

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

# Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis

## Molecular methods in the diagnosis of tuberculosis / Métodos diagnósticos moleculares em tuberculoses

Diana Cristina Ortiz Marín<sup>1</sup>, Beatriz Helena Aristizábal<sup>2</sup>

Fecha de recibido:

7 de julio de 2013

Fecha de aprobación:

23 de noviembre de 2013

### RESUMEN

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en el mundo y una de las principales causas de mortalidad por infección. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el año 2011, 8.7 millones de casos de tuberculosis, de éstos el 13% presentaba coinfección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Dos billones de personas presentan infección tuberculosa latente, lo que correspondería a un tercio de la población mundial, lo que se convierte en un serio problema de salud pública, por ello la OMS la declaró como emergencia mundial. Tradicionalmente, el diagnóstico de la tuberculosis en pediatría requiere la presencia de varios criterios que incluyen el epidemiológico, clínico, radiológico, tuberculínico y microbiológico, este último consta de métodos convencionales como el cultivo, que es el estándar de oro y métodos de biología molecular para la amplificación de ácidos nucleicos, que tienen mayor auge por la posibilidad de un diagnóstico preciso y más rápido, ya que el bacilo tuberculoso es un microorganismo de crecimiento lento y requiere un número mínimo de  $10^4$  bacilos en la muestra para ser cultivado, esto dificulta su aislamiento en pacientes paucibacilares e impide el diagnóstico precoz. Las nuevas técnicas de biología molecular se han convertido en una buena opción para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones producidas por el complejo de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas, dada la rapidez en los resultados, su alta sensibilidad y especificidad y la capacidad para detectar la resistencia a fármacos antituberculosos.

**Palabras clave:** tuberculosis; técnicas y procedimientos diagnósticos; biología molecular.

### ABSTRACT

Tuberculosis is one of the most prevalent infectious diseases worldwide and is one of the main causes of mortality by infection. In 2011, the World Health Organization (WHO) estimated 8.7 million cases of tuberculosis, 13% of which were co-infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV). Two billion people present latent tuberculous infection, which corresponds to one-third of the world population. Thus, it constitutes a serious public health problem, which is why the WHO has declared it to be a global emergency. Traditionally, childhood tuberculosis diagnosis requires the presence of various criteria including epidemiological, clinical, radiological, tuberculinic, and microbiological criteria, the latter of which consists of conventional methods, such as culture, which is the gold standard, and nucleic acid amplification techniques, which are more common as they offer faster and a more accurate diagnosis; this is because the tubercle bacillus is a slow-growing microorganism and requires a minimum of  $10^4$  bacilli in the culture sample, which makes it difficult to isolate in paucibacillary patients and impedes early diagnosis. The new methods of molecular biology have become a good option for diagnosis and treatment of infections produced by the Mycobacterium tuberculosis

1. Pediatra Universidad CES. Residente en Infectología Pediátrica, Universidad CES. Medellín, Colombia.
2. Coordinadora Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

#### Dirección de

correspondencia: Beatriz Helena Aristizábal. correo electrónico: baristizabal@hptu.org.co

complex and nontuberculous mycobacteria, given the speed of results, its high sensitivity and specificity, and the ability to detect resistance to anti-tuberculosis drugs.

**Key words:** tuberculosis; diagnostic techniques and procedures; molecular biology.

## RESUMO

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo e uma das principais causas de mortalidade por infecção. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou no ano 2011, 8.7 milhões de casos de tuberculosas, destes o 13% apresentava co-infecção pelo Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV). Dois bilhões de pessoas apresentam infecção tuberculosa latente, o que corresponderia a um terço da população mundial, o que se converte num sério problema de saúde pública, por isso a OMS a declarou como emergência mundial. Tradicionalmente, o diagnóstico da tuberculose em pediatria requer a presença de vários critérios que incluem o epidemiológico, clínico, radiológico, tuberculínico e microbiológico, este último consta de métodos convencionais como o cultivo, que é o padrão de ouro e métodos de biologia molecular para a amplificação de ácidos nucleicos, que têm maior auge pela possibilidade de um diagnóstico preciso e mais rápido, já que o bacilo tuberculoso é um microrganismo de crescimento lento e requer um número mínimo de 104 bacilos na mostra para ser cultivado, isto dificulta seu isolamento em pacientes paucibacilares e impede o diagnóstico precoce. As novas técnicas de biologia molecular se converteram numa boa opção para o diagnóstico e tratamento das infecções produzidas pelo complexo de microbactérias tuberculosas e não tuberculosas, dada a rapidez nos resultados, sua alta sensibilidade e especificidade e a capacidade para detectar a resistência a fármacos antituberculosos.

**Palavras chave:** tuberculose; técnicas e procedimentos diagnósticos; biologia molecular.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en el mundo y una de las más importantes causas de muerte dentro de todas las enfermedades infecciosas<sup>1</sup>. La OMS estimó en el año 2011, 8.7 millones de casos de tuberculosis, de éstos el 13% tenía Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Se estima que cerca de dos billones de personas están infectadas por tuberculosis, lo que correspondería a un tercio de la población mundial y se ha convertido en un serio problema de salud pública, por lo cual la OMS la declaró como emergencia mundial<sup>1,2</sup>. Menos del 10% de las personas infectadas desarrollará enfermedad activa a lo largo de su vida, esto dependerá de las condiciones genéticas, del estado nutricional e inmune de cada individuo, de la cepa de *M. tuberculosis* con las que se tiene contacto, entre otros factores de riesgo<sup>1</sup>.

La tuberculosis es una enfermedad que sigue siendo una causa importante de muerte en el mundo y, aunque es curable

y prevenible, la duración prolongada del tratamiento, las cepas resistentes a múltiples fármacos y una mortal asociación con el VIH hacen que su control sea un desafío para los países en vía de desarrollo. Debido a esto las tasas de incidencia no han disminuido lo suficiente para alcanzar los objetivos globales<sup>3</sup>.

La dificultad diagnóstica y la baja notificación de casos de tuberculosis dificultan una estimación adecuada de la morbilidad. Entre los nuevos casos reportados en el 2010 por 22 países con la mayor incidencia de la enfermedad, sólo el 3.5% se encontraba en niños, las mejores estimaciones sugieren que los niños, definidos como menores de 15 años de edad, representan el 11% de los casos, inclusive, algunos reportes aumentan hasta el 20%. Lo que sugiere un subregistro importante en cuanto a la población<sup>1,4-9</sup>.

En Medellín, la Alcaldía reportó una tasa de incidencia en el 2011 de 70 por 100.000 habitantes, que comparándola con años anteriores ha ido en ascenso, lo que sugiere una mayor búsqueda, un

mejor registro y una mejora en la notificación de la enfermedad además de la aparición de nuevos casos<sup>10</sup>.

La mayoría de las personas inmunocompetentes, elimina el bacilo o queda en estado de tuberculosis latente, que se puede reactivar en cualquier momento de la vida, esto dependerá igualmente de las condiciones de base de cada individuo como el estado inmune o enfermedades como la diabetes, VIH, problemas hepáticos y desnutrición<sup>1,11</sup>.

Una prueba ideal, sería aquella que haga diagnóstico de enfermedad activa en pacientes VIH negativos y positivos, tuberculosis latente, tuberculosis extrapulmonar y tuberculosis en la edad pediátrica, además de ser capaz de detectar resistencias a medicamentos de primera línea, que sea lo suficientemente sensible, específica y que brinde un resultado oportuno<sup>1,12</sup>.

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas que carece de un diagnóstico rápido, dado que el estándar de oro es el cultivo y éste puede tardar semanas o incluso meses en crecer y brindar un resultado. Se han desarrollado nuevas pruebas para detectar infección activa, reactivación, latencia y resistencia a los medicamentos<sup>1,2,11,13</sup>. Cada uno de los métodos de diagnóstico descritos en la literatura tiene limitaciones; sin embargo, cuando la combinación de hallazgos epidemiológicos, clínicos, radiológicos, de laboratorio e histopatológicos, son consistentes en tuberculosis el diagnóstico preciso es posible en la mayoría de casos<sup>6,8</sup>.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la tuberculosis consta de varios criterios que incluyen el epidemiológico, clínico, radiológico, tuberculínico y microbiológico, este último se puede realizar mediante métodos convencionales en los cuales se incluye el cultivo, que es el estándar de oro y métodos de biología molecular para la amplificación de ácidos nucleicos, que están teniendo mayor auge debido a la posibilidad de un diagnóstico preciso y más rápido, ya que el bacilo tuberculoso es un microorganismo de crecimiento lento, además que requiere de un número mínimo de 10<sup>4</sup> bacilos en la muestra para ser cultivado, esto dificulta su aislamiento en pacientes paucibacilares e impide su diagnóstico precoz<sup>1</sup>.

Después del conocimiento celular y de las proteínas de los años 70 y 80, en los últimos 10 años del siglo XX hubo un aumento exponencial en el conocimiento de las técnicas de biología molecular, que han evolucionado con rapidez<sup>14</sup>. Las nuevas técnicas se han convertido en una piedra angular para el diagnóstico y terapéutica del complejo de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas por la rapidez en el diagnóstico, su alta sensibilidad y la capacidad para reportar la resistencia a fármacos<sup>8,9,15</sup>. Estas pruebas han sido evaluadas, durante casi dos décadas<sup>16,17</sup>, y son un complemento de los métodos convencionales<sup>18</sup>.

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de micobacterias usan ADN o ARN y tienen cada vez mayor uso clínico<sup>7</sup>.

Numerosas técnicas moleculares están disponibles para el diagnóstico con ventajas como la rapidez, alta sensibilidad y especificidad en muestras con baciloscopias positivas (BK+), determinación de genes implicados en resistencias y estudios de epidemiología molecular. Algunas desventajas que se han descrito son la baja sensibilidad y especificidad en muestras BK negativas y formas extrapulmonares<sup>19</sup> además de la posibilidad de contaminación cruzada en la extracción de ácidos nucleicos<sup>8,9,20,21</sup>.

Estas pruebas son muy sensibles, capaces de detectar muy bajo número de copias de ácidos nucleicos de la secuencia blanco. Las secuencias más analizadas y amplificadas para tuberculosis son la subunidad ribosómica IS6110, 16 rDNA, *rpoB* que codifica para la subunidad S ARN, recAgen, Gen hsp65, región intergenética 16-23 s ribosomal<sup>17,20,22-26</sup>.

Varios métodos comerciales han sido evaluados en adultos con BK positiva que muestran alta especificidad 85%-98% y alta sensibilidad para una estimación combinada del 96%, pero cuando los pacientes son BK negativo, la sensibilidad es más baja, con una estimación combinada del 66%<sup>11,17</sup>. Las estimaciones de sensibilidad son bajas en la tuberculosis paucibacilar puesto que representa la mayor parte de casos de tuberculosis infantil, y extrapulmonar<sup>10</sup>.

El rendimiento de las pruebas moleculares para la detección de tuberculosis en los niños no se ha evaluado a fondo, sin embargo, pocos estudios realizados hasta la fecha sugieren que el rendimiento en los niños es probable que sea similar a la prueba molecular con la baciloscopia negativa en adultos por su naturaleza paucibacilar<sup>8,9,11,13</sup>.

Por otra parte, el 20% de los pacientes con tuberculosis cursa con una tuberculosis extrapulmonar y esta cifra puede alcanzar hasta un 50% en pacientes VIH positivos, y, por su naturaleza paucibacilar, se convierte en un reto médico y es aquí donde las pruebas de biología molecular tienen gran importancia<sup>28-31</sup>.

La aparición de la tuberculosis multi droga resistente y más recientemente tuberculosis extensamente droga resistente, se considera como una grave amenaza para el control mundial de la tuberculosis<sup>12</sup>. La OMS estima aproximadamente 500.000 casos nuevos cada año de tuberculosis resistente lo que genera una importante amenaza de salud pública<sup>28,33</sup>, por esto la importancia del uso de la biología molecular para la detección rápida de la resistencia a rifampicina directamente de muestras de esputo<sup>33</sup>.

La resistencia a los medicamentos antituberculosos se presenta por mutaciones cromosómicas espontáneas, en diferentes genes. Esta resistencia puede ser por la transmisión directa de genes resistentes a fármacos o resistencia de novo<sup>8</sup>. Los genes más frecuentemente estudiados y amplificados para resistencia son: *rpoB* gen

81pb que explican el 95% de resistencia a la rifampicina (34) gen katG 315, 60-70% resistencia a la isoniazida, mabA – inh A 8-20% resistencia etionamida e isoniazida, rrs-rpsl-tlyA, resistencia a la amikacina, kanamicina, estreptomycin y los genes girA (85%) y gyr B 10, resistencia a las fluoroquinolonas<sup>8,10,17,22</sup>.

La determinación de la resistencia a medicamentos antituberculosos puede ser fenotípica basada en cultivos o genotípica basada en la amplificación de ácidos nucleicos<sup>9,28,32,33</sup> lo que permite determinar de una manera precoz la presencia de multidrogo resistencia (resistencia a la isoniazida y a la rifampicina) y la presencia de tuberculosis extensamente drogo resistente (resistencia a isoniazida, rifampicina, fluoroquinolonas, y medicamentos inyectables como aminoglicosidos)<sup>9</sup>.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, es un método cada vez más disponible para la utilización clínica con la ventaja de una menor contaminación cruzada y con capacidad de identificar la resistencia a la rifampicina por detección del gen rpoB que representa aproximadamente el 95% de resistencia a la rifampicina, el cual suele ir acompañado de resistencia a la isoniazida puesto que la mono resistencia es rara. Esta prueba se utiliza como un marcador para tuberculosis multiresistente<sup>9,32</sup>.

La detección de ácidos nucleicos, es recomendada por Center for Disease Control and Prevention (CDC) desde el año 2000, además de las pruebas tradicionales. Estas pruebas moleculares disminuyen el tiempo de diagnóstico de 28 días a 48 horas. En diciembre de 2010, la OMS aprobó esta prueba para su uso en países con TB endémica y la declaró un hito importante para diagnóstico de TB global<sup>9,22,28</sup>. La detección rápida de cepas resistentes facilita el acceso a la terapia adecuada, reduce las tasas de transmisión y mejora los resultados del tratamiento<sup>9,34</sup>. Por el contrario, un retraso en el diagnóstico de la tuberculosis multidrogoresistente asociada con medicamentos estándar contribuye al fracaso terapéutico y a la adquisición de resistencia a fármacos de segunda línea, así como a la difusión de fármaco resistencia de cepas a través de la transmisión de persona a persona<sup>8</sup>.

Los métodos moleculares más comunes que reporta la literatura son:

**Amplificación mediada por transcripción** (sigla en inglés TMA). Amplified *M. Tuberculosis* Direct test (AMTD, Gen probe). Método rápido e isotérmico basado en la amplificación de rRNA 16S. La transcrita inversa se utiliza para copiar rRNA a un híbrido de ADNc-ARN y posterior método de quimioluminiscencia que detecta el complejo *M. tuberculosis* por las sondas de ADN específicas. El TMA fue la primera prueba aprobada por la FDA en 1995 y muestra alta especificidad (95%-100%) y alta sensibilidad (91%-

100%) para muestras respiratorias Bk positivas, aunque en muestras BK negativas la sensibilidad puede ser tan variable como del 65%-93% y en muestras extrapulmonares (63%-100%). La desventaja más importante es la falta de control interno de amplificación y, en muchas ocasiones, sin posibilidad de automatización<sup>9</sup>.

#### **Amplificación convencional del DNA por PCR.**

Amplicor *Micobacterium tuberculosis* test (Roche). Es una de las técnicas convencionales más antiguas, basada en ADN, amplifica un segmento específico del gen 16S ARNr, seguida de hibridación y detección colorimétrica. Este método puede ser automatizado y fue aprobado en 1996 por la FDA (Food and Drug Administration) para el uso en las muestras respiratorias con una sensibilidad en esputo BK positivo (87%-100%) y especificidad esputo BK positivo (91-100%), sensibilidad en esputo BK negativo (40%-73%), sensibilidad muestras extrapulmonares (27%-98%)<sup>9</sup>; sin embargo, la sensibilidad en muestras extrapulmonares depende del método de extracción usado.

#### **Amplificación de desplazamiento de la hebra (sigla en inglés SDA).**

El BD ProbeTec ET Direct Sistem de TB (DTB, Becton Dickinson) fue introducido en 1998 como una técnica semi automatizada para la detección rápida del complejo *M. tuberculosis* en muestras respiratorias. Es un proceso de amplificación enzimática e isotérmica, para la generación de múltiples copias de secuencias del gen IS6110 y el gen 16S rRNA, cuyo producto de amplificación es detectado por el método fluorescente. Tiene una sensibilidad del 90%-100% en muestras con BK positivas y el 30%-85% en BK negativas<sup>9</sup>.

#### **Ensayos en base sólida de hibridación.**

Disponibles en el mercado como Rif INNO-Lipa. Kit TB (Innogenetics, Gent, Bélgica), el MTBDR plus genotype y el genotype *Mycobacterium* Direct (MD) assays (Hain Lifescience, Nehren, Alemania). Los dos primeros sistemas pueden detectar e identificar complejo de *M. tuberculosis*, su uso más importante es la detección de resistencias de la rifampicina e isoniazida (por Mtbdplus único genotipo). Esta técnica es específica para la detección directa de ARN de *M. tuberculosis complex* y micobacterias no tuberculosas como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium malmoense*, con una buena sensibilidad y especificidad en muestras respiratorias<sup>9,30,31</sup>.

**PCR en tiempo real (sigla en inglés RT PCR).** Esta técnica se basa en amplificación de diferentes dianas de ADN y detección fluorimétrica por sondas marcadas como TaqMan, o biosondas FRET, entre otros. Estos

ensayos tienen ventajas importantes, especialmente su rapidez y menos problemas de contaminación cruzada. En los últimos años numerosas técnicas comerciales, tales como Cobas Taqman, MTB test (Roche), GeneXpert MTB/Rif (Cepheid Diagnostics, Ginebra, Suiza) y Light Cycler PCR (Roche) han demostrado alta sensibilidad y especificidad global, especialmente en muestras respiratorias BK positivas<sup>9,36-42</sup>. De acuerdo con los pocos estudios en pediatría el Xpert MTB / RIF es una prueba confiable para el diagnóstico rápido de tuberculosis en los niños cuando se usa en el esputo inducido, la realización de dos muestras aumenta sustancialmente el rendimiento diagnóstico de tuberculosis con baciloscopia negativa<sup>43</sup>.

**Nuevos métodos.** LAMP (The loop mediate isothermal amplification) (Eiken Chemical Co. Japón y FIND Diagnostics, Ginebra, Suiza). Es una prueba relativamente nueva que implementa técnicas isotérmicas para la amplificación del ADN y que usa varios pares de cebadores de la región blanco. El ensayo de LAMP puede sintetizar un gran número de dianas de ADN (gryrB o IS6110) y la amplificación del producto puede ser detectado por métodos colorimétricos y fluorimétricos. En el momento existen pruebas limitadas en el contexto de tuberculosis, aunque los primeros datos son prometedores. Tiene como principales ventajas la amplificación del ADN a gran escala, rapidez (2 horas) y relativamente bajo costo comparado con otras técnicas, además, cuenta con sensibilidad variable 85% (36%-100%) al igual que la especificidad 94% (54%- 100%)<sup>6,9,42</sup>.

GenoQuick MTB prueba (Hain Lifescience). Sirve para el diagnóstico rápido de la tuberculosis en muestras respiratorias. Esta técnica se basa en amplificación por PCR y posterior hibridación. El complejo obtenido se une selectivamente a un medidor y posteriormente es detectado por métodos colorimétricos, no hay estudios publicados por el momento pero los datos preliminares son prometedores<sup>9</sup>.

Los CDC, recomienda realizar pruebas moleculares a los extendidos de esputo BK positivos de tal manera que si el esputo es positivo y la prueba molecular es positiva, se considera un diagnóstico confirmado, si el BK es positivo y la prueba molecular es negativa se recomienda buscar inhibidores y si la prueba molecular sigue siendo negativa, se recomienda realizar la prueba en una nueva muestra. Si la muestra es BK negativa, pero si la sospecha clínica es alta o medianamente sospechosa de TB, se debe realizar la prueba molecular y si el resultado es positivo

se considera un diagnóstico presuntivo de tuberculosis, si la muestra es BK negativa y la sospecha es mínima, no se recomienda realizar pruebas moleculares. Los pacientes en quienes estas pruebas tienen más utilidad son los pediátricos, inmunosuprimidos, pacientes con tuberculosis extrapulmonar, paucibacilares y contacto con pacientes con resistencia confirmada y grupos de riesgo<sup>28,40,44-51</sup>. Una de las limitaciones de las pruebas moleculares es que no diferencia bacilos muertos de vivos, lo que podría llevar a un falso positivo; sin embargo, las pruebas que detectan mRNA de *M. tuberculosis* sólo son positivas cuando la micobacteria está viva, por lo que se utiliza para monitorear la respuesta al tratamiento antituberculoso<sup>49</sup>.

## CONCLUSIÓN

En los últimos años los avances en la biología molecular abrieron nuevas posibilidades para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre ellas la tuberculosis, lo que ha permitido la detección y la caracterización de este microorganismo al igual que resistencia a los antimicrobianos de primera y segunda línea, lo que ha generado un importante avance en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad. Adicionalmente, se deben incluir las pruebas moleculares para complementar el diagnóstico clínico, de una manera rápida y sensible, sin reemplazar los métodos convencionales y el estándar de oro. Los pacientes pediátricos, inmunosuprimidos, con tuberculosis extrapulmonar, paucibacilares, contacto con pacientes con resistencia confirmada y grupos de riesgo, se han considerado los pacientes en que estas pruebas tienen más utilidad. ■

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Andrea Restrepo Gouzi, MD, Pediatra infectóloga del Hospital Pablo Tobón Uribe, por el apoyo y la colaboración recibida durante la elaboración de la revisión.

## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses en la revisión del tema.

## REFERENCIAS

1. McNERNEY R, MAEURER M, ABUBAKAR I, MARAIS B, MCHUGH TD, FORD N, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis.* 2012 May 15;205 Suppl 2:S147-58.
2. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Jul;56(2):103-11.
3. Editorial. A new era for global TB control. *Lancet.* 2011;377: 1495-1505
4. Cuevas LE. The urgent need for new diagnostic for symptomatic tuberculosis in children. *Indian J Pediatr.* 2011 Apr;78(4):449-55.
5. Pérez C, Marais B. Tuberculosis in children. *N Engl J Med* 2012; 367:348-361.
6. Pérez-Porcuna TM, Ascaso C, Ogusku MM, Abellana R, Malheiro A, Quinco P, et al. Evaluation of new strategies for the diagnosis of tuberculosis among pediatric contacts of tuberculosis patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Sep;31(9):e141-6.
7. Druszczyńska M, Kowalewicz-Kulbat M, Fol M, Włodarczyk M, Rudnicka W. Latent *M. tuberculosis* infection--pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies. *Pol J Microbiol.* 2012;61(1):3-10.
8. Shingadia D. The diagnosis of tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31(3):302-305.
9. Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(1):34-40.
10. Instituto Nacional de Salud. Sivigila. Bogotá; INS;2011.
11. Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respir Med.* 2009;103:1777-1790
12. Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol.* 2007 Jan;9(1):21-39.
13. Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, Pai M. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis Current standards and challenges. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2008 Mar;19(2):169-72.
14. Zar HJ, Workman L, Isaacs W, Munro J, Black F, Eley B, et al. Rapid molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis in children using nasopharyngeal specimens. *Clin Infect Dis.* 2012 Oct;55(8):1088-95
15. O'Grady J, Maeurer M, Mwaba P, Kapata N, Bates M, Hoelscher M, et al. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2011 May;17(3):134-41.
16. Pai M, O'Brien R. New diagnostics for latent and active tuberculosis: state of the art and future prospects. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008;29(5): 560-568.
17. Pai M, Kalantri M, Dheda K. New Tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II active tuberculosis and drug resistant. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6 (3): 423-436.
18. Davies O, Pai M. The diagnosis and misdiagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12(11):1226-1234.
19. Sohn H, Minion J, Albert H, Dheda K, Pai M. TB diagnostic test. How do we figure our their costs? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(6):723-733.
20. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess.* 2007; 11 (3):1-196.
21. Drobniowski, F, Nikolayevskyy, V, Balabanova Y, Bang, D, Papaventsis D. Diagnosis of tuberculosis and drug resistance what can new tools bring us?. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(7):860-870.
22. Cortés Sierra E. Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de *M tuberculosis* y micobacterias atípicas en el laboratorio clínico [tesis de grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bacteriología; 2009.
23. Veigas B, Jacob JM, Costa MF, Santos DS, Viveiros M, Inácio J, et al. Gold on paper--paper platform for Au-nanoprobe TB detection. *Lab Chip.* 2012 Nov 21;12(22):4802-8.
24. Almeida LA, Araujo R. Highlight on molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:67-75.
25. Handa U, Mund I, Mohan S. Nodal tuberculosis revisited: a review. *J Inf Dev Ctries.* 2012;6(1):6-12.
26. Vittor A, Garland J, Schlossberg D. Improving the diagnosis of tuberculosis: from QuantiFERON to new techniques to diagnose tuberculosis infections. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011; 8:153-163.
27. Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress needs, and translation in to practice. *Lancet.* 2010; 375:1920-1937.
28. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Testing for TB infection [monografía en Internet]. Atlanta, GA: CDC;2014 [citada 2014 May 26]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/tb/topic/testing/default.htm>.
29. Jain A. Extra pulmonary tuberculosis: a diagnostic dilemma. *Ind J Clin Biochem.* 2011; 26(3): 269-273.

30. Ahmad S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir Res.* 2010 Dec 3;11:169.
31. Sharma S, Mohan A, Sharma A. Challenges in the diagnostic and treatment of miliary tuberculosis. *Ind J Clin Biochem.* 2011; 26(3): 269–273.
32. Cuevas-Córdoba B, Zenteno-Cuevas R. Tuberculosis drogo resistente, mecanimos moleculares y métodos diagnósticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(9):621-628.
33. Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba M. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases.* 2009; 9 (67):1-15.
34. Boehme C, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.* 2010; 363(11):1005-1015.
35. Chang K, Lu W, Wang J, Zhang K, Jia S, Li F, et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. *J Infect.* 2012 Jun;64(6):580-8..
36. Causse M, Ruiz P, Gutierrez-Aroca JB, Casal M. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(8): 3065-3067.
37. Raoot A, Dev G. Assessment of Status of rpoB Gene in FNAC Samples of Tuberculous Lymphadenitis by Real-Time PCR. *Tuberc Res Treat.* 2012;2012:834836
38. Bodmer T, Strohle A. Diagnosing Pulmonary Tuberculosis with the Xpert MTB/RIF Test. *J Vis Exp.* 2012 Apr 9;(62):e3547.
39. Palomino JC. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *Current Opinion Pulm Med.* 2006; 12: 172-178.
40. Gous N, Scott LE, Wong E, Omar Ob, Venter W, Stevens W. Performance of the Roche LightCycler Real-Time PCR Assay for Diagnosing Extrapulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(6):2100-2103.
41. Zhang L, Ye Yu, Duo L, Wang T, Song X, Lu X, et al. Application of Genotype MTBDRplus in rapid detection of the Mycobacterium tuberculosis complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volum laboratory in Southern China. *Mol Biol Rep.* 2011; 38:2185–2192.
42. Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited Countries: hype or hope?. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010; 10(7): 937–946.
43. Nicol M, Workman L, Isaacs W. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11: 819–24.
44. Perez C. Pediatric tuberculosis: new guidelines and recommendations. *Current Opinión Pediatr.* 2012; 24:319-328.
45. Zar H, Workman L, Isaacs W, Munro J, Black F, Eley B, et al. Rapid Molecular Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Children Using Nasopharyngeal Specimens. *Clin Infect Dis.* 2012; 55(8):1088-1095.
46. Ghanashyam B. Tuberculosis diagnostics: innovating to make an impact. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9(4): 381-384.
47. Colmenero JD, Ruiz-Mesa JD, Sanjuan-Jiménez R, Sobrino B, Morata P. Establishing the diagnosis of tuberculous vertebral osteomyelitis. *Eur Spine J.* 2013 Jun;22 Suppl 4:579-86.
48. Richter E, Gerdes S, Hillemann. Evaluation of the Geno Type MTBDR plus Assay for Rifampin and Isoniazid Susceptibility Testing of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains and Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8): 2635–2640.
49. Lee M, Chen Y, Peng C. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2009: 174–180.
50. Gómez J, González A, Castaño J, Patarroyo M. Biología molecular: principios y aplicaciones. Medellín : CIB;2011.
51. Fontanilla JM, Barnes A, Von Reyn F. Current diagnosis and management of peripheral tuberculosis lymphadenitis. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(6):555-562.