

Mutaciones Asociadas A Resistencia A Rifampicina E Isoniacida En Aislamientos Clínicos Del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* De Pacientes Del Hospital Roosevelt

MR Gordillo¹, HM Ruiz², RL Cortés³ J Samayoa⁴, CR Mejía⁵

¹. Area de Micobacterias, Hongos y Biología Molecular, Sección de Microbiología, Departamento de Laboratorios Clínicos.

² Area de Micobacterias, Hongos y Biología Molecular, Sección de Microbiología

³ Sección de Microbiología, Area de Control de Calidad, Departamento de Laboratorios Clínicos

⁴Departamento de Medicina Interna. Hospital Roosevelt,

⁵Departamento de Medicina, Clínica de Enfermedades Infecciosas, Ciudad de Guatemala, 2014

Introducción:

El aumento de tuberculosis y la multidrogo resistencia de cepas de micobacterias es un problema de los sistemas de salud, en 2009, en el Hospital Roosevelt Gordillo y cols, determinaron la TB-MDR en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente, la tasa de resistencia fue de 4.3%.

Objetivo:

Determinar los patrones de resistencia y perfiles genéticos de cepas con monoresistencia y cepas TB-MDR del Complejo *M. tuberculosis*.

Métodos: Se utilizaron dos métodos para evaluar las cepas de *M. tuberculosis*, un método fenotípico, MGIT, y un método Genotípico, Genotype HAIN LifeScience para determinar el perfil genético de las cepas.

Resultados:

Se evaluaron 846 cepas de micobacterias de los años 2008 al 2013, encontrándose un 2.2% de TB-MDR. Las cepas evaluadas genotípicamente fueron 761, a las cuales se determinó los genes de resistencia, encontrándose monoresistencia a Isoniacida en 58 cepas, 7.6%, monoresistencia a Rifampicina en 18 cepas, 2.4% y 15 cepas MDR, 2.0%. Las mutaciones más frecuentes en monoresistencia fueron *inhA* MUT1 y *katG* MUT1 y la combinación de ambos genes 3.2%, 3.0% y 1.3%, para cepas TB-MDR la combinación *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1. Se encontró que en pacientes con cepas MDR el 3.1% son HIV+ y el 1.5% son HIV-.

Conclusiones:

El porcentaje de cepas TB-MDR fue del 2.3%, siendo los genes más comunes *rpoB* Mutación silenciosa, *inhA* MUT1 y *katG* MUT1. Se encontró mayor porcentaje de monoresistencia a Isoniacida que Rifampicina, siendo la población de pacientes HIV+ la que presenta mayores porcentajes tanto en monoresistencia a RIF e INH como cepas TB-MDR.

Palabras clave: *Tuberculosis, TB-MDR, genes resistencia*

Abstract

Introduction:

The increase of tuberculosis and multidrug resistance in mycobacteria strains is a problem for health systems, in 2009, in Hospital Roosevelt, Gordillo and cols, determined the TB-MDR in patients diagnosed with tuberculosis microbiologically, the resistance rate was 4.3%.

Objective:

To determine the resistance patterns and genetic profiles of monoresistant strains and MDR-TB strains of *M. tuberculosis* complex.

Methods:

Two methods for evaluating *M. tuberculosis* strains were used, a phenotypic method, MGIT, and a genotypic method, Genotype HAIN LifeScience to determine the genetic profile of the strains.

Results:

846 strains of mycobacteria of the years 2008 to 2013 were evaluated, finding 2.2% of MDR-TB. The strains genotypically evaluated were 761, of which, resistance genes were determined, finding isoniazid monoresistance in 58 strains, 7.6%, Rifampicin monoresistance in 18 strains, 2.4% and 15 MDR strains, 2.0%. The most frequent mutations for monoresistant strains were *inhA* MUT1 and *katG* MUT1 and the combination of both genes 3.2%, 3.0% and 1.3%, respectively, and the most frequent mutations for TB-MDR strains was the combination *rpoB* silent mutation + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1. There was found that in patients with MDR strains 3.1% are HIV+ and 1.5% are HIV-.

Conclusions:

The percentage of TB-MDR strains was 2.3%, and the most common genes were *rpoB* silent mutation, *inhA* MUT1 y *katG* MUT1. There was found a higher percentage of monoresistance in isoniazid than rifampicin, being the HIV+ patient population the one that presented higher percentages in both monoresistance to RIF and INH and TB-MDR strains.

Key words: *Tuberculosis, TB-MDR, resistance genes*

Introducción

La detección de las micobacterias MDR es de transcendencia en un país que es considerado como de alta carga de tuberculosis, se hace necesario la implementación de tecnologías y métodos de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad que puedan brindar información relevante en el tratamiento y la evolución de la enfermedad de un paciente, independiente de la sintomatología del mismo y la condición de inmunocompromiso (VIH/SIDA). Las pruebas moleculares de caracterización genética brindan información confiable en menor tiempo que los cultivos de micobacterias, permitiendo obtener resultados precisos sobre los genes causantes de la resistencia y la especie en la cual están presentes. La información de las pruebas realizadas, la historia clínica, los resultados, tratamientos, entre otros debe de estar contendida de manera ordenada y eficaz dentro de una base de datos para que pueda ser consultada en el momento que se requiera y que sea solicitado por el personal de salud a cargo de los pacientes.

En el Hospital Roosevelt Gordillo y cols (2009), investigaron la multidrogo resistencia en las micobacterias, en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente obteniendo una tasa de resistencia de 4.3% para TB-MDR. La resistencia a drogas de primera línea INH, RIF, SM y EMB compromete la curación de los pacientes disminuyendo sus expectativas de vida, representando un mayor gasto económico para la red hospitalaria del país. Por lo anterior es imprescindible disponer de métodos genotípicos específicos los cuales

permiten la detección temprana (horas) de la resistencia lo que favorece el inicio de una terapia efectiva para el paciente, ya que los métodos fenotípicos disponibles actualmente son lentos y pueden enmascarar falsos sensibles lo que repercutirá en fallo terapéutico.

La genotipificación a nivel molecular se realizó utilizando Genotype MTBDR*plus*® para la detección de mutaciones a nivel de los marcadores de resistencia *rpoB*, *inhA* y *katG* para RIF e INH. Las cepas MDR se evaluaron para drogas de segunda línea (fluoroquinolonas, aminoglicósidos y etambutol) utilizando Genotype MTBDR*sl* (genes *gyrA*, *rrs* y *embB*). Esta caracterización molecular se realizó a las especies que conforman el Complejo *M. tuberculosis*, aisladas a partir de muestras pulmonares y extrapulmonares de pacientes VIH+ y VIH-. Esto para conocer e identificar la prevalencia de los genes de resistencia circulantes y establecer los perfiles genéticos.

Materiales y Métodos

Se tomaron todas las cepas aisladas durante el periodo de los años 2008-2013 identificados como *M. Tuberculosis* en el área de Micobacterias del Hospital Roosevelt. Se determinó la susceptibilidad a drogas de primera línea por un método fenotípico, MGIT®, y un método genotípico Genotype **MTBDR*plus***, en las cepas resistentes a drogas de primera línea se realizó una prueba molecular para determinar la resistencia a drogas de segunda línea Genotype **MTBDR*sl***, y se evaluó la subespecie presente con una prueba molecular Genotype **MTBC**.

Se estableció la frecuencia de mutaciones a nivel de los marcadores de resistencia *rpoB*, *inhA* y *katG* para RIF e INH. Y marcadores de resistencia a drogas de segunda línea, genes *gyrA*, *rrs* y *embB* para establecer el porcentaje de cepas TB-MDR.

Resultados

De un total de 1338 cepas se recuperaron 846 cepas de los años 2008-2013, las que fueron evaluadas para resistencia a drogas de primera línea por un método fenotípico y un método genotípico, recopilándose la información demográfica y clínica en una hoja de recolección de datos.

La mayoría de pacientes son adultos, 94%, del género masculino, 66%. Respecto al estatus VIH de los pacientes 45% son VIH+. Mas del 90% en los cuales se aisló *M. tuberculosis* son pacientes nuevos, y solamente un pequeño porcentaje son pacientes que presentaron un fallo o abandono en los tratamientos. Tabla No.1

Tabla No. 1 Resumen de Pacientes evaluados con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente.

	No. Pacientes	Resistencia		
		INH	RIF	MDR
Edad				
≤ 12	80	4	0	1
≥ 13	1258	58	18	18
Genero				
Masculino	887	41	13	13
Femenino	448	21	5	6
VIH status				
Positivo	607	29	12	11
Negativo	584	27	5	8
ND	147	6	1	0
Historia TB				
Nuevo	1330	57	16	18
Abandono/Fallo	1	0	1	0
ND	7	5	1	1
		62	18	19

Se estableció el perfil de resistencia de un total de 846 cepas, 761 por el método Genotype MTBDR_{plus} y el resto por la metodología de MGIT. La resistencia encontrada, independiente del método de evaluación, fue de 11.6% de los años 2008-2013. Se encontró 62 cepas, 7.2%, con monoresistencia a Isoniacida (INH), 18 cepas, 2.2%, con monoresistencia a Rifampicina (RIF) y 19 cepas con resistencia a ambos antifímicos lo que las califica como cepas MDR y corresponde a un porcentaje del 2.3%.

Tabla No. 2 Perfil de resistencia de las cepas MTBC aisladas durante el período 2008 – 2013

	MONORRESISTENCIA		RIF		MDR		TOTAL CEPAS R	CEPAS R %
	R INH	%	R RIF	%	INH+RIF	%		
2008	18	12.0 %	2	1.3 %	9	6.0 %	29	19.3 %
2009	11	8.0 %	4	2.9 %	4	2.9 %	19	13.1 %
2010	4	5.6 %	1	1.4 %	1	1.4 %	6	8.5 %
2011	5	4.2 %	1	0.8 %	0	0.0 %	6	5.0 %
2012	15	8.6 %	9	5.1 %	3	1.7 %	27	15.4 %
2013	9	4.7 %	1	0.5 %	2	1.0 %	12	6.3 %
TOTAL	62	7.2 %	18	2.2 %	19	2.3 %	99	11.6 %

La resistencia más frecuente encontrada es la monoresistencia a INH, siendo los genes más comunes el *inhA* MUT1, 41.4% y el *katG* MUT1, 39.7%. En la monoresistencia a Rifampicina el gen con mayor frecuencia fue el *rpoB* Mutación silenciosa 55.6%, seguido del gen *rpoB* MUT3, 33.3%. Tabla No. 3

Tabla No. 3 Mutaciones en el gen *rpoB* causante de la monoresistencia a Rifampicina y los genes *katG* e *inhA* causantes de la monoresistencia a Isoniacida

MONORRESISTENCIA ISONIACIDA

Gen mutado	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total general	%
<i>inhA</i> MUT1	7	5		2	8	2	24	41.4%
<i>katG</i> MUT1	7	2	3	1	6	4	23	39.7%
<i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	2	4	1				3	17.2%
Mutación silenciosa					1		1	1.7%
	16	11	4	3	15	9	58	100.0%

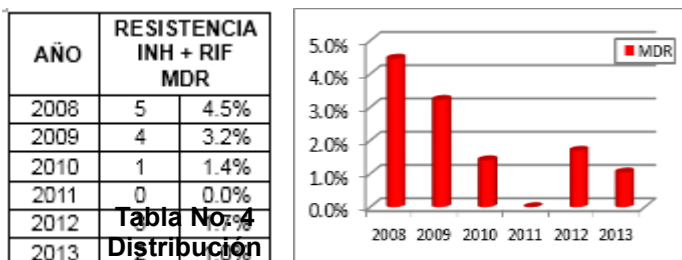
MONORRESISTENCIA RIFAMPICINA

Gen mutado	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total general	%
<i>rpoB</i> mutación silenciosa	2	2	0	1	4	1	10	55.6%
<i>rpoB</i> MUT2A		2					2	11.1%
<i>rpoB</i> MUT3			1		5		6	33.3%
	2	4	1	1	9	1	18	100.0%

Se encontró un total de 15 cepas MDR, 2.0%. El mayor porcentaje se detectó en el año 2008, 5 cepas, 4.5%. En el año 2011 no se detectaron cepas. Gráfico No. 2.

La combinación de genes mas frecuente encontrada en cepas MDR es *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1 con 5 cepas, 33.3%, los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT1 y los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2 con 3 cepas cada uno el 20.0%. Tabla No.4

Gráfico No. 2 Porcentaje de aislamientos por año de cepas MDR



de genes mutantes causantes de cepas MDR

Gen mutado	2008	2009	2010	2009	2012	2013	Total general	
<i>rpoB</i> Mutación silenciosa, <i>katG</i> MUT1 e <i>inhA</i> MUT1	5						5	33.3%
<i>rpoB</i> MUT 3, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1			1				1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT2A, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1		1					1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>inhA</i> MUT1						1	1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT 1, <i>inhA</i> MUT1					1		1	6.7%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT1					2	1	3	20.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT2		3					3	20.0%
	5	4	1	0	3	2	15	100%

Se realizó la caracterización de las especies del complejo de *M. tuberculosis* en cepas con monoresistencia a RIF y cepas MDR. La especie predominante es *M. tuberculosis/canetti*, 76.5%, y luego *M. africanum* 23.5%. Tabla No. 5

En las cepas de *M. tuberculosis/canetti* se encontró 53.8% (7 cepas) con monoresistencia a RIF y 46.1% (6 cepas) MDR. De las cepas *M. africanum*, 4 en total, 2 son R a RIF y 2 son MDR. Tabla No.5

Tabla No. 5 Distribución de genes de resistencia circulantes de las especies del Complejo *M. tuberculosis*.

MTBC	R RIF	MDR	Total	
<i>M. tuberculosis/canetti</i>	7	6	13	76.5%
<i>M. africanum</i>	2	2	4	23.5%
	9	8	17	100.0%

Gen Mutado	R RIF	MDR	TOTAL	%
<i>M. africanum</i> <i>rpoB</i> Mutación silenciosa, <i>katG</i> MUT1 e <i>inhA</i> MUT1		2	2	11.8%
<i>rpoB</i> mutación silenciosa		2	2	11.8%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT 1, <i>inhA</i> MUT1		1	1	5.9%
<i>M. tuberculosis/canetti</i> <i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT1		2	2	11.8%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT2		3	3	17.6%
<i>rpoB</i> MUT2A		2	2	11.8%
<i>rpoB</i> MUT3		3	3	17.6%
<i>rpoB</i> mutación silenciosa		2	2	11.8%
TOTAL	9	8	17	100.0%

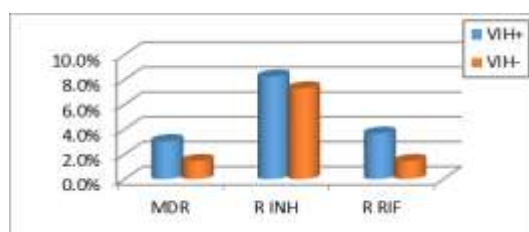
La combinación más frecuente en especies MDR de *M. tuberculosis/canetti* es *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2 y en monoresistencia a RIF es el gen *rpoB* MUT3.

Se estableció el perfil genético de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes que presentan infección por VIH.

En 91 cepas evaluadas genótipicamente se encontró 49 cepas relacionadas con pacientes VIH+, 53.8% y 35 cepas relacionadas con pacientes VIH-, 38.5%
Tabla No. 6

Tabla No. 6 y Gráfico No. 3 Distribución de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes VIH.

	VIH+	VIH-	ND
MDR	10 (3.1%)	5 (1.5%)	0 (0.0%)
R INH	27 (8.3%)	25 (7.3%)	6 (6.8%)
R RIF	12 (3.7%)	5 (1.5%)	1 (1.1%)



Se encontró mayor monoresistencia a INH en pacientes VIH+, 27 cepas, siendo el gen más frecuente *inhA* MUT1, en cepas provenientes de pacientes VIH- la monoresistencia a INH se encontró 25 cepas, siendo el gen más frecuente *katG* MUT1.

Referente a las mutaciones encontradas en monoresistencia a RIF, la más frecuente en VIH+ es *rpoB* MUT3, 50%, y en pacientes VIH-fue B mutación silenciosa, 100%.

Tabla No. 7 Distribución de mutaciones de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes HIV.

R INH	VIH+	VIH-
<i>inhA</i> MUT1	12 44.4%	9 36.0%
<i>katG</i> MUT1	7 25.9%	15 60.0%
<i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	8 29.6%	0 0.0%
Mutación silenciosa	0 0.0%	1 4.0%
TOTAL	27 100.0%	25 100.0%

R RIF	VIH+	VIH-
<i>rpoB</i> mutación silenciosa	4 33.3%	5 100.0%
<i>rpoB</i> MUT2A	2 16.7%	0 0.0%
<i>rpoB</i> MUT3	6 50.0%	0 0.0%
TOTAL	12 100.0%	5 100.0%

MDR	VIH+	VIH-
<i>rpoB</i> Mutación silenciosa, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	3 30.0%	2 40.0%
<i>rpoB</i> MUT 3, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	1 10.0%	0 0.0%
<i>rpoB</i> MUT2A, <i>katG</i> MUT1, <i>inhA</i> MUT1	1 10.0%	0 0.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>inhA</i> MUT1	1 10.0%	0 0.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT 1, <i>inhA</i> MUT1	1 10.0%	0 0.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT1	0 0.0%	3 60.0%
<i>rpoB</i> MUT3, <i>katG</i> MUT2	3 30.0%	0 0.0%
TOTAL	10 100.0%	5 100.0%

En las 10 cepas MDR provenientes de pacientes VIH+ la combinación de genes más frecuente es *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1, 30% y los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2. En pacientes VIH- el 60% es la combinación de los genes *rpoB* MUT3, *katG* MUT1. Tabla No.7

Se estableció la correlación entre la resistencia de cepas de *M. tuberculosis* y la condición VIH de los pacientes, encontrándose un valor de $p=0.5503$ lo que indicó que si existe una relación entre la condición de los pacientes y la resistencia.

Discusión

El método Genotype MTBDR_{plus} permite la genotipificación de cepas de micobacterias para determinar los genes de resistencia que pueden estar presentes, las 761 cepas que fueron evaluadas por este método determinaron las mutaciones más frecuentes en los genes *rpoB*, *inhA* y *katG* causantes de la resistencia a Rifampicina e Isoniacida. Se determinó la presencia de genes mutantes en 91 cepas con algún tipo de resistencia. Se reportaron 58 cepas, 7.6% con monoresistencia a INH, 18 cepas con monoresistencia a RIF y 15 MDR, 2.4% y 2.0% respectivamente. Esta proporción de MDR es comparable con la reportada en el Informe de las Américas de OPS de 2012, en donde la proporción de TB-MDR fue de 2,1% (1,4%-3,0%). (Informe Regional de las Américas, 2012). (19)

En el período evaluado, la mayor cantidad de cepas con mutaciones a Isoniacida se reportó en los años 2008 y 2012, siendo los principales genes detectados el *inhA* MUT1, 41.4% y el *katG* MUT1, 39.7%.

En relación a las cepas con monoresistencia a Rifampicina, el gen más frecuentemente encontrado fue el *rpoB* Mutación silenciosa 55.6%, seguido del gen *rpoB* MUT3, 33.3%. lo que es comparable con los resultados encontrados por *Asencios y cols.* en Perú, en donde las mutaciones más frecuentes a RIF fueron: *rpoB* MUT3 con 56.4%, *rpoB* MUT1 con 24.2%. En monoresistencia a INH también se encontraron similitudes. En la presente investigación el gen más frecuente en monoresistencia a INH fue *inhA* MUT1 con 41.4% seguido de *katG* MUT 1, comparable con los datos encontrados por *Asencios et al*, que reportaron 71.2% para *katG* MUT1 y 13.7% para *inhA* MUT1. (*Asencios et al*, 2012)

En referencia a las cepas MDR, el total de cepas encontradas fue del 2.0%, 15 cepas, en comparación al 4.3% reportado por *Gordillo y cols* en el período de 2004-2008. En el gráfico No. 2 se observa la distribución de cepas MDR aisladas por año, de éstas 5 cepas se aislaron en 2008, 4.5%, 4 cepas en 2009, 3.2%, 3 en 2012 y 2 en 2013 1.7% y 1.0% respectivamente. En el año 2011 no se aisló ninguna cepa MDR.

Los genes más comúnmente detectados en cepas MDR son los genes *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1 con 5 cepas, 33.3%, los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT1 y los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2 con 3 cepas cada uno el 20.0%. Tabla No. 3

Se realizó la caracterización de las especies del complejo de *M. tuberculosis* que manifestaron monoresistencia a RIF y multidrogoresistencia, MDR, y se encontró que la especie predominante es *M. tuberculosis/canetti* en un 76.5%, seguido por *M. africanum* 23.5%. La mayoría de cepas de *M. tuberculosis/canetti* presentaron monoresistencia a Rifampicina 53.8%, mientras que el resto fueron cepas MDR, 46.1%.

Para *M. africanum* la mitad de las cepas presentaron resistencia a Rifampicina y la otra mitad son cepas MDR. Tabla No. 5.

En relación a las cepas de la especie de *M. africanum* no hay diferencias en los genes encontrados tanto en monoresistencia como en MDR. Para *M. tuberculosis/canetti* el gen más frecuente para resistencia a RIF es el *rpoB* MUT3 mientras que para las cepas MDR es la combinación entre el *rpoB* MUT3+ *katG* MUT1.

Otro de los parámetros considerados como importantes es la relación entre los perfiles genéticos de resistencia de *M. tuberculosis* en pacientes que presentan infección por VIH. En 91 cepas de *M. tuberculosis* evaluadas por el método genotípico, se encontró que 49 provenían de pacientes VIH+ y 35 de pacientes VIH-, 53.8% y 38.5% respectivamente. Se esperaba que la mayoría de pacientes VIH+ fueran MDR, sin embargo el mayor porcentaje de resistencia se observó en monoresistencia a INH, 8.3%, seguido de monoresistencia a RIF, 3.7% y por último MDR con 3.1%. El porcentaje que se observó en pacientes VIH- respecto a MDR es menor, 1.5%, que el observado en VIH+. Tabla No. 6, gráfico No. 3

En relación a los tipos de genes encontrados para monoresistencia a RIF, en pacientes VIH+ el más frecuente es el *inhA* MUT1 mientras que en pacientes VIH- es el *katG* MUT1, de igual manera existe una marcada diferencia en cuanto a monoresistencia a INH, en VIH+ el gen predominante es el *rpoB* MUT3 mientras que en VIH- únicamente se encontró *rpoB* mutación silenciosa.

Referente a MDR se observó que en pacientes VIH+ se detectaron varias combinaciones de genes siendo las más frecuentes *rpoB* Mutación silenciosa + *katG* MUT1 + *inhA* MUT1 y los genes *rpoB* MUT3 + *katG* MUT2, ambos con un 30%, mientras que en pacientes VIH- únicamente se encontraron dos combinaciones de mutaciones. Tabla No.6

Al establecer la correlación entre los pacientes VIH+ con la resistencia de cepas de *M. tuberculosis* se encontró un valor de $p=0.5503$ lo que nos indica que si existe una relación entre VIH y resistencia pero que esta no excluye que pacientes VIH- manifiesten resistencia.

Bibliografía

1. OMS. Tuberculosis. Fact Sheet No. 104. 2000 Pp. 1-4
2. Brooks et.al. (2002). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México 345-352
3. Brock. (2004). Biología de los microorganismos. 10ª Edición. Editorial Pearson Educación. S.A. Madrid 412-413
4. Ruiz, H, Gordillo, R y Matta, V. (2010). Evaluación de la técnica en microplaca de 3-(4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) como marcador de la susceptibilidad micobacteriana en el Laboratorio del Hospital Roosevelt.
5. Cuevas-Córdoba, B & Zenteno-Cuevas, R. (2010). Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. El selvier. 28(9): 621-628
6. Asencios, L. et.al. (2012). Prueba molecular Genotype MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. Perú. Med. Exp Salud Pública. 29 (1) 92-98.
7. Bass JB Jr, Farer LS, Hopewell PC, O'Brien R, Jacobs RF, Rubén F, et. al. (1994) Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American

- Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Respiratory Critical Care Medical*. (149), 1359-1374.
8. Caminero, J. *et.al.* (2009). Actualización en el tratamiento de la tuberculosis. *Revista Española de Patología torácica*, 21, (2), 88-101.
 9. Cárcamo M, *et.al.* (2005) Caracterización de la coinfección VIH/SIDA tuberculosis en el Hospital Roosevelt. Informe anual inédito. Hospital Roosevelt, Guatemala.
 10. Castañeda, VL, Sánchez J y Moran-Moguel, MC. (2003) El papel de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico y control de tuberculosis. *Gaceta Médica de México*. 139(3), 288-290.
 11. Gordillo, R. & Palacios M. (2006) Susceptibilidad Antibiótica de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en los años 2004 y 2005. Hospital Roosevelt. Informe anual inédito. Hospital Roosevelt, Guatemala.
 12. Gordillo R, Boloix M, Mejía C & Palacios MC. (2012). Multidrogo resistencia en pacientes con tuberculosis diagnosticada microbiológicamente en el Hospital Roosevelt de la Ciudad de Guatemala en el período 2004-2008. *Revista del Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala*, VI, (3), 82.
 13. HAIN. (Mayo-2009). Genotype MTBDR*plus*. Test de genética molecular para identificación de Resistencia a Rifampicina y/o Isoniacida del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Hain Lifescience GmbH. Alemania
 14. HAIN. (Octubre-2010). Genotype MTBDR*s*/. Test de genética molecular para la identificación de Resistencia a Fluoroquinolonas, Aminoglicósidos/Péptidos cíclicos y Etambutol del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Hain Lifescience GmbH. Alemania
 15. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. (2006). Molecular epidemiology of tuberculosis: Current Insights. *Clinical Microbiologic*, (19) 658-685.
 16. Organización Panamericana de la Salud. (2009). Guías técnicas para la vigilancia de la drogoresistencia en la tuberculosis. Washington, (IV), 16-17.
 17. Pablos-Méndez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. (1998) Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *New England Journal Medical*, (338), 1641-1649.
 18. World Health Organization. (2008). *Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008*. World Health Organization.