de amortiguador TE (Tris EDTA) 1X; se agitó por vortex durante 20" y después se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Sin romper la interfase, la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 ml con 500 μ l de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamilico (24:1), seguido de vortex por 10 seg. y centrifugación a 10,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se agregó a un tubo con 65 μ l de NaCl 5M y 450 μ l de isopropanol, se precipitó por 20 min. a -20°C y después se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min. a 4°C y se decantó; se agregaron 600 μ l de alcohol etílico al 70% y se sometió nuevamente a vortex; se agregaron 600 μ l de alcohol etílico absoluto y posteriormente se colocaron los tubos con la tapa abierta, en un bloque de calentamiento a 60°C hasta que el etanol se evaporó completamente. Se disolvió el precipitado en 25 μ l de agua inyectable y se cargaron 2 μ l de cada muestra en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para la visualización de los ácidos nucleicos.

Se incluyeron un total de 101 muestras, de las cuales 78 fueron excluidas debido a la no obtención de ácidos nucleicos por las malas condiciones en que se encontraba el medio de cultivo.

Reacción en cadena de la polimerasa.

El ADN previamente purificado se resuspendió en 50 μ l de agua inyectable (libre de DNAsas); se tomaron 3 μ l y se le agregaron 47 μ l de una mezcla de reacción que contenía: 5 μ l de Buffer de PCR 10x, 3 μ l de

dimetilsulfóxido (DMSO), 1 μ l de iniciador tb 11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCAT-3'), 1 μ l de iniciador tb 12 (5'-CTTGTCGAACCGACTACCCT-3'), 10 μ l de dNTP's, (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 30 μ l de agua destilada y 0.3 μ l de Taq DNA polimerasa, llevándose a un volumen final de 50 μ l en cada reacción. El contenido de cada tubo se mezcló por Vortex y se sometió a una temperatura de 94°C por 1 minuto y 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineamiento de los iniciadores a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Después del ciclo final, la reacción fue terminada manteniendo una temperatura de 72°C por 7 minutos. Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 2% durante 30 minutos y 120 volts. El gel se tiñó con Bromuro de Etidio y se analizó con luz UV en un transiluminador. Se corrieron controles positivos y negativos junto con las muestras.

Digestión de los productos de PCR con endonucleasas de restricción.

Los productos de PCR utilizando los oligonucleótidos Tb 11 y Tb 12 se sometieron a reacciones de digestión con las enzimas Bst E II y Hae III haciendo una mezcla en cada tubo con 12 μ l de agua, 1 μ l de enzima, 2 μ l de Buffer y 5 μ l del DNA problema haciendo una alícuota total para cada tubo de 15 μ l posteriormente se hizo el corrido electroforético empleando un gel de poliacrilamida al 1% en un tiempo aproximado de 45 minutos y 120 volts. Posteriormente se extrajo el gel para ser teñido con Bromuro de etidio y analizado con luz UV y mediante un sistema computarizado impreso en papel fotográfico. El resultado fue comparado con estándares de peso molecular ya establecidos para identificación de las especies. Las bandas no se observan idénticas a los estándares debido a que el gel empleado fue de poliacrilamida pero expresan el patrón requerido para la identificación. (Fig. 9)

Análisis estadístico

La estadística fue descriptiva para cálculo de proporciones y porcentajes. Se utilizó el sistema estadístico computarizado de SPSS 11. También se utilizó métodos computarizados para la tabulación y graficación de los datos.

RESULTADOS.

De 101 especímenes en los que hubo aislamiento de *Mycobacterium sp.* en medio específico se excluyeron 78 debido a las condiciones subóptimas del cultivo que no permitieron extraer DNA: quedaron 23 muestras útiles.

En la correlación de especies bacterianas con datos del expediente clínico: 21 muestras pertenecían a pacientes del sexo masculino (91.3%) y 2 a pacientes del sexo femenino (8.69%) [Fig. 1]. Las edades de los casos por los rangos establecidos se distribuyeron de la siguiente manera: 2 pacientes de 16 a 26 años; 5 de 27 a 36 años; 7 de 37 a 46 años; 4 de 47 a 56; 2 de 57 a 66 y 3 de 67 a 76 años [Fig. 3].

De los 23 especímenes en los que fue posible extraer DNA: 7 se obtuvieron de mielocultivos (30.4%), 6 de ganglio linfático (26.08%), 4 de expectoración (17.39%), 3 de líquido pleural (13.04%), 2 de biopsia de hígado (8.69%) y uno de LCR (4.34%) [Fig. 4 y 5].

De los 23 casos 17 correspondieron a pacientes que respondieron a tratamiento (73.9%) y 6 (26.08%) correspondieron a pacientes que fallecieron tomándose este parámetro como falla terapéutica. [Fig. 8].

De los 17 casos con éxito terapéutico 14 (82.35%) correspondieron a especies del complejo tuberculosis, 1 (5.8%) a *M. intracellulare* y 2 (11.76%) a *M. avium*: estos 2 últimos con terapia apropiada elegida sobre bases clínicas. De 6 decesos tomados como falla terapéutica uno se debió a *M. tuberculosis*, otro a *M. kansasii* y 4 a *M. avium* -pese al manejo electivo en un caso-. En total fueron 15 aislamientos identificados como *M. tuberculosis*, 6 *M. avium*, un *M. intracellulare* y otro *M. kansasii*. [Fig. 9].

Del total de casos de MTb 14 (93.3%) respondieron al tratamiento y 1 deceso (6.66%) se atribuyó a falla terapéutica. Del total de MNTb 3 casos (37.5%) respondieron al manejo y 5 decesos (62.5%) representaron su falla.

Trece casos (56.52%): 11 por MTb y dos por MNTb -*M. kansasii* e *intracellulare*- recibieron la combinación antifimica RIP+E con un deceso por MTb y otro por *M. kansasii*. Un paciente con MTb y otro con MNTb -*M.*

avium- recibieron RIP+E+Cip (8.69%): el paciente con *M. avium* falleció. Un caso (4.34%) con *M. avium* recibió RIP+E+O pero falleció. Tres pacientes con MTb (13.04%) recibieron RIP+E+S con buena evolución. Uno con *M. avium* (4.34%) recibió RIP+E+A sin éxito (falleció). Tres sujetos (13.04%) con *M. avium* fueron tratados con RIP+E+Cl y se registró un deceso. [Fig 10 y 11].

De los 23 especímenes, 17 (73.91%) correspondieron a pacientes con infección por VIH de los cuales doce (52 %) tenían cifras menores de 200 linfocitos T CD4+/mm³; tres especímenes (13.04%) fueron de pacientes con diabetes mellitus y otros 3 (13.04%) de casos con otras comorbilidades (actividad con estrés, desnutrición, etc.). [Fig 12].

Por especie: en 10 especímenes (58.82%) de los 17 pacientes con VIH se identificó complejo tuberculosis; en 6 especímenes (35.29%) *M. avium* y en uno (5.88%) *M. intracellulare* [Fig. 8]. En tanto que en los pacientes con diabetes mellitus 2 casos fueron del CMTb (66.67%) y uno (33.33%) se debió a *M. kansasii* [Fig. 9]. De los especímenes de sujetos con otras comorbilidades fue el estrés el factor condicionante de inmunocompromiso más relevante (13.04 %) y la especie aislada fue *M. tuberculosis* en los 3 casos [Fig. 13].

DISCUSIÓN.

Nuestros resultados mostraron que la identificación de la especie de las micobacterias por métodos de biología molecular, aplicados en especímenes clínicos, nos permitieron demostrar una alta proporción de micobacterias no tuberculosas; a pesar de que la muestra no fue representativa para inferir la prevalencia de estas micobacterias es ilustrativa de de su frecuencia, aunque será necesario incrementar el número de casos para tener un mejor panorama epidemiológico.

La mayoría de los casos de nuestro estudio fueron de sexo masculino y estaban en los rangos de edad más productivos (27-56 años), o en las etapas reproductivas de su vida; esto refleja la importancia de estas micobacteriosis cuyo incremento de incidencia y/o prevalencia está correlacionado con la epidemiología de la infección por VIH/SIDA, entre otras comorbilidades que afectan otros rangos de edad.

Atenidos a reportes y diversas comunicaciones verbales, todos los casos se manejaron con tratamiento antifímico por sus manifestaciones clínicas o al

momento de la identificación del género. Los ajustes o cambios de manejo se basaron en criterios paraclínicos y en la magnitud del inmunocompromiso específico (linfocitos totales y/o T-CD4 + en la infección por VIH) en sujetos en que no se observó respuesta a tratamiento ante planteamiento de resistencia tuberculosa y después sospecha de micobacteriosis "atípicas". Una vez hecha la determinación de especie se confirmó el diagnóstico de *M. avium* en 3 enfermos con SIDA avanzado. La respuesta a tratamiento antifímico reforzado en pacientes con infección demostrada por Mtb alcanzó óptimos porcentajes de curación, dato que no difiere de lo esperado en esta entidad y lo cual aunque es muy ilustrativo carece de representatividad para avalar o cuestionar las pautas de este tratamiento.

Los dos sobrevivientes a infecciones por *M. avium* respondieron al ajuste de su tratamiento mediante la indicación de Claritromicina, ante la falla común a estas micobacterias sometidas a la terapia antifímica.

CONCLUSIONES

Las micobacterias no tuberculosas conforman proporciones importantes de frecuencia entre pacientes con inmunocompromiso, sobretodo relacionado a etapas avanzadas de SIDA. Nuestro estudio mostró un número considerable de "micobacteriosis atípicas"; no obstante los porcentajes encontrados no pueden ser extrapolados a nuestra realidad hospitalaria y menos a otros contextos nacionales, pero constituyen una pauta que debe tenerse en cuenta al plantear diagnósticos y proponer tratamientos en circunstancias similares. El estudio nos hace reflexionar sobre la necesidad de ajustar oportunamente un tratamiento contra micobacterias, especialmente entre los pacientes con infección por VIH en estadios avanzados que no responden a la terapia antifímica en cuyo caso habrá que pensar en micobacteriosis "atípica" tanto como en drogo-resistencia. El estudio tiene un alto valor ético al proponer modalidades para el mejor abordaje y atención de los derechohabientes.

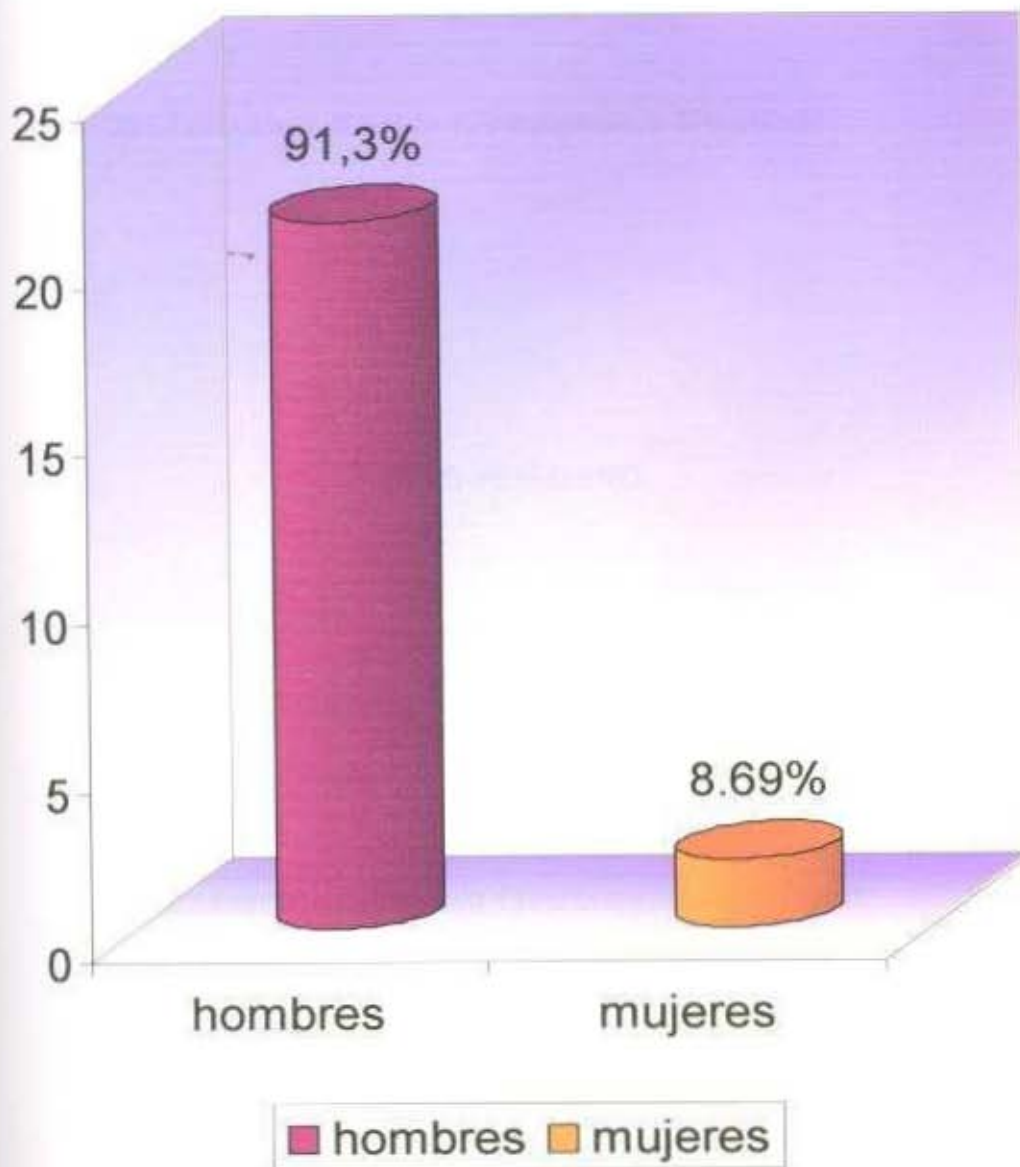
Micobacterias atípicas en la República Mexicana
 Distribución de especies
 1986



MAPA 1

Luz Beteta Francisco	IZ4	33 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	Mielocultivo	Defunción	Rif+Eta+Amika	M. avium
González Yáñez Martín	IZ14	49 Masculino	Tb Pulmonar	VIH	1vez	Expectoracion	Curación	Rif+Eta	M. Tuberculosis
Arevalo Juárez Miguel	IZ18	38 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	LCR	Curación	Rif+Eta+Ofloxa	M. Avium
Hernández Oviedo Juana	IZ45	58 Femenino	Tb Pulmonar	D.M.	1vez	Expectoración	Curación	Rif+Eta	M. Tuberculosis
Nabté Padernilla José	IZ29	49 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1 vez	Mielocultivo	Defunción	Rif+Eta	M. Tuberculosis
Martínez Ríos José Luis	IZ35	32 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	Mielocultivo	Curación	Rif+Eta+Claritro	M. avium
Osorno Medina Juan Carlos	IZ88	37 Masculino	Tb Ganglionar	VIH	1vez	Ganglio L.	Curación	Rif+Eta	M Tuberculosis
García Feliciano David	IZ89	25 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	B.hepática	Defunción	Rif+Eta+Claritro	M. Avium
Pérez Pérez Moisés	IZ91	64 Masculino	Tb Ganglionar	VIH	1vez	Ganglio L.	Curación	Rif+Eta	M.Tuberculosis
Martínez Maldonado Angel	IZ94	52 Masculino	Tb Pulmonar	VIH	1vez	Expectoración	Curación	Rif +Eta	M.Tuberculosis
Betancourt Escalante Erwing	IZ96	30 Masculino	Tb Ganglionar	VIH	1vez	Ganglio L.	Curación	Rif+Eta+Cipro	M.Tuberculosis
Luna Reyes Guadalupe	IZ57	75 femenino	Tb Pulmonar	D.M.	1vez	Expectoración	Defunción	Rif+Eta	M.Kansasi
Vega Duarte Pedro	IZ97	72 Masculino	Tb Pleural	D.M.	1vez	L.derrame p.	Curación	Rif+Eta	M.Tuberculosis
Olvera Reyes Manuel	IZ13	49 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	Mielocultivo	Curación	Rif+Eta	M.Tuberculosis
González Romero Daniel	IZ95	40 Masculino	Tb Ganglionar	VIH	1 vez	Ganglio L.	Curación	Rif+Eta	M.Tuberculosis
Benítez Martínez Jorge	IZ16	33 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1 vez	Mielocultivo	Defunción	Rif+Eta+Claritro	M.avium
Juárez Espinoza Salvador	IZ19	39 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	Mielocultivo	Curación	Rif+Eta+estrepto	M.Tuberculosis
Juárez Miramontes Carlos	IZ24	39 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	B.hepática	Curación	Rif+Eta	M.Tuberculosis
Ruiz Cambrón Ismael Guillermo	IZ52	41 Masculino	Tb Diseminada	VIH	1vez	Mielocultivo	Defunción	Rif+Eta+Claritro	M.avium
Rodríguez Chavira Ricardo	IZ15	36 Masculino	Tb Ganglionar	VIH	1vez	Gánglio L.	Curación	Rif+Eta+Cipro	M.Intracellulare
De la cruz Moreno Ricardo	101	16 Masculino	Tb Pleural		1vez	L.derrame p.	curación	Rif+Eta+Estreptc	M.Tuberculosis
Fernández Torres Abraham	100	52 Masculino	Tb Ganglionar		1 vez	Gánglio L.	Curación	Rif+Eta	M.Tuberculosis
Venegas Durán Juan	IZ12	67 Masculino	Tb Pleural		1 vez	L.derrame p.	Curación	Rif+Eta+Estreptc	M.Tuberculosis

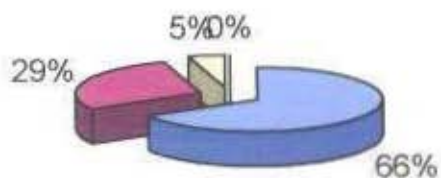
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES POR SEXO



Fuente: cédula de base de datos.

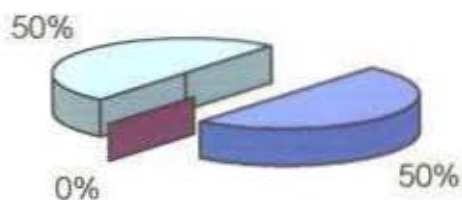
FIG. 1

DISTRIBUCIÓN DE MICOBACTERIAS POR SEXO SEXO MASCULINO.



■ tuberculosis ■ avium □ intracellulare □ kansasii

SEXO FEMENINO



■ tuberculosis ■ avium □ intracellulare □ kansasii

Fuente: cédula de base de datos.

FIG. 2

Distribución de Micobacteriosis por Edad

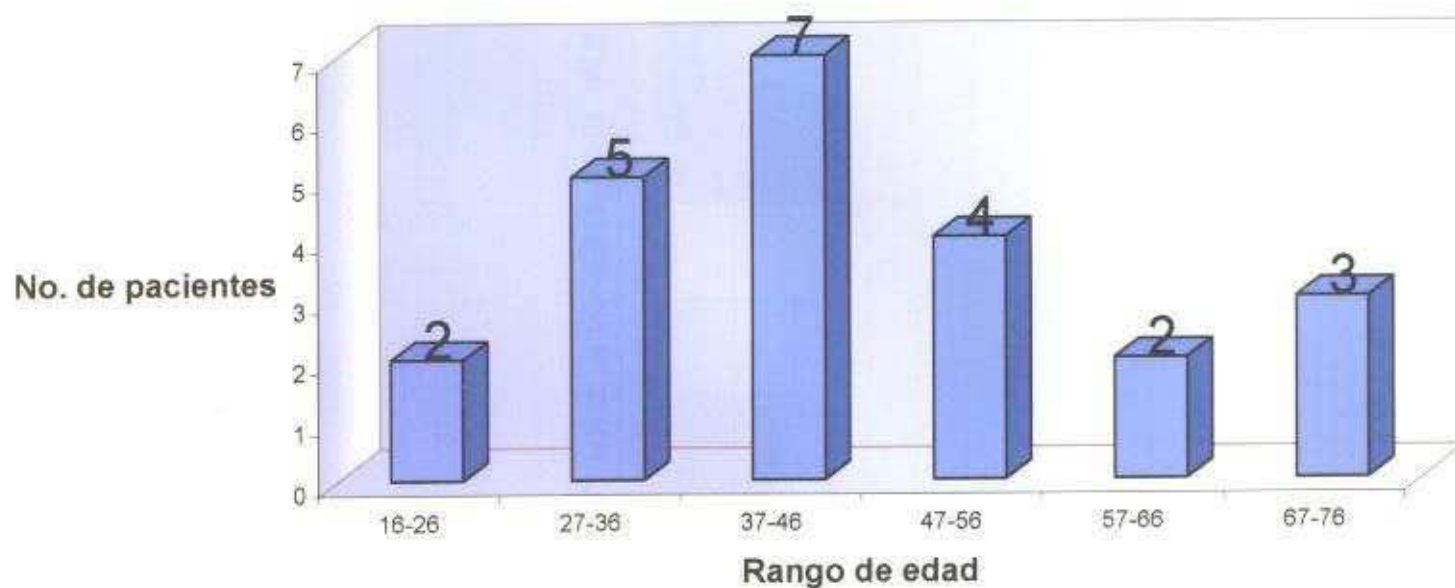


FIG. 3

DISTRIBUCIÒN POR ESPECIMEN

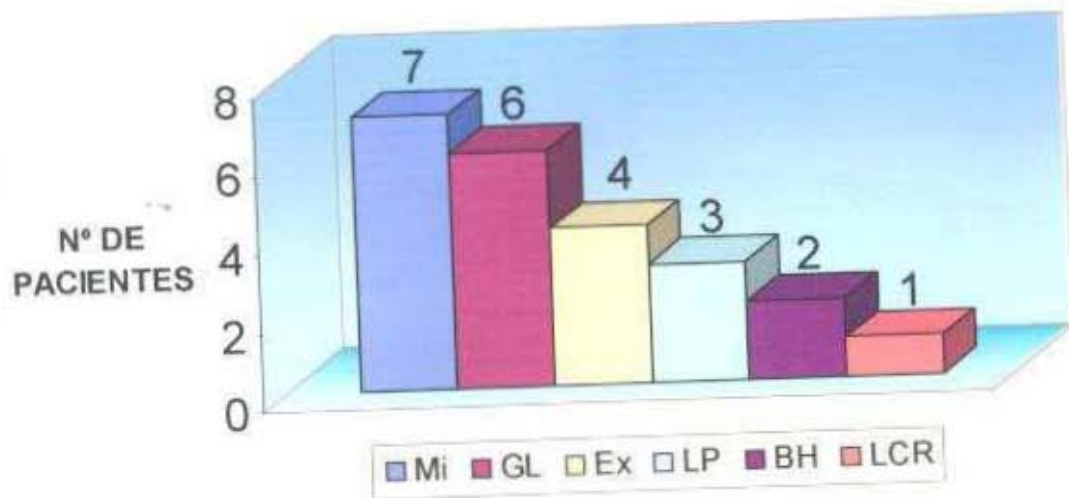
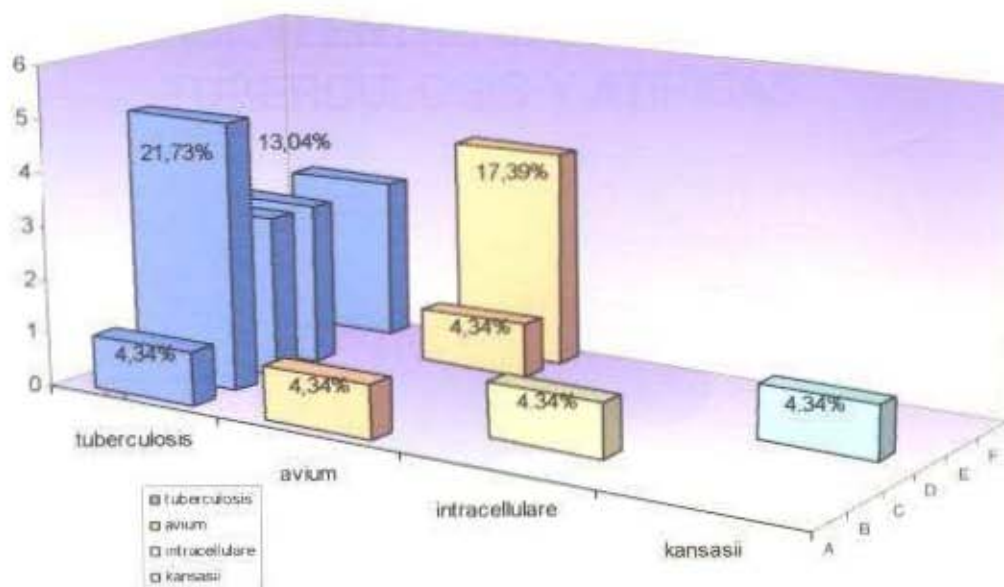


FIG. 4

RELACIÓN DE ESPECIMEN Y TIPO DE MICOBACTERIA

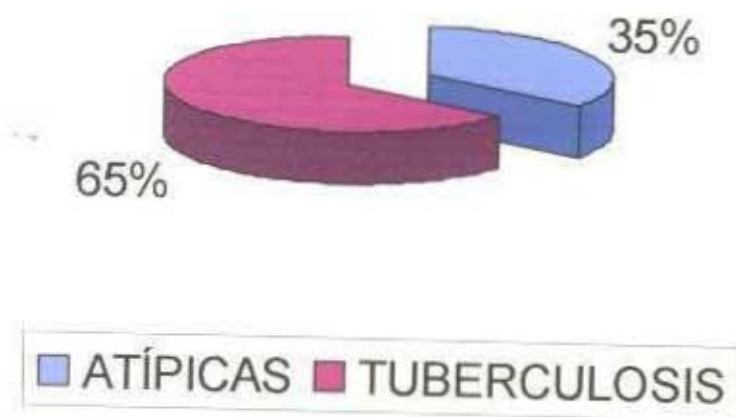


- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> A) Biopsia hepática B) Ganglio linfático C) Líquido pleural D) Expectoración E) Líquido cefalorraquídeo F) Aspirado de médula ósea |
|---|

Fuente: cédula de base de datos.

FIG. 5

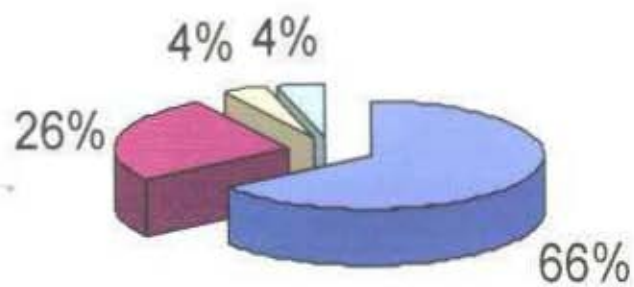
RELACIÓN ENTRE MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y ATÍPICAS



Fuente: cédula de base de datos.

FIG. 6

DISTRIBUCIÓN DE MICOBACTERIAS

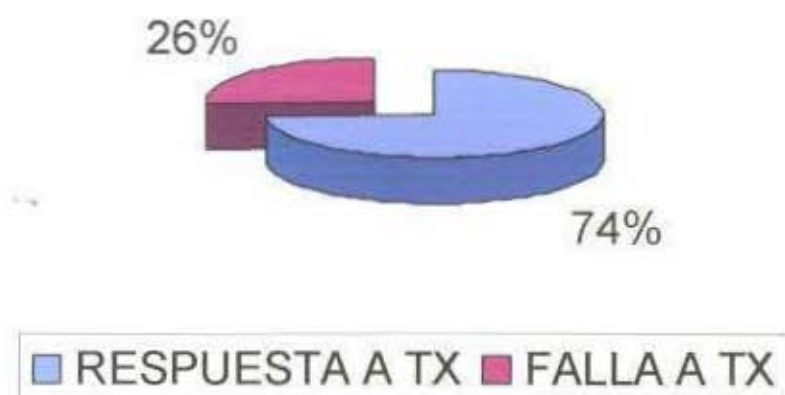


■ tuberculosis ■ avium ■ intracellulare ■ kansasii

Fuente: cédula de base de datos.

FIG. 7

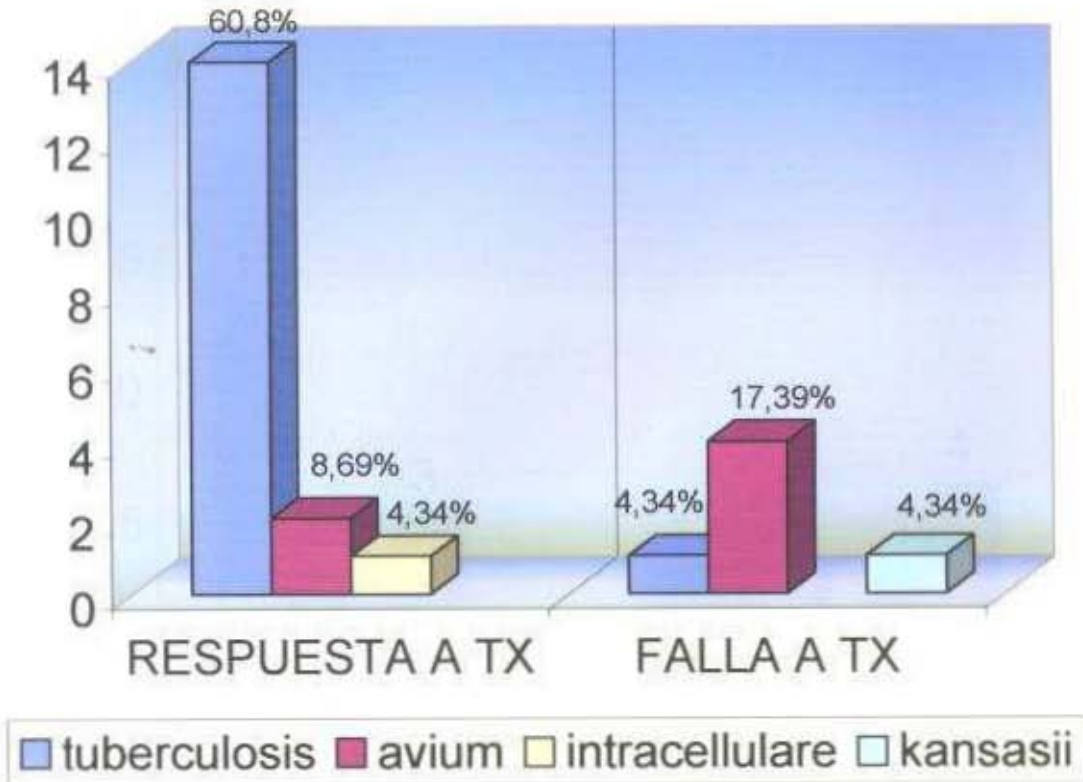
COMPORTAMIENTO CLÍNICO DE ACUERDO A TRATAMIENTO



Fuente: cédula de base de datos.

FIG. 8

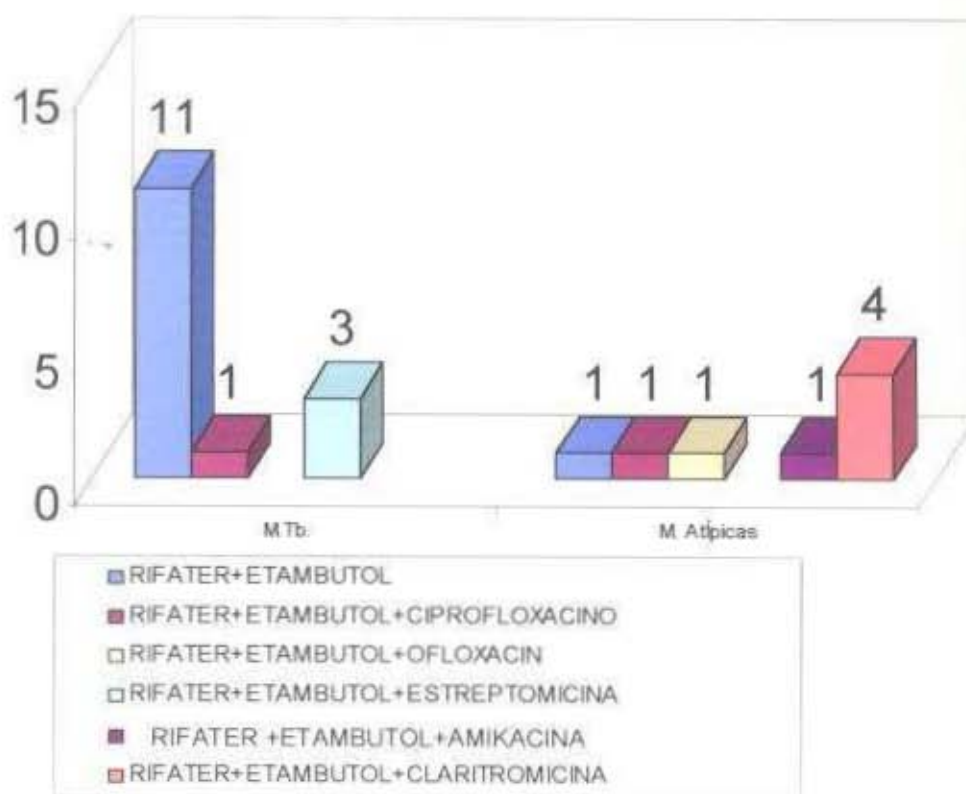
COMPORTAMIENTO CLINICO



Fuente: cédula de base de datos.

FIG. 9

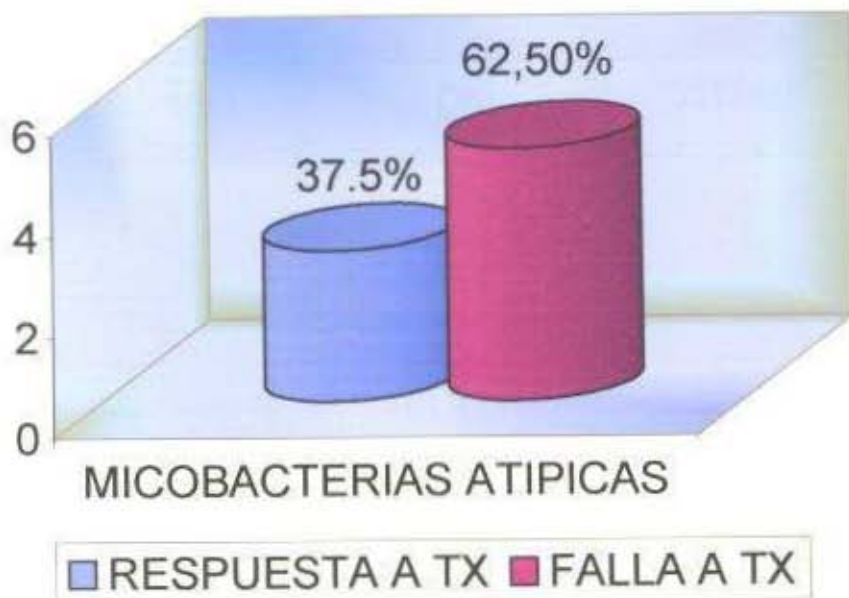
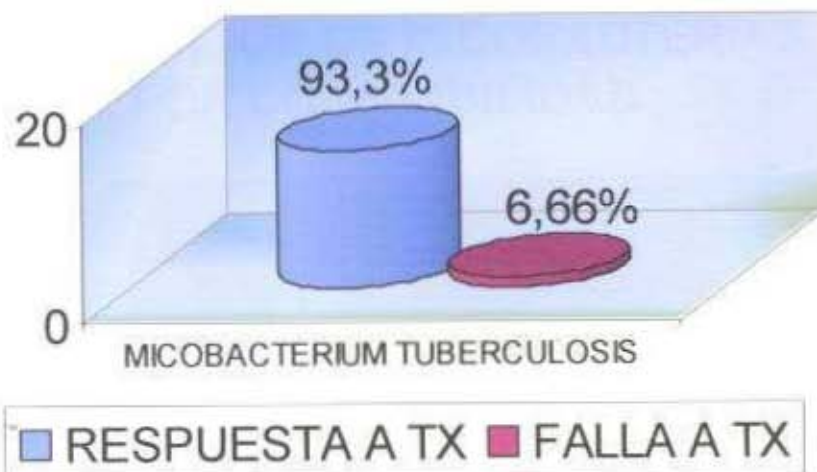
TRATAMIENTO ANTIFIMICO



Fuente: cédula de base de datos.

FIG 10.

EVOLUCIÓN DE ACUERDO AL TRATAMIENTO Y TIPO DE MICOBACTERIA



Fuente: cédula de base de datos.

FIG. 11

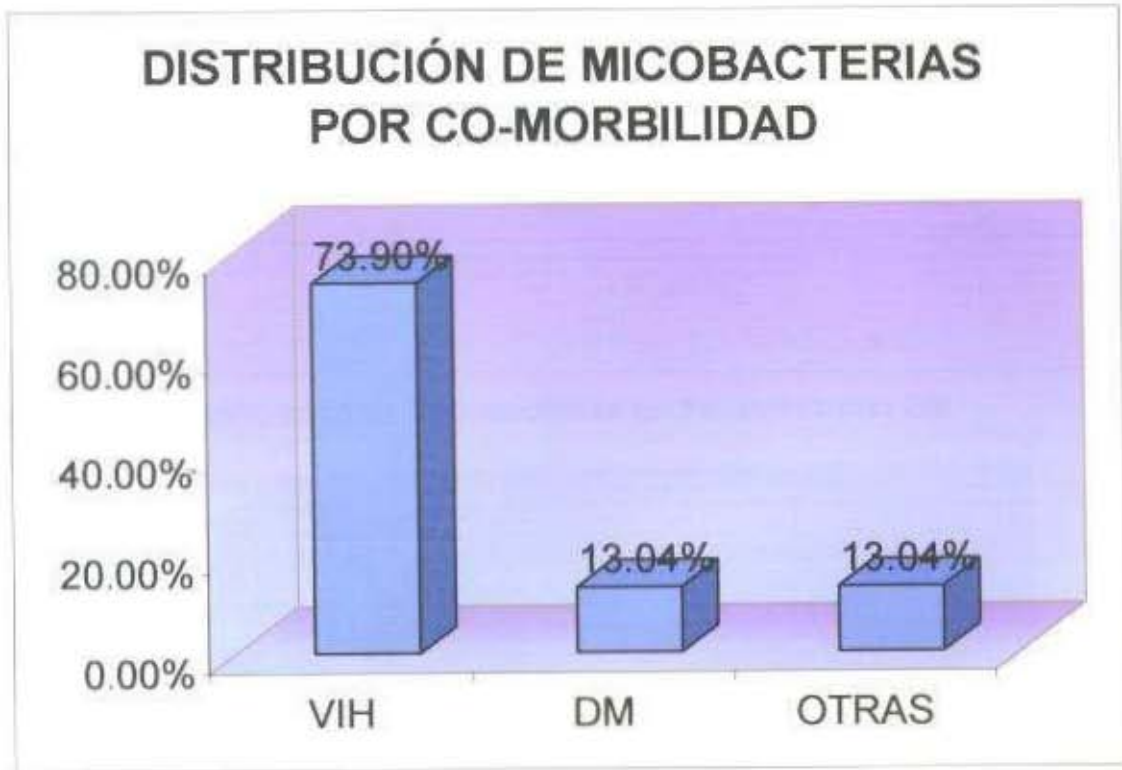


FIG. 12

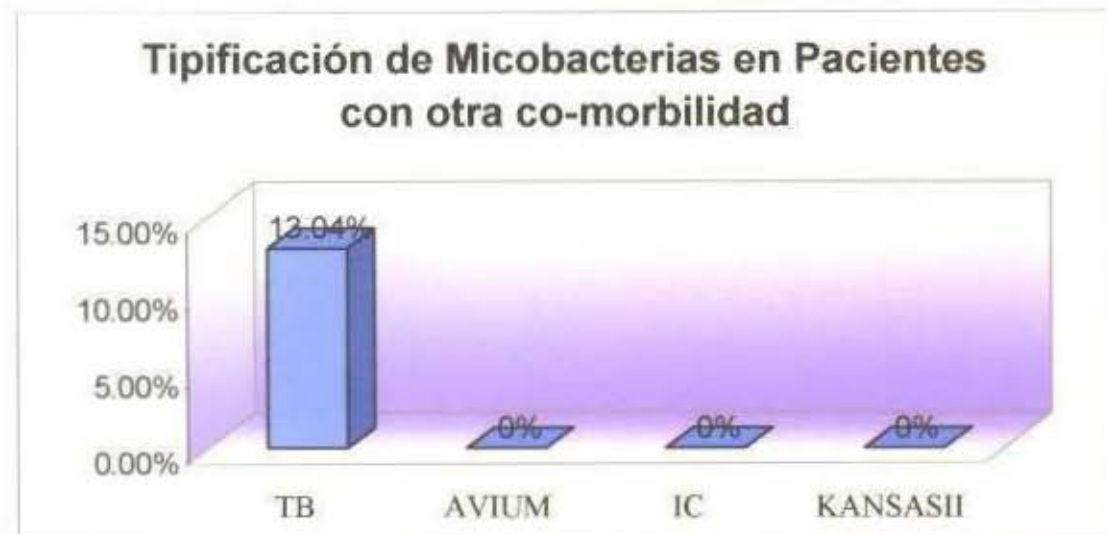
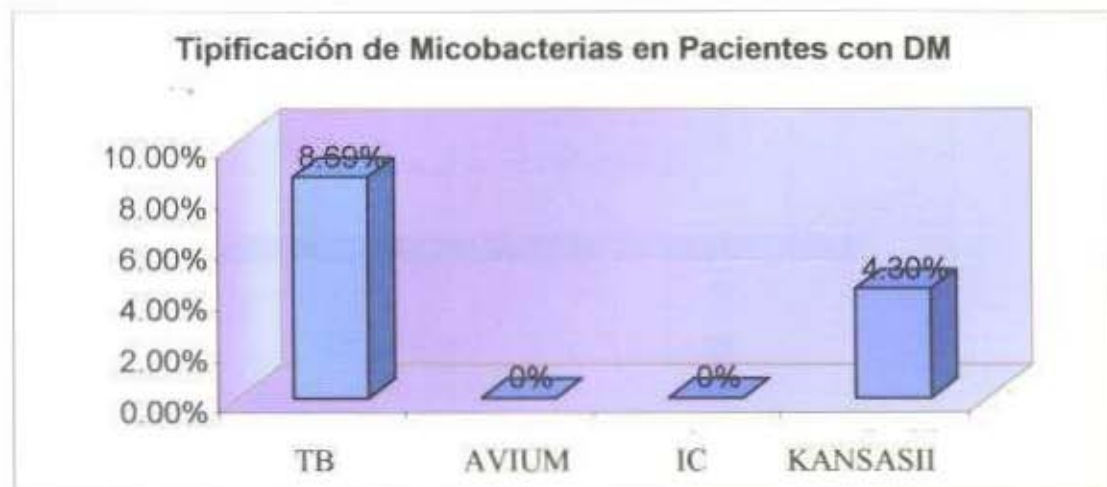
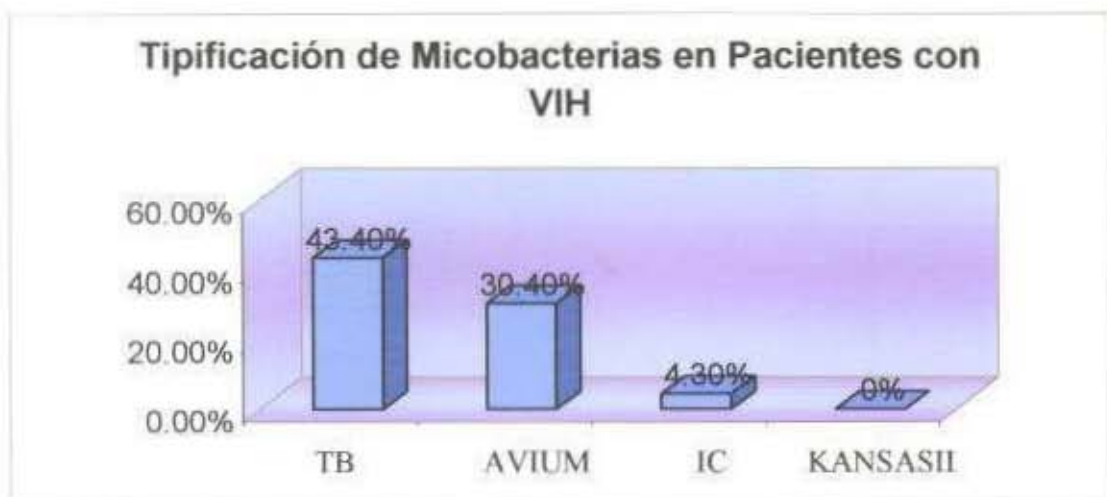


FIG. 13



Fig. A Extracción de DNA de micobacterias con fenol.
Muestras de 3-43

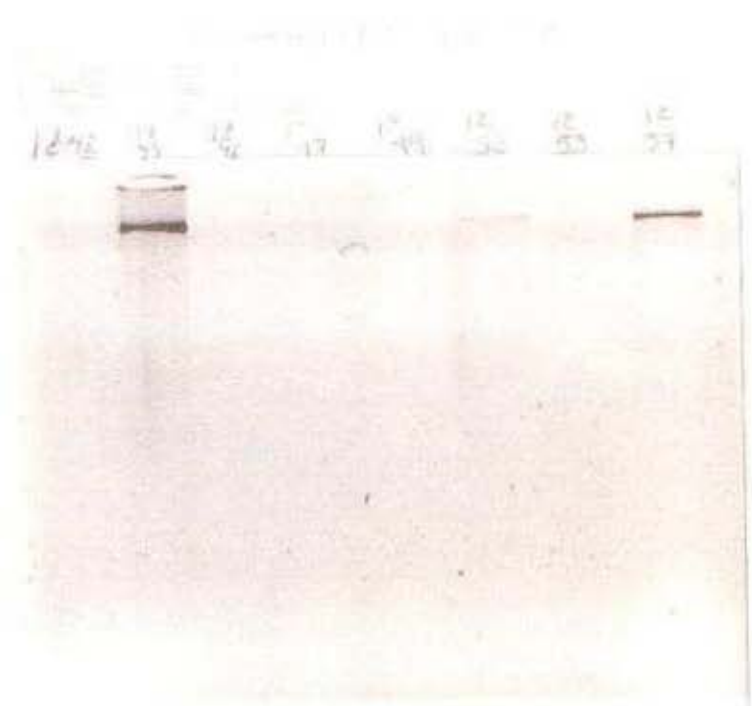
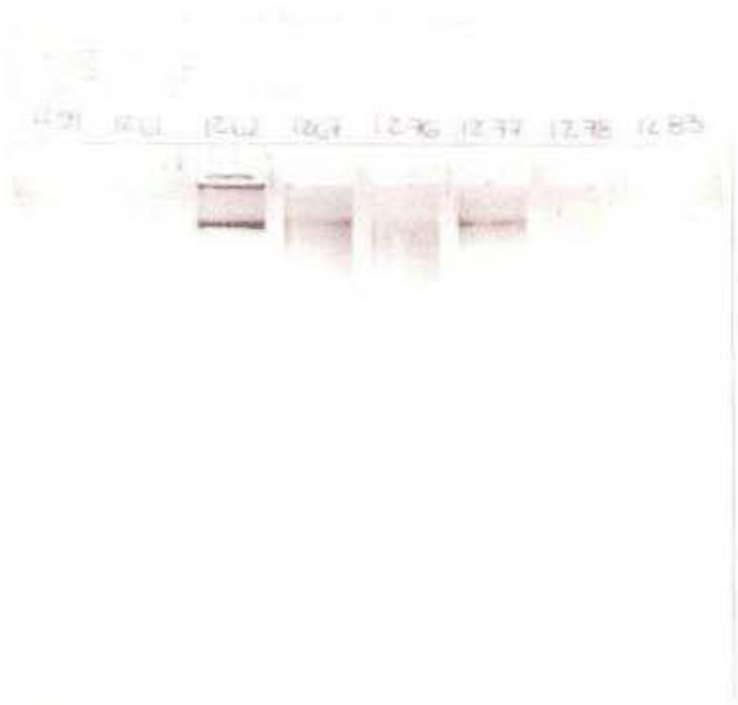


Fig. B Extracción de DNA de micobacterias con fenol.
Muestras 42 - 83

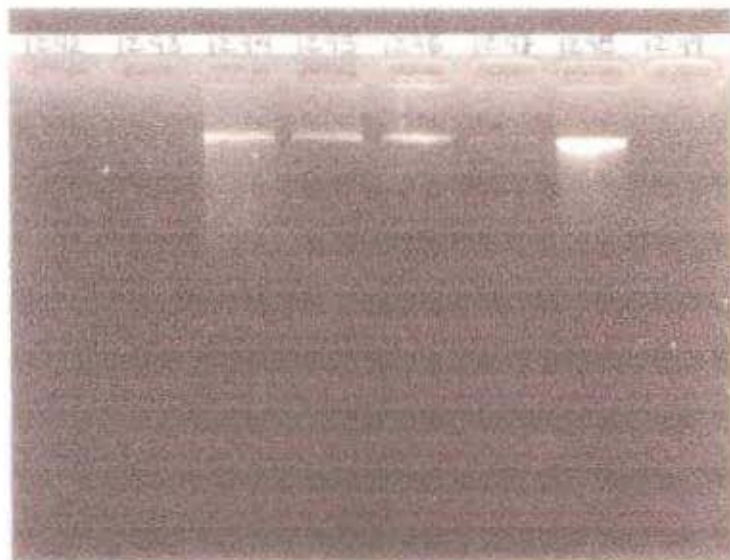
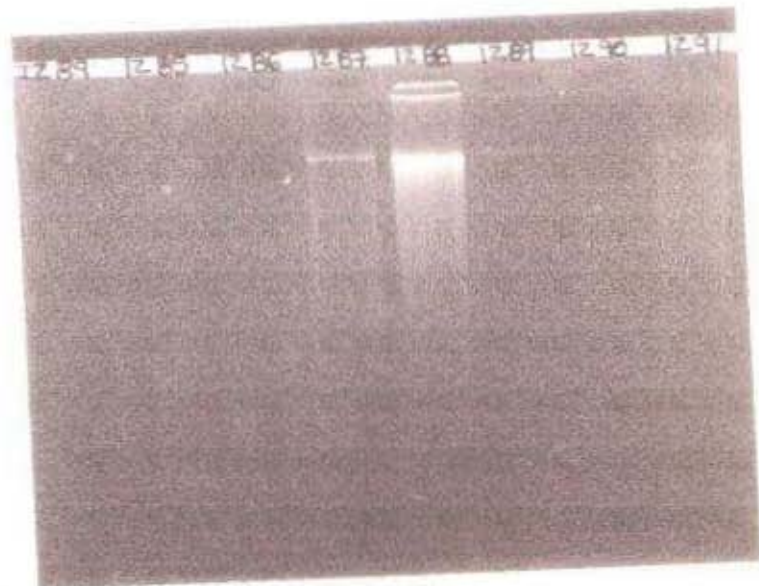


Fig. C Extracción de DNA de Micobacterias con fenol.
Muestras 84 - 99

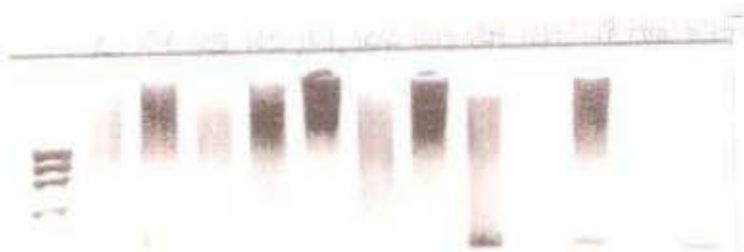


Fig. D Resultado electroforético de PCR.
Muestras 3 - 18



Fig. E Resultado electroforético de PCR. Muestras de 19 - 43

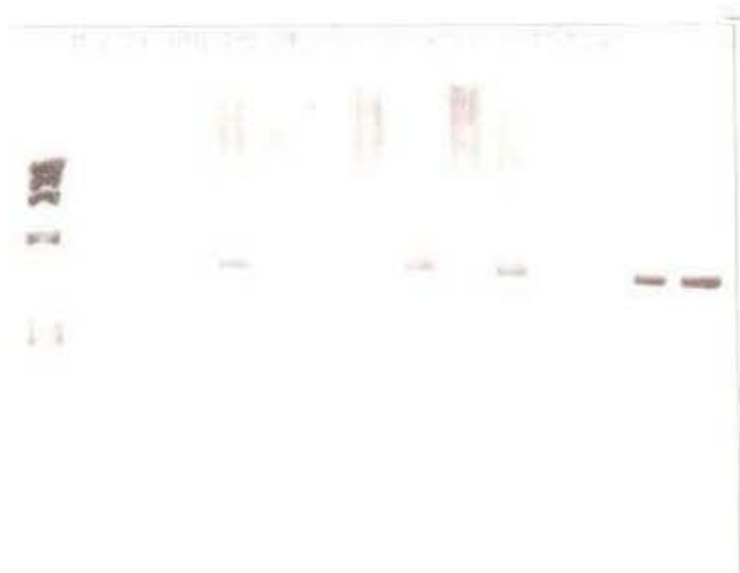


FIG. F Resultado Electroforético de PCR.
Muestras 42 - 61

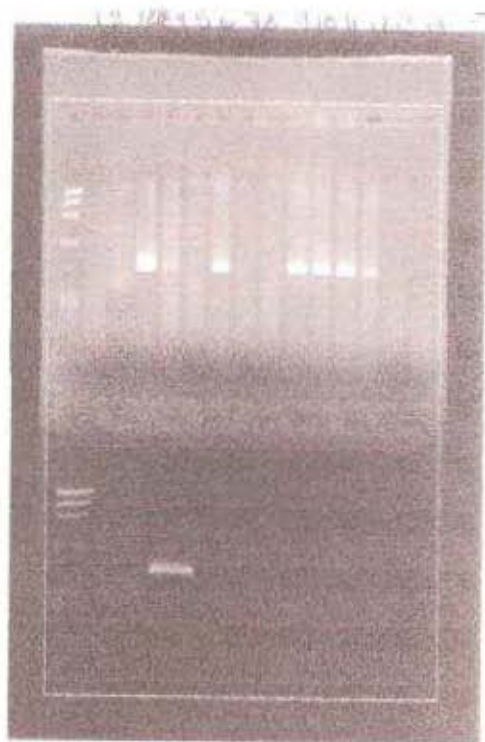
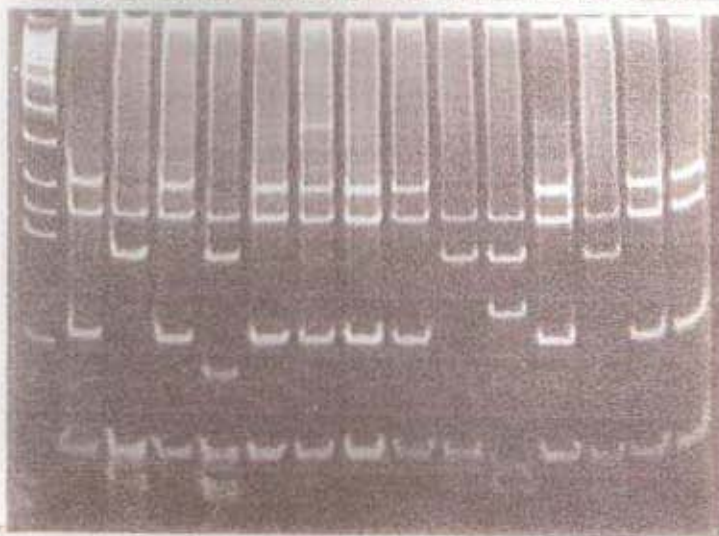


Fig. G Resultado Electroforético de PCR.
Muestras 86 - 99

STRATONER DASH 8 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100



STRATONER DASH 8 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

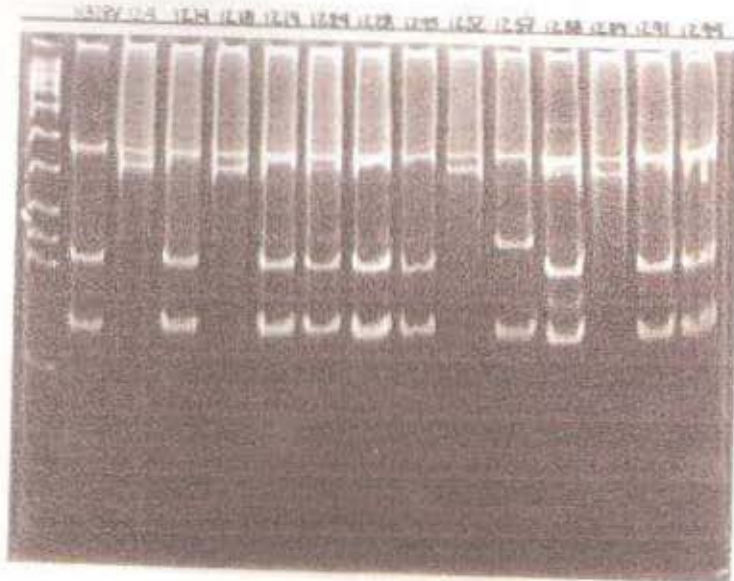


Fig. H Resultado Electroforético de Digestión Enzimática

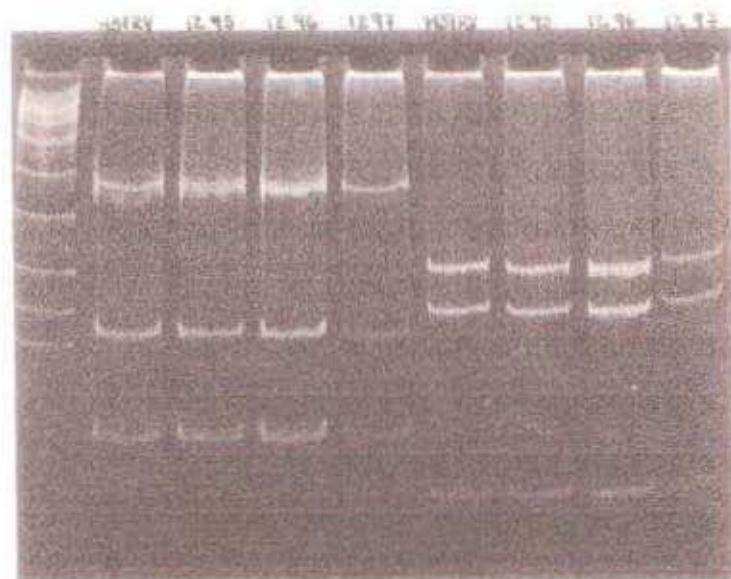


Fig. I Resultado Electroforético de Digestión enzimática



DNA Molecular Weight Markers



Fig. I Patrón electroforético de peso molecular establecido

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Prevenición and treatment of tuberculosis Among Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. Principles of Therapy and Revised recommendations. Continuing Education Activity Esponsored by CDC. MMWR october 30, 1998/ vol 47. No RR20.
- 2.- Anellos Van Ric and Warren R, Classification of drug-resistant tuberculosis in an epidemic area. The Lancet vol 356. July 1,2000 pp22-25.
- 3.-Sommers,H.M. Ther identification of Mycobacterial American Society of Clinical Pathologists. Vol 9 No2, february 1998.
- 4.- Blancarte L y Anzaldo, Micobacterias atípicas en la República Mexicana XLVII . Vol. 4 1988.
- 5.-Mondragón B. and Vázquez Ch. Comparision Among three methods for mycobacteria, identification. Salud Pública de México. 42(6), 2000.
- 6.-Kaye C and Frieden T, Tuberculosis Control Their Relevante of Classics Principles in an era of Acquired inmunodeficiency Síndrome and Multidrogo Resistance. Vol 18, No 1, 1996, pp52-61
- 7.-Mandell Douglas y Bennett. Enfermedades Infecciosas. 5ª edición ,1997, tomo 2. Editorial Médica Panamericana.
- 8.-Tolenti A. and Marchesi F. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Análisis. J.Clinical Mycobiology, feb 1993, vol 31, No2 p 175-178.
- 9.-Sublash HS,Christopher DJ, Roy A Cherian AM;Pulmonary Nocardiosis in Human Immunodeficiency Virus Infection :A tuberculosis Mimic. J.Postgrad Med 2002; 47(1) 30-32.
- 10.-Moellering R Jr. Infectious Disease Clinics of North America.Mycobacterial Infections. Vol 16 (1) March 2002.
- 11.-Laniado R, Livier M y Fedórovich A; Diagnóstico de Tuberculosis mediante detección de Mycobacterium tuberculosis empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. Revista de Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Vol. 4(1) enero-marzo 2001. pp22-26.
- 12 -Villarreal V H y Martínez R.L, El control de la Tuberculosis en la República Mexicana. Neumología y Cirugía de Tórax, Vol. LIV(1), pp. 14-20.