

Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas

Adriana Guevara Guzmán, QFB*

Aníbal Juárez Hernández, QFB*

Roberto Zenteno Cuevas, PhD*

Resumen

La tuberculosis (TB) continúa siendo considerada como una de las enfermedades infecto-contagiosas de mayor impacto en la salud pública y requiere, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), una atención inmediata a nivel global. Los objetivos de esta breve revisión son los de considerar las condiciones epidemiológicas de la enfermedad, describir los sistemas tradicionales y las nuevas técnicas de diagnóstico, y su posibilidad de aplicación en programas de combate contra la que es considerada como la peste blanca: la tuberculosis. [Guevara A, Juárez A, Zenteno R. *Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas tecnologías diagnósticas. MEDUNAB 2003; 6(16): 46 - 51*]

Palabras clave: Tuberculosis, epidemiología, diagnóstico, PCR, ELISA.

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* y, excepcionalmente, *Mycobacterium bovis*; ésta puede penetrar en el cuerpo a través del tubo digestivo, el sistema genitourinario y el sistema respiratorio. Esta última es la vía de infección más frecuente ya que las partículas o aerosoles que contienen la bacteria pueden ser liberados por un paciente con infección de TB activa, se inspiran del aire contaminado por un individuo sano, se depositan en las mucosas de las vías respiratorias superiores y viajan a los pulmones donde se suelen instalar, para luego comenzar a crecer, es decir, a generar una TB activa. En algunos casos puede moverse por medio del sistema linfático hacia otras partes del cuerpo, tales como el riñón, espina dorsal y cerebro, donde generan una TB extrapulmonar.

Desafortunadamente la TB que se aloja en los pulmones es aquella que causa un mayor diseminación de la bacteria, o sea es la más contagiosa, mientras que la extrapulmonar no lo es. Los individuos con una TB activa contagian con

mayor probabilidad a las personas con las que se convive habitualmente, es decir, familiares cercanos, amigos y compañeros de trabajo, por lo que es importante que una vez identificado un individuo como portador de una TB activa, se recomienda que todas las personas cercanas a él se realicen las pruebas pertinentes para establecer su condición infecciosa. La tuberculosis pulmonar activa es la más frecuente y por lo general puede causar alguno de estos síntomas: tos aguda que perdure más de 2 semanas, dolor en el pecho, esputo con sangrado, "flema proveniente de los pulmones", debilidad o fatiga, pérdida de peso, falta de apetito, escalofríos, fiebre y sudoración nocturna.

La mayoría de los individuos que respiran la bacteria de TB y llegan a infectarse son capaces de contenerla mediante su sistema inmunológico e inactivarla por un largo período sin causar la enfermedad, es decir, establecen una infección latente de TB; sin embargo, es de hacer mención que el bacilo aprovecha cualquier debilidad del sistema inmunológico para activarse, aunque la gran mayoría de las personas con una TB latente nunca desarrollan una TB activa. Es por lo anterior que la aparición del virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) y fenómenos de hambruna, los cuales comprometen al sistema inmunológico y facilitan la activación de un TB latente, están funcionando como potenciadores de la enfermedad y generando bacterias patológicamente más agresivas y en casos extremos multidrogo-resistentes.¹ Una TB latente no muestra síntomas aparentes; pese a ello, es posible detectarla mediante una reacción positiva a la prueba de piel (tuberculina) y recientemente mediante la cuantificación de interferón gama producido por células ante una estimulación con antígenos de TB.

En términos generales se ha establecido que el 30% de las personas que mantienen contacto continuo con un paciente bacilífero se infectan. Del total de personas infectadas sólo del 5 al 15 % desarrollaran TB, es decir, una TB activa, la cual sin tratamiento pueden seguir un curso prolongado y causar la muerte en 2 ó 3 años.²

Epidemiología de la tuberculosis

La TB es una enfermedad humana antigua y se mantiene como una de las más extendidas en el mundo. Se estima

* Laboratorio de Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. QFB: Químico Fármaco Biólogo.

Correspondencia: Dr. Zenteno, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Ernesto Ortiz Medina No. 3, Ap. Postal 91000, Xalapa, México; e-mail: rzenteno@uv.mx

Artículo recibido: 22 de noviembre de 2002; aceptado: 24 de abril de 2003.

que un tercio de población mundial está infectada con una forma latente de *M. tuberculosis*: cada año se reportan de 8 a 10 millones de nuevos casos de los cuales 3 millones fallecen, es decir, el 6% de todas las muertes del Planeta.³ En América Latina se establecen de 250 a 300 mil nuevos casos y de 20 a 25 mil muertes por año, por lo que se coloca en tercer lugar de incidencia por debajo de África y Asia, número uno y dos, respectivamente: Y se ubican en Brasil, México y Perú como los de mayor incidencia (<http://www.paho.org/Spanish/HCP/HCT/TUB/tuberculosis.htm>). Todo lo anterior convierte a la TB como una de las enfermedades transmisibles de mayor importancia en el mundo (<http://www.who.int/disasters/commdiseases.cfm>), seguida sólo por la malaria y el VIH. Y con un panorama nada alentador ya que se desconoce el impacto que tendrán los fenómenos de cepas de tuberculosis resistentes a múltiples drogas y a su cada vez más común asociación con pacientes infectados por el VIH.

Afortunadamente se han venido realizado grandes esfuerzos para poder dar una respuesta a esta enfermedad, la cual puede ser curable, siempre y cuando se detecte a tiempo y se mantenga el paciente dentro de un régimen de tratamiento estricto. Dichos programas son promovidos por la OMS y la OPS bajo las siglas de DOT (Directly Observed Treatment) o en español TAES (Tratamiento acordado estrictamente supervisado) y han mostrado ser altamente efectivos (<http://www.who.int/gtb/dots/>).

Por otro lado, los mecanismos de diagnóstico se han rezagado en forma considerable ya que se han venido empleando por más de 20 años los mismos métodos, cuyas propiedades no permiten apoyarse en ellos para desarrollar estrategias de erradicación a mediano y largo plazo. El objetivo de la presente revisión es dar una breve mirada a los procedimientos tradicionales y a las nuevas estrategias en el diagnóstico de la tuberculosis, y comentar sobre sus deficiencias y limitaciones para finalmente, discutir las necesidades de incorporar las nuevas tecnologías dentro de las nuevas estrategias de lucha y erradicación de la TB.

Mecanismos de diagnóstico

Técnicas tradicionales de diagnóstico. Dentro de las estrategias para combatir a la TB, el diagnóstico subyace como uno de los pilares más importantes, debido a que permite la atención e inicio del tratamiento y en consecuencia minimiza los riesgos de contagio y dispersión de la enfermedad.

La baciloscopía con la tinción microbiológica de Ziehl–Neelsen es la técnica de oro para el diagnóstico de tuberculosis activa en la mayoría de los laboratorios. Esta técnica diagnostica a los enfermos con tuberculosis pulmonar que son bacilíferos, esto es, que son fuente de diseminación de la enfermedad. Sin embargo, es en este sentido en donde se han observado las mayores limitaciones, ya que este sistema necesita $\geq 10^4$ bacterias para arrojar un diagnóstico

positivo. Un dato adicional que marca la clara obsolescencia de este procedimiento es la estimación de que más de la mitad de los 10 millones de casos reportados anualmente son infecciones pulmonares y extra-pulmonares basiloscopico negativas.⁴

Por otro lado, el cultivo bacteriano líquido o sólido tiene la desventaja de tardar entre 2 a 8 semanas para arrojar un resultado positivo, lo cual repercute en incertidumbre y retraso en el diagnóstico de pacientes baciloscopico-negativos, con la consecuente demora en el inicio del tratamiento, deterioro del paciente y propagación de la enfermedad. Ante tales inconvenientes, uno de los primeros sistemas que se emplearon para sustituir los cultivos tradicionales fueron los sistemas de cultivo líquido automatizado o semi automatizado, en los cuales se emplea como única fuente de carbono Palmitato-C¹⁴. Estos sistemas funcionan detectando los desechos metabólicos gaseosos radioactivos que se generan en 10 a 15 días de cultivo, lo cual indica el crecimiento de la bacteria.⁵ Sin embargo, el empleo de estos sistemas se ha visto limitado por las dificultades asociadas con la disposición final de los radioisótopos generados.

Con base en lo anterior se han generado nuevos sistemas no-radiométricos tales como el MB/BacT (Biomérieux),⁶ BACTEC9000 (Becton Dickinson),⁷ y el tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT; Becton Dickinson).⁸ Todos ellos muestran diferentes niveles de eficiencia y funcionan midiendo cambios en la presión de gas, producción de dióxido de carbono y consumo de oxígeno ya sea fluorométrica o colorimétricamente. En términos generales estos sistemas permiten detectar micobacterias en baciloscopias positivas en aproximadamente 14 días y en la mayoría de las muestras en 21 días. Aún así, es importante resaltar la importancia de la capacitación del personal que maneja estos sistemas, ya que los porcentajes de contaminación y diagnóstico de falsos positivos son más altos cuando el personal no posee experiencia o carece de un entrenamiento adecuado.

Nuevas estrategias de diagnóstico. En los últimos años se ha trabajado afanosamente en el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico para la TB, dentro de las cuales destacan por su sensibilidad, estandarización, sencillez, reproducibilidad y certidumbre dos técnicas, las cuales se relacionan a continuación.

Amplificación de ácidos nucleicos. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, tienen una aplicación potencial en la detección rápida de micobacteria en muestras primarias,⁹ ya que permite obtener resultados a partir de 100 bacilos por muestra en cuestión de horas; sin embargo, este sistema presenta ciertos inconvenientes ya que en muestras positivas se observa una sensibilidad y especificidad mayor al 95%,^{10, 11} pero en muestras baciloscopico-negativas poseen una sensibilidad del 95% y una especificidad del 45 al 77%.¹²

A pesar de lo anterior existen dos sistemas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de tuberculosis aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos: la prueba directa de *M. tuberculosis* o "Mycobacterium tuberculosis direct test" (o MTD, GenProbe).¹³ La segunda es la prueba Amplicor de *M. tuberculosis* (Roche).¹⁴ En principio ambas pruebas fueron aprobadas para usarse sólo en muestras clínicas positivas, ya que su sensibilidad y especificidad en muestras de pacientes bascoscopico negativos disminuye hasta un 70-80%. Pero en 1999 una reformulación de la prueba MTD, denominada MTDII, se aprobó para usarse en pacientes con bascoscopias positivas y negativas, con sospechas de una TB pulmonar, y en ambos casos mostró una sensibilidad y especificidad mayores al 85%.¹⁵

En los últimos años se han incorporado dos nuevos sistemas comerciales para la detección de tuberculosis mediante la amplificación de un producto génico por reacción en cadena de la ligasa (LCR): uno de ellos es el LCx (Abbott),¹⁶ el cual amplifica un segmento del gene B, del cual sólo hay una copia en el genoma, es específico para miembros del complejo Mycobacteria y tiene una sensibilidad del 97-99% y una especificidad del 90 al 100%.¹⁷

Finalmente, el sistema RifLiPA, el cual tiene el beneficio adicional de identificar bacterias con resistencia a ampicilina; este sistema muestra una concordancia del 92 al 100% con la identificación de resistencia en cultivo, una correlación con muestras de esputo y bronqueo-lavados del 94.7% y de 100%, y con pruebas posteriores de susceptibilidad del 100%.¹⁸ Por otro lado, muchos laboratorios han desarrollado sistemas "caseros" de detección de TB a partir de muestras clínicas. La mayoría amplifican la secuencia de inserción IS 6110, debido a que existen múltiples copias y es fácil de estandarizar. Recientemente se han venido empleando otros blancos de amplificación como los genes MBP64, rpoB y hsp65,¹⁹ inclusive sistemas que emplean mRNA, con la ventaja adicional de que permite identificar la presencia de bacterias vivas.²⁰

La tuberculosis extrapulmonar puede presentar problemas particulares de diagnóstico, en especial en tuberculosis neuronal, donde el número de bacterias presente en la muestra, como podría ser el caso del fluido cerebroespinal, es escaso y en consecuencia las tinciones tienen una sensibilidad del 10 al 20%.²¹ En respuesta se han desarrollado varios métodos, algunos comerciales y otros caseros, que emplean el fundamento de la amplificación de ácidos nucleicos, con sensibilidades y especificidades altas, pero que en su gran mayoría se encuentran en evaluaciones clínicas.²²

La principal desventaja de estos sistemas radica en que se diagnostican falsos positivos con mucha facilidad debido principalmente a la contaminación de los reactivos causados por personal mal capacitado. Pero a pesar de esto el diagnóstico de TB mediante la amplificación de ácidos nucleicos por PCR se ha convertido en una de las técnicas más rápidas, seguras y confiables.¹²⁻¹⁴

Estos sistemas cada vez más se están colocando como una de las mejores herramientas para diagnosticar tempranamente y así enfrentar de inmediato a la tuberculosis infantil,^{21,23} la cual se ha convertido en un alarmante problema de salud pública global, ya que de los 1.3 millones de niños que anualmente presentan tuberculosis cerca de medio millón muere.²⁴

Es muy importante tener en cuenta que el diagnóstico de TB por medio de la amplificación de ácidos nucleicos posee derivaciones adicionales importantes que permiten determinar desde la especie de cepa de micobacteria infectante, hasta la resistencia a antibióticos; información importante para la implementación de nuevos programas de combate o tratamientos antimicobacterianos.²⁵

Ensayo inmunoenzimático. El segundo procedimiento de diagnóstico de TB que mayor potencialidades de empleo ha mostrado es el del ensayo inmune ligado a enzima (ELISA, en su siglas en inglés). Mediante este sistema es posible identificar anticuerpos circulantes específicos contra antígenos de *Mycobacterium* y, de esta manera, indicar una infección.^{26,27} Este sistema genera resultados en cuestión de horas y con sensibilidades que oscilan del 95 al 98% y especificidades del 85 al 92%, dependiendo del antígeno empleado. Posee las ventajas adicionales de que permiten evaluar el nivel de respuesta inmune ante la infección bacteriana, es decir, discernir cuándo se presentan bacterias vivas y muertas en el huésped, es más fácil de estandarizar y necesita menos reactivos y equipamiento que el sistema de PCR.²⁶ Esta técnica ofrece el mayor potencial para la realización de pruebas serológicas rápidas y podría ser de gran valor cuando sea difícil obtener muestras de esputo, como sucede en niños y en pacientes con tuberculosis extrapulmonar.

Con todo, las técnicas de inmunodiagnóstico tienen la desventaja de presentar variaciones dependiendo del antígeno empleado, arroja falsos positivos por mal manejo de los reactivos o contaminación de la muestra, y se necesita personal altamente capacitado y equipo especializado para la lectura de las muestras, por lo regular caro, lo cual limita su empleo en países pobres.

Por otro lado, la habilidad de la micobacteria de infectar un paciente y permanecer latente por muchos años antes de su reactivación es un obstáculo clave para el control y eliminación de la tuberculosis y las fallas en la identificación y tratamiento de individuos infectados latentemente permitirá continuar con la cadena de transmisión.²⁸ El diagnóstico de tuberculosis latente se ha realizado de manera tradicional mediante la prueba de la tuberculina en la piel, sin embargo, el proceso de vacunación con BCG en muchas ocasiones da lugar a una reacción cruzada con esta prueba, y en otras genera un proceso de anergia, lo que arroja falsos positivos o falsos negativos. Una derivación de la técnicas de ELISA, ELISPOT, ha permitido desarrollar un sistema de diagnóstico para una infección latente de TB. El sistema mide la cantidad de interferón

gama (IFN γ) producido por las células sanguíneas totales o de células mononucleares de sangre periférica previamente estimuladas con derivados proteicos purificados de tuberculosis (PPD) o antígenos más específicos.^{29, 30} Bajo este fundamento recientemente el sistema QuantiFERON®-TB Test (Cellestis), recibió su aprobación por parte de la administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos.^{31, 32}

Sin embargo, con la finalidad de evitar falsos positivos causados por una reacción a los antígenos provenientes de una vacunación con BCG, se están empleando antígenos ausentes en dicha vacuna, tales como ESAT-6²⁹ y CFP-10, los cuales han mostrado resultados prometedores en investigaciones de campo pero que necesitan mayores estudios para su aprobación final.³³ Finalmente, el empleo de un parche de piel que libera el antígeno de TB MPB64, en sus pruebas iniciales ha mostrado su capacidad de distinguir entre tuberculosis pasiva y controles sanos PPD-positivos. Este sistema, en una evaluación inicial, mostró una sensibilidad del 98% y una especificidad del 99%.³⁴ Finalmente, resta por mencionar que la extrapolación global de este tipo de técnicas hay que tomarla con ciertas reservas debido a la variación de los antígenos entre especies bacterianas y por el tipo de respuesta inmunológica dado por la población, en diversas zonas geográficas

Otras técnicas. Finalmente, es importante mencionar que se han desarrollado otras técnicas de diagnóstico con diversos fundamentos, tales como la hibridación con sondas de ADN o ARN,³⁵ hibridación y PCR *in situ*,³⁶ o en cultivo celular,³⁷ detección de ácido micólico en muestras sanguíneas o de orina por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC)³⁸ e identificación de ácido tubérculoesteárico en muestras de líquido cerebroespinal o de otro tipo por cromatografía de gases.^{39, 40}

Si bien estas técnicas poseen especificidades y sensibilidades altas en muestras basiloscopico-positivas y negativas y algunas se encuentran en fase final de aprobación para su empleo comercial, tienen la desventaja de que requieren de un equipo sofisticado y en muchas ocasiones caro, así como una ultra capacitación del personal de laboratorio implicado, lo cual limita de inicio su aplicabilidad en países subdesarrollados o de bajos recursos económicos.

Conclusiones

La TB posee un panorama epidemiológico sumamente particular debido a su carácter multifactorial, ya que abarca consideraciones desde aquellas propias de la bacteria, hasta socio-económicas y clínico-biomédicas. Tan solo la TB conjuntamente con el VIH se espera que para los próximos 10 años cause la muerte de 130 millones de personas y afecte principalmente población joven económicamente activa, por lo que serán los padecimientos infectocontagiosos con las más serias repercusiones en la salud pública y, en consecuencia, un gran reto para todas las entidades responsables de la salud.

Los laboratorios de diagnóstico y referencia ya no deben permitir que su posición dentro de la lucha contra la tuberculosis sea dictada por los resultados que se proveen de manera limitada o con una duración de 2 a 4 semanas o hasta meses por las “técnicas de oro tradicionales”, y que confirman que son ineficientes para establecer a partir de ellas estrategias de combate a corto plazo, y a largo plazo funcionar de soporte para desarrollar campañas de erradicación de TB. Por lo que el nuevo papel que tendrán que asumir los laboratorios de diagnóstico será el de implementar procedimientos que permitan diagnosticar a un paciente tuberculoso en períodos más cortos de tiempo, con una basiloscopía negativa, con una infección extrapulmonar, con una infección latente y con resistencia para alguna droga. Lo anterior permitirá ubicar al individuo dentro de un programa que incluya una administración oportuna y estrictamente supervisada del medicamento anti-micobacteriano adecuado, disminuyendo así la propagación de la enfermedad y la generación de bacterias resistentes a los medicamentos.

De esta manera, el diagnóstico está llamado a convertirse en la piedra angular dentro de la lucha contra la tuberculosis; a través de este texto se han mostrado los avances tecnológicos en este sentido; pese a ello, muchas de estas pruebas son inviables en países de economías emergentes, en donde por cierto se concentra el mayor número de enfermos y en donde es necesario desarrollar acciones de intervención más urgentes y sobre todo efectivas. Por lo que una solución ante tal problemática sería el desarrollar programas multinacionales conjuntos, coordinados por los países implicados o la Organización Mundial de la Salud o alguna otra entidad similar. Estos programas deberán ayudar a implementar ya sea técnicas inmunológicas, biologicomoleculares o de cualquier otro tipo, considerando las particularidades de las cepas bacterianas prevaletentes en la zona geográfica y las condiciones socio-económicas de cada país, deberán establecer estrategias que permitan disminuir costos y, finalmente, desarrollar centros de capacitación de personal. Esto se debe a que el paciente tuberculoso y la población en general tienen derecho desde un punto de vista ético a acceder al “estado del arte” en el diagnóstico de tuberculosis, aun si éste reside en áreas en donde los laboratorios locales no son capaces de proveer estos servicios. Los beneficios de proveer nuevos y más eficaces sistemas de diagnóstico de TB, con mayor cobertura y relevancia clínica, en especial en regiones de alta incidencia, serán de un gran significado en la salud pública de la población en su contexto regional, nacional y global.

En conclusión, podemos decir que a pesar de los grandes avances en los nuevos procedimientos diagnósticos contra la TB, una gran cantidad de factores limitan su aplicación a la población que mayormente lo requiere por lo que queda un largo trecho por recorrer antes de que podamos decir nuevamente que erradicamos a nuestra compañera de los últimos 10 mil años: la peste blanca, la tuberculosis.^{12, 21, 23, 25, 28, 41-45}

Agradecimientos

Roberto Zenteno fue apoyado parcialmente para la realización de este trabajo por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - Universidad Veracruzana, convenio No. 010716, y por el programa de mejoramiento de profesorado No. 103.5/02/2373, PTC-26.

Abstract

Tuberculosis and new diagnostic technologies. Tuberculosis remains like one of the infect-contagious disease with the highest impact in the public health, and require, according to the world health organization an immediate and global attention. The main goal of this short-review is to consider the epidemiological conditions of this disease and make a short description of the new techniques in use for the early stages and better threshold diagnosis of the white pest, the tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, epidemiology, diagnosis, PCR, ELISA.

Referencias

1. Maher D, Floyd K, Raviglione M. A strategic framework to decrease the burden of TB/HIV. In : http://www.who.int/gtb/publications/tb_hiv/2002-296_index.htm
2. Lennette EH, Balows A, Hasuler WJ, Truant JP. Microbiología clínica. México: Interamericana, 3 ed, 1983.
3. World Health Organization. The world Health report 2000. Health systems: Improving performance: Geneva, 2000.
4. Colebunders R, Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:97-107
5. Heifets LB, Good RB. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom BR (ed): *Tuberculosis pathogenesis, protection and control*. Washington: American Society for Microbiology, 1994: 85-110.
6. Benjamin WH., Waities KB., Beverly A., Gibbs L, Waller M, Nix S, et al. Comparison of the MB/BacT system with a revised antibiotic supplement kit to the BACTEC 460 system for detection of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3234-8.
7. Pfyffer GE, Cieslack C, Welscher HM, Kissling P, Rusch-Gerdes S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid culture systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2229-34.
8. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutiérrez J, et al. Comparison of the Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997; 35:364-8.
9. Pfyffer GE. Nucleic acid amplification for mycobacterial diagnosis. *J Infect* 1999; 39:21-6.
10. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Scagnelli M, Piersimoni C. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2002; 38:1559-62.
11. Gamboa F, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Cardona PJ, Padilla E, et al. Comparative evaluation of two Commercial assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:151-7.
12. Barnes PF. Rapid diagnostic tests for tuberculosis, progress but no gold standard. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1497-8.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Nucleic Acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR* 1996; 45:950-2.
14. American Thoracic Society Workshop. Rapid diagnostic test for tuberculosis: what is the appropriate use?. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155:1804-14.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *JAMA* 2000; 284:826.
16. Kwiatkowska S, Marczak J, Zieba M, Nowak D. Clinical utility of a commercial ligase chain reaction kit for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tubercle Lung Dis* 1999; 3:421-5.
17. Fadda G, Arditio F, Sanuinetti M, Posteraro B, Ortona L, Chezzi C, et al. Evaluation of the Abbot LC_x *Mycobacterium tuberculosis* assay in comparison with culture methods in selected Italian patients. *New Microbiol* 1998; 21:97-103.
18. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniwski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1969-73.
19. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, et al. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33:90-5.
20. Hellyer TJ, Desjardin LE, Hehman GL, Cave MD, Eisenach KD. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1995; 37:290-5.
21. Khan EA, Starke JR. Diagnosis of tuberculosis in children: increased need for better methods. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 115-23.
22. Woods GL, Bergmann JS, Williams-Bouyer N. Clinical evaluation of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in select non-respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39:747-9.
23. Hesselting AC, Schaaf HS, Gie RP, Starke JR, Beyers N. A critical review of diagnosis approaches used in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:1038-45.
24. Donald PR. Children and tuberculosis out of control?. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8:178-82.
25. Zhang Y, Yound D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34 (3):313-9.
26. Massó F, Sandoval S, Rosas P, Páez A, Díaz de León L, Zenteno E, et al. Eficacia de un ELISA con extracto proteico completo y deslipilizado de *M. tuberculosis* cepa H37Rv como prueba serológica para descartar tuberculosis pulmonar. *Rev Latinoam Microbiol* 1993; 35:177-84.
27. Lewis WR, Meeker H, Shuller-Levis G. Mycobacterial carbohydrate antigens for serological testing of patients with leprosy. *J Infect Dis* 1987; 156:763-70.
28. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2002; 347:1860-6.
29. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Eguale T, Ravn P, Andersen P. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis* specific antigen ESAT 6, signal sub clinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2001; 40(2):704-6.
30. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, de Boer K, Andersen P, Ottenhoff TH, et al. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:1089-96.
31. Federal Drug Administration. New device approval - QuantiFERON®- TB-P010033. In : <http://www.fda.gov/cdrh/mda/docs/p010033.html>

32. Mazurek G, Villarino ME. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent Mycobacterium tuberculosis infection. *MMWR* 2003; 52: 17-24.
33. Lalvani A., Pathan AA., Durkan H. 2001. Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T-cells. *Lancet* 2001; 357: 2017-21.
34. Nakamura RM, Einck L, Belmonte MA. Detection of active tuberculosis by an MBP64 transdermal patch: a field study. *Scan J Infect Dis* 2000; 33:405-7.
35. Warnon S, Zammattéo N, Alexandre I, Hans C, Remacle J. Colorimetric detection of the tuberculosis complex using cycling probe technology and hybridization in microplates. *Biotechniques* 2000; 28:1152-60.
36. Zerbi P, Schonau A, Bonetto S, Gori A, Costanzi G, Duca P, Vago L. Amplified in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous Mycobacterium species on formalin-fixed, paraffin-embedded archival biopsy and autopsy samples. *Am J Clin Pathol* 2001; 116:770-5.
37. Rossi MC, Gori A, Zehender G, Marchetti G, Ferrario G, De Madalena C, et al. A PCR-colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and M. avium from culture samples and Ziehl-Neelsen-positive smears. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1772-6.
38. Garza-González E, Guerrero-Olazarán M, Tijerina-Menchaca R, Viader-Salvado JM. Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern. *Arch Med Res* 1998; 29:303-6.
39. Alugupalli S, Olson B, Larsson L. Detection of 2-ecosanol by gas chromatography-mass spectrometry in sputa from patients with pulmonary mycobacterial infections. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1575-8.
40. Muranishi H., Nakashima M., Isobe R., Ando T., Shigematsu N. Measurement of tuberculostearic acid in sputa, pleural effusions and bronchial washing. A clinical evaluation for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Diagn Microbiol. Infect Dis* 1990; 13:235-40.
41. Suffys PN, da Silva Rocha A, de Oliveira M, Campos CE, Barreto AM, Portaels F, et al. Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4477-82.
42. O'Connor TM, Sheehan S, Cryan B, Bredin CP. The ligase chain reaction as a primary screening tool for the detection of culture positive tuberculosis *Thorax* 2000; 55:955-7.
43. Slim A. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Molecular Immunol* 2002; 39:113-9.
44. Kurth R, Haas WH. Epidemiology, diagnostic possibilities, and treatment of tuberculosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(suppl 1): ii59-ii61.
45. Juin W. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35:209-14