

Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Volumen
Volume **16**

Número
Number **3**

Julio-Septiembre
July-September **2003**

Artículo:

Pasado, presente y futuro de las técnicas
diagnósticas de tuberculosis.

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis

Roberto Zenteno Cuevas*

Palabras clave: Tuberculosis, diagnóstico, amplificación ácidos nucleicos, ELISA.

Key words: Tuberculosis, diagnosis, amino acid amplification, ELISA.

RESUMEN

Con 10 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes cada año, la tuberculosis se mantiene como una de las enfermedades infecto-contagiosas de mayor impacto en la salud pública del mundo y requiere, de acuerdo a las entidades responsables de salud, una atención inmediata. Hasta ahora, los programas nacionales y globales de lucha contra la tuberculosis se han centrado en dos grandes rubros: 1) la identificación de individuos baciloscopico-positivos y, 2) su incorporación a programas de administración estrictamente supervisada de fármacos. Si bien tales estrategias han permitido controlar y disminuir el número de casos, no está claro el papel que los sistemas de diagnóstico tradicionales tendrán para identificar pacientes baciloscópico negativos, con tuberculosis extrapulmonar y con infección latente, por lo que es importante empezar a cuestionar el futuro papel de los sistemas tradicionales de diagnóstico dentro de las estrategias a mediano y largo plazo de control y eliminación de la tuberculosis.

El objetivo principal de esta revisión es describir y evaluar las técnicas convencionales, las nuevas propuestas para el diagnóstico de la tuberculosis, y su necesidad de incorporarse en los futuros programas de control y eliminación.

ABSTRACT

With 10 million new cases and 3 million deaths worldwide, tuberculosis (TB) remains as one of the most important infectocontagious disease and with severe impact on public health, and demands immediate attention, according to health institutions. Until now the national and global efforts to fight against TB have been focused on two issues: 1) identification of bacilloscopic-positive individuals and, 2) incorporation of these patients into directly observed short-course treatment programs. These programs have been successful in the control and decrease of infections, however, the role of conventional diagnosis systems to identify negative-sputum, extrapulmonary TB and latent infection patients is not clear; it is therefore important to question the future role of diagnosis techniques in TB control and eradication programs.

The main objective of this review is to describe and evaluate conventional techniques, the new proposals for diagnosis of tuberculosis and the need to incorporate them in future control and elimination programs.

LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del complejo tuberculosis (TB) el cual de manera clásica incluye a *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, aunque existen otras especies no clásicas tales como *Mycobacterium mi-*

* Laboratorio de Ecología y Salud. Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana.

Correspondencia:
DC. Roberto Zenteno Cuevas. Instituto de Salud Pública-Universidad Veracruzana.

Ernesto Ortiz Medina No. 3. Jalapa, Veracruz. México. CP. 91000.

Tel. 01 228-8157404, Fax 228-8145946
E-mail: rzenteno@uv.mx

Trabajo recibido: 13-V-2003; Aceptado: 11-VIII-2003

croti y *Mycobacterium canettii*. La vía de penetración al organismo es por lo común, a través del sistema respiratorio, aunque es posible que ingresen por el tubo digestivo y el sistema genitourinario. La bacteria que se aloja en los pulmones suele dar lugar al proceso infeccioso más frecuente y es el que causa una mayor diseminación, mientras que la infección extrapulmonar, es decir, aquélla que se ubica en los linfonodos, pleura, huesos, vías urinarias, riñón, columna vertebral, cerebro y otros órganos regularmente no lo es. La gran mayoría de las personas que respiran la bacteria y llegan a infectarse son capaces de contenerla e inactivarla, así establecen una infección latente de TB; sin embargo, este bacilo aprovecha cualquier debilidad del sistema inmunológico para activarse. Es por lo anterior que, la aparición del virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y fenómenos de desnutrición, los cuales comprometen al sistema inmunológico, están funcionando como potenciadores de la enfermedad¹. En términos globales se ha establecido que el 30% de las personas que mantienen contacto continuo con un paciente bacilífero se infectan y del total de personas infectadas sólo del 5 al 15% desarrollaran TB activa, la cual sin tratamiento pueden seguir un curso prolongado y causar la muerte en 2 ó 3 años².

EPIDEMIOLOGÍA DE LA TB

Anualmente se reportan 10 millones de nuevos casos de TB activa de los cuales tres millones llegan a fallecer, de tal forma que aproximadamente el 6% de todas las muertes en el mundo son debidas a esta enfermedad y se estima que el 30% de la población mundial alberga una forma latente de tuberculosis³. Se aprecia que la incidencia global es probablemente superior a 70 por 100.000 habitantes, aunque es mucho mayor en ciertas zonas geográficas y grupos de riesgo, como en algunos países africanos cuya incidencia llega a ser de 400 por 100.000 habitantes³. África y Asia ocupan las posiciones uno y dos en el número de infectados diagnosticados cada año, mientras que América Latina ocupa el tercer lugar con 300 mil diagnósticos positivos cada año y con 25 mil decesos y los países con mayor incidencia son Brasil, Perú y México (<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>), seguidas sólo por la malaria y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)³. El panorama no es nada alentador pues 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.

CIFRAS NACIONALES

Dentro del contexto nacional el comportamiento de la tuberculosis respiratoria ha obedecido a una disminución tanto de su morbilidad como mortalidad. De acuerdo al

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, en México para el año 2000 se reportaron 15,941 casos (<http://www.ssa.gob.mx/unidades/epide/2001/sem52/cua5.pdf>), para el año 2001 15,949 y se estableció una tasa de 16.16 por cada 100.000 habitantes (<http://www.epi.org.mx/boletin/2002/sem52/cua5.pdf>). Para el año 2002 se contabilizaron 14,064 casos (<http://www.epi.org.mx/boletin/2002/sem52/cua5.pdf>). Y hasta la semana 26 de 2003 se contabilizaron 5,378 nuevos casos (<http://www.epi.org.mx/boletin/2003/sem26/cua5.pdf>). Finalmente y de acuerdo a la encuesta de mortalidad de 2001, la tuberculosis causó 903 defunciones en la población general y en la población de 15-44 años ocupó el 15^{avo} lugar como causa de muerte (www.salud.gob.mx/sinais/).

LA IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO DE LA TB

La TB puede ser curable al 100%, siempre y cuando se diagnostique y se mantenga el paciente dentro de un régimen de tratamiento estricto, dichos programas promovidos por la Organización Mundial de la Salud, la Organización Panamericana de la Salud y la Secretaría de Salud de México bajo la Directly Observed Treatment (DOT, por sus siglas en inglés) o el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), han mostrado ser altamente efectivos (<http://www.who.int/gtb/dots/>). Recientemente, dentro de las estrategias a mediano y largo plazo para la eliminación de la TB, se ha planteado la importancia del diagnóstico temprano, oportuno y eficaz, el cual permite un inicio más temprano del tratamiento, con la consecuente disminución en la dispersión de la enfermedad⁴.

A continuación, se describen brevemente las técnicas tradicionales de diagnóstico, así como las nuevas técnicas y se mencionan sus ventajas y limitaciones y, finalmente se discute la importancia de incorporar las nuevas técnicas dentro de las estrategias de control y eliminación.

TÉCNICAS TRADICIONALES DE DIAGNÓSTICO DE LA TB

Dentro de las técnicas para el diagnóstico de la TB, la baciloscopía o la tinción microbiológica de Ziehl-Neelsen han sido las técnicas de oro en la mayoría de los laboratorios. Estas técnicas diagnostican a los enfermos con TB 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 por mililitro para arrojar un diagnóstico positivo. Un dato adicional que complica la aplicación de este método como el único sistema para diagnosticar a pacientes tuberculosis, es la estimación de que más de la mitad de los 10 millones de casos reportados anualmente, son infecciones pulmonares y extrapulmonares baciloscopicos negativos⁵, los cuales pueden diagnosticarse con un criterio clínico, histopatológico, epidemiológico, radiológico e inmunológico.

En respuesta a lo anterior, se propuso como segundo frente de batalla en el diagnóstico de la TB, el cultivo bacteriano líquido o sólido, y que se emplea en general para confirmar o descartar baciloskopias negativas, pero con un diagnóstico clínico y radiológico positivo. No obstante, estos métodos tienen la desventaja de tardar entre dos a ocho semanas para arrojar un resultado. Ante tal inconveniente, como tercer frente de batalla se implementaron los sistemas de radiocultivo líquido automatizado o semiautomatizado (radiométricos), en los cuales se emplea como única fuente de carbono Palmitato-C¹⁴, estos sistemas funcionan detectando los desechos metabólicos gaseosos radiactivos que se generan en 10 a 15 días de cultivo, lo cual indica el crecimiento de la bacteria⁶. Sin embargo, el empleo de estos sistemas se ha visto limitado, en parte, 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 (Biomerieux)⁷, BACTEC9000 (Becton Dickinson)⁸, y el tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT; Becton Dickinson)⁹, todos ellos muestran diferentes niveles de eficiencia, y funcionan midiendo cambios en la presión de gas, consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, ya sea fluorométrica o colorimétricamente. En términos generales, estos sistemas permiten detectar micobacterias en baciloskopias positivas en aproximadamente 14 días y, en la mayoría de las muestras en 21 días. Las desventajas de estos sistemas radican fundamentalmente en que todavía toman muchos días y es oportuno 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 DE LA TB

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 generales: el ensayo inmunoenzimático y la amplificación de ácidos nucleicos.

El ensayo inmunoenzimático

Mediante el ensayo inmune ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), es posible identificar anticuerpos circulantes específicos contra antígenos de *Mycobacterium* y, de esta manera indicar una infección^{10,11}. 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 evaluar el nivel de respuesta inmune ante la infección bacteriana, es decir, discernir cuando se presentan bacterias vivas y muertas en el huésped, es fácil de estandarizar y necesita menos reactivos y equipa-

miento que otros sistemas¹⁰. Esta técnica ofrecería 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. Sin embargo, el diagnóstico de la tuberculosis por la técnica de ELISA, tiene la desventaja de presentar variaciones dependiendo del antígeno empleado, arroja falsos positivos por mal manejo de los reactivos o contaminación de la muestra, se necesita personal altamente capacitado y equipo especializado para la lectura de las muestras.

Una derivación de la técnica de ELISA es ELISPOT, que ha permitido desarrollar sistemas de diagnóstico para una infección latente de la TB, el sistema mide la cantidad de interferón gamma (IFN γ) producido por las células sanguíneas totales o células mononucleares de sangre periférica, previamente estimuladas con derivados proteicos purificados de tuberculosis (PPD, por sus siglas en inglés) o antígenos más específicos^{12,13}. Bajo este fundamento, recientemente el sistema QuantiFERON[®]-TB Test (de la compañía Cellestis Ltd, Carnegie Victoria Australia), recibió su aprobación por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos^{14,15}. 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-6¹², CFP-10 y MPB64 los cuales han mostrado resultados prometedores en investigaciones de campo y se encuentra en su fase final de aprobación^{16,17}.

Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de TB

El diagnóstico de la TB mediante la amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa o PCR, permite una detección rápida de micobacterias en muestras primarias¹⁸ y, genera resultados satisfactorios a partir de 100 bacilos por muestra en cuestión de horas, no obstante, este sistema presenta ciertos inconvenientes ya que en muestras positivas tiene una sensibilidad y especificidad mayor al 95%^{19,20}, pero en muestras baciloscópico negativas poseen una sensibilidad del 95% y una especificidad del 45 al 77%²¹. 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, del laboratorio GenProbe²², y la segunda es la prueba "Amplicor" de *M. tuberculosis* (Laboratorios Roche)²³. En principio ambas pruebas fueron aprobadas para usarse sólo en muestras clínicas positivas, ya que su sensibilidad y especificidad en muestras de pacientes baciloscópico negativas desminuye hasta un 70-80%. Pero en 1999 una reformulación de la prueba MTD, denominada MTDII, se aprobó para usarse en pacientes con baciloskopías positivas y

negativas con sospechas de una TB pulmonar y, en ambos casos mostró una sensibilidad y especificidad mayores al 85%²⁴.

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, (Laboratorios Abbott)²⁵, el cual amplifica un segmento del gene B que, 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%²⁶, y el sistema RifLiPA que tiene el beneficio adicional de identificar bacterias con resistencia a ampicilina²⁷, muestra una concordancia del 92 al 100% con la identificación de resistencia en cultivo, una correlación con muestras de espuma y bronquiolavados del 94 y 100% y con pruebas de susceptibilidad del 100%²⁷.

SISTEMAS "CASEROS" DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB

Por otro lado, muchos laboratorios han desarrollado sistemas "caseros" de detección de TB por amplificación de ácidos nucleicos 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 son los genes MBP64, rphb y hsp65²⁸, inclusive sistemas que emplean ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el cual posee la ventaja adicional de que permite identificar bacterias vivas²⁹.

AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN MUESTRAS EXTRAPULMONARES

La tuberculosis extrapulmonar presenta problemas particulares de diagnóstico, especialmente en la tuberculosis del sistema nervioso, donde el número de bacterias presente en la muestra como podría ser el fluido cerebroespinal es escaso y en consecuencia las baciloskopias tienen una sensibilidad del 10 al 20%³⁰. En respuesta, se han desarrollado varios métodos caseros y algunos comerciales que emplean el fundamento de la amplificación de ácidos nucleicos, con sensibilidades y especificidades altas, y que se encuentran en evaluaciones clínicas finales³¹.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

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 la TB mediante la amplificación de ácidos nucleicos por PCR se ha convertido en una de las técnicas más rápidas, seguras y confiables²¹⁻²³. 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 infantil³⁰⁻³², la cual se ha convertido en un problema alarmante de salud pública global, ya que de los 1.3 millones de niños que anualmente presentan tuberculosis cerca de medio millón muere³³.

Finalmente, cabe mencionar que el diagnóstico de la TB por medio de la amplificación de ácidos nucleicos posee derivaciones adicionales importantes que, permiten determinar en cuestión de horas desde la especie de cepa de micobacteria infectante, hasta la resistencia a antibióticos; información importante para la implementación de programas de combate o tratamientos antimicrobacterianos³⁴.

OTRAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE TB

Finalmente, es importante mencionar que se han venido desarrollando otras técnicas de diagnóstico con diversos fundamentos, tales como la hibridación con sondas de ADN o ARN³⁵, hibridación y PCR *in situ*³⁶, o en cultivo celular³⁷, detección de ácido micólico en muestras sanguíneas o de orina por cromatografía de líquidos a alta presión (*High Pressure Liquid Chromatography*)³⁸, identificación de ácido tuberculoesteárico en muestras de fluido cerebroespinal o de otro tipo por cromatografía de gases^{39,40}, e incremento de la actividad de la adenosindesaminasa (ADA), como una respuesta a antígenos específicos de *Mycobacterium* en tuberculosis peritoneal y pleural⁴¹.

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

CONCLUSIONES

La TB posee un panorama epidemiológico sumamente complejo debido a su carácter multifactorial y, se encuentra en proceso de agravamiento por fenómenos de desnutrición, asociación con el VIH y multidrogorresistencia. Tan sólo la TB, conjuntamente con el VIH se espera que para los próximos 10 años causen la muerte de 140 millones de personas y afecten principalmente a la población 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.

Es fundamental que las nuevas estrategias de combate y eliminación de la TB consideren procedimientos de diagnóstico altamente eficientes a fin de detectar al paciente tuberculoso en períodos más cortos, en etapas más tempranas, con baciloscopía negativa, con infección extrapulmonar y con latencia, recordemos que el 1% de la pobla-

ción mundial alberga una forma latente de TB, de esta manera el diagnóstico está llamado a ser la piedra angular dentro de la lucha contra la tuberculosis.

En México y muchos otros países se han venido empleando por más de 30 años los mismos métodos de diagnóstico, a partir de las descripciones anteriores es ya evidente que sus particularidades no permiten apoyarse en ellos para desarrollar a mediano y largo plazo estrategias de control y eliminación eficaces, por lo que la incorporación de nuevas técnicas de diagnóstico se hace cada vez más necesaria. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de la Tuberculosis emitido por la Secretaría de Salud, únicamente se consideran como elementos de diagnóstico la baciloscopía, el cultivo de tejidos, fluido o secreciones de órganos de pacientes con manifestaciones clínicas e histopatológicas⁴². A partir de lo descrito en este trabajo es obligado hacer adecuaciones a la misma, a fin de considerar las nuevas tecnologías de diagnóstico.

Por otra parte, 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 insuficientes, más que esto, el laboratorio de diagnóstico deberá tomar un papel estratégico y tener una participación más activa dentro de las campañas de lucha contra la TB.

Finalmente, desde el punto de vista ético-profesional, el paciente tiene derecho a acceder al *estado del arte* en el diagnóstico de la tuberculosis, aún si reside en áreas donde los laboratorios locales no son capaces de proveer estos servicios. Los beneficios de proveer nuevos y más sistemas de diagnóstico eficaces, con mayor cobertura y relevancia clínica serán de gran significancia en el combate y eliminación de la TB y de profundo impacto en la salud del municipio, el estado y al final del país.

Agradecimientos

Zenteno R, 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.

REFERENCIAS

- Maher D, Floyd K, Ravaglione M. *A strategic framework to decrease the burden of 2002.TB/HIV*. WHO/CDS/TB/2002.296. (http://www.who.int/gtb/publications/tb_hiv/2002-296_index.htm).
- Lennette EH, Balows A, Hasuler WJ, Truant JP. *Microbiología clínica*. 3ra ed. México: Interamericana, 1983.
- World Health Organization. *The world Health report 2000*. Health systems: Improving performance: Geneva, 2000.
- WHO Report 2003. *Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing*. WHO/CDS/TB/2003.316. (<http://www.who.int/gtb/publications/globrep/index.html>).
- 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.
- Heifets LB, Good RB. *Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis*. In: Bloom BR, editores. *Tuberculosis pathogenesis, protection and control*. Washington: American Society for Microbiology, 1994:85-110.
- 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;36:3234-3238.
- 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; 35:2229-2234.
- Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutiérrez J, et al. *Comparison of the Mycobacterium growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli*. J Clin Microbiol 1997;35:364-368.
- 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 Lat Amer Microbiol 1993;35:177-184.
- Lewis WR, Meeker H, Shuller-Levis G. *Mycobacterial carbohydrate antigens for serological testing of patients with leprosy*. J Infect Dis 1987;156:763-770.
- Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Egualé T, et al. *Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT 6, signal sub clinical infection among contacts of tuberculosis patients*. J Clin Microbiol 2002; 40:704-706.
- 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 nontspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact*. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:1089-1096.
- FDA. *New device approval-QuantiFERON® - TB-P010033*. Nov. 81, 2001. (<http://www.fda.gov/cdrh/mda/docs/p010033.html>).
- Mazurek G, Villarino ME. *Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent Mycobacterium tuberculosis infection*. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2003; 52:17-24.
- Lalvani A, Pathan AA, Durkan H. *Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T-cells*. Lancet 2001;357:2017-2021.
- Nakamura RM, Einck L, Belmonte MA. *Detection of active tuberculosis by an MBP64 transdermal patch: a field study*. Scan J Infect Dis 2001;33:405-407.
- Pfyffer GE. *Nucleic acid amplification for mycobacterial diagnosis*. J Infect 1999; 39:21-26.
- Scarpato 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 2000;38:1559-1562.
20. 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;17:151-157.
 21. Barnes PF. *Rapid diagnostic tests for tuberculosis, progress but no gold standard.* Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1497-1498.
 22. MMWR *Nucleic Acid amplification tests for tuberculosis.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1996;45:950-952.
 23. American Thoracic Society Workshop. *Rapid diagnostic test for tuberculosis: what is the appropriate use?* Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1804-1814.
 24. Centers for Disease Control and Prevention Update. *Nucleic acid amplification tests for tuberculosis.* JAMA 2000;284:826.
 25. 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 Tubercl Lung Dis 1999;3:421-425.
 26. Fadda G, Arditio F, Sanuinetti M, Postoraro B, Ortona L, Chezzi C, et al. *Evaluation of the Abbot LC Mycobacterium tuberculosis assay in comparison with culture methods in selected Italian patients.* New Microbiol 1998;21:97-103.
 27. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniowski FA. *Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol 1998;36:1969-1973.
 28. 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;33:90-95.
 29. 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 1999;37:290-295.
 30. Khan EA, Starke JR. *Diagnosis of tuberculosis in children: increased need for better methods.* Emerg Infect Dis 1995;1:115-123.
 31. Woods GL, Bergmann JS, Williams-Bouyer N. *Clinical evaluation of the Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test for rapid detection of Mycobacterium tuber-*
 - culosis in select nonrespiratory specimens.* J Clin Microbiol 2001;39:747-749.
 32. Hesselink 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;6:1038-1045.
 33. Donald PR. *Children and tuberculosis out of control?* Curr Opin Pulm Med 2002; 8:178-182.
 34. Zhang Y, Yound D. *Molecular genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis.* J Antimicrob Chemother 1994;34:313-319.
 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;28:1152-1160.
 36. Zerbì P, Schonau A, Bonetto S, Gori A, Costanzi G, Duca P, et al. *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;116:770-775.
 37. Rossi MC, Gori A, Zehender G, Marchetti G, Ferrario G, De Maddalena 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;38:1772-1776.
 38. Garza E, Guerrero M, Tijerina R, Viader JM. *Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern.* Arch Med Res 1998;129:303-306.
 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;31:1575-1578.
 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; 13:235-240.
 41. Pérez-Rodríguez E, Jiménez CD. *The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis.* Curr Opin Pulm Med 2000;6:259-266.
 42. Norma Oficial Mexicana NOM-006SSA2-1993, para la preventión y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud, modificaciones. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el martes 31 de octubre de 2000.

