



# Tuberculosis, un desafío del siglo XXI

Rafael García-González,\* Estrella Cervantes-García,\* Angélica Reyes-Torres\*

## Palabras clave:

Tuberculosis primaria  
y postprimaria,  
bacilo ácido alcohol  
resistente,  
ácido micólico,  
morfología  
microscópica.

## Key words:

Primary and post-  
primary tuberculosis,  
acid alcohol resistant  
bacillus, micolic  
acid, microscopic  
morphology.

\* Laboratorio 5  
de Enseñanza del  
Departamento de  
Microbiología y  
Parasitología.

Facultad de Medicina,  
UNAM.

Correspondencia:  
Rafael García-  
González  
Facultad de Medicina.  
Edificio A, primer  
piso, Universidad  
3000, Circuito Interior,  
04510, México, D.F.  
Tel.: 56232389  
Cel.: 55-18-16-62-59  
E-mail: rafagargon@  
hotmail.com

Recibido:  
17/11/2015  
Aceptado:  
14/01/2016

## RESUMEN

La tuberculosis es un problema de salud pública mundial que constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el humano. A partir de la declaración de 1993, se considera a esta enfermedad una emergencia mundial y representa uno de los grandes desafíos para este siglo, ya que no se alcanzaron los objetivos planteados (objetivos de desarrollo del milenio) en el año 2015, siendo un agente que infecta a un tercio de la población mundial. *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria portadora de una amplia gama de factores de virulencia, los cuales se ubican principalmente a nivel de su pared celular. Éstos la capacitan para penetrar y multiplicarse intracelularmente, lo cual la ayuda a permanecer en el organismo y a evadir la respuesta inmune específica e inespecífica del hospedero. Por otra parte, la bacteria puede lograr mantenerse en estado de latencia y reactivarse más tarde pese a la hipersensibilidad tardía que desarrolla el hospedero como mecanismo de defensa para erradicarla. Esta serie de factores que contribuyen al desequilibrio en la relación hospedero-parásito ha propiciado el fracaso de los esfuerzos para controlar esta enfermedad. No obstante, esto mismo ha impulsado el desarrollo de procedimientos con miras a realizar un diagnóstico oportuno y efectivo.

## ABSTRACT

*Tuberculosis is a worldwide public health problem that constitutes one of the principal causes of morbidity and mortality in human beings. Since the 1993 declaration, this disease is considered a worldwide emergency and it is considered as one of the great challenges of the XXI century, since the goals set for the year 2015 (the millennium development goal) were not achieved and it is a causal agent that infects one third of the population worldwide. Mycobacterium tuberculosis is a bacteria that carries multiple virulence factors, most of which are located in its cell wall. These habilitate it to penetrate cells, to multiply intracellularly, to endure within the organism, and to evade both the specific and inespecific immune response of the host. Moreover, the bacteria can remain latent and then reactivate in spite of the late hypersensitivity that the host develops as a defense mechanism to eradicate it. All these factors lead to an imbalance of the host-parasite relation and have contributed to the failure of all the efforts made to control the disease. Nevertheless, this has also stimulated the development of procedures directed to have an effective and timely diagnosis.*

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad ancestral, reemergente, infectocontagiosa, crónica y altamente letal.<sup>1-3</sup> Se le considera un complejo de fenómenos microbiológicos e inmunológicos y está catalogada entre las enfermedades infecciosas más relevantes de nuestro tiempo. Asimismo, representa un problema de salud pública a nivel mundial y un gran desafío en el siglo XXI. Se le encuentra en todo el mundo, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, en estos últimos con un mayor índice de morbilidad y mortalidad.<sup>1,2,4-7</sup> Este problema se atribuye a múltiples factores como la migración, sistemas de salud pública deficientes, así como a la pandemia de VIH/SIDA, entre otros.<sup>6,7</sup>

## EPIDEMIOLOGÍA

Alrededor de un tercio de la población mundial, aproximadamente dos mil millones de personas, se encuentran infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*, nueve millones de ellos enferman anualmente y cerca de dos millones mueren por esta enfermedad. Es la segunda causa de muerte por procesos infecciosos después del VIH, aun cuando se cuenta con técnicas de diagnóstico sencillas y precisas y con tratamientos eficaces.<sup>4,5,8,9</sup>

De acuerdo con reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2013 se estimó que nueve millones de personas desarrollaron tuberculosis, entre 8.6 a 9.4 millones, lo que equivale a 126 casos/100,000 habitantes, de los cuales 1.5 millones murieron

y 360,000 eran VIH positivos. 60% de los casos se dieron en el sexo masculino y se ha estimado que 550,000 casos se presentaron en niños, lo que equivale al 6% del total, con 80,000 muertes.<sup>10</sup>

Se calcula que entre los años 2000 y 2013 se han salvado 37 millones de vidas gracias a diagnósticos y tratamientos efectivos. Sin embargo, el número de decesos continúa siendo elevado, sobre todo en casos de infecciones con cepas multirresistentes.

Desde el punto de vista geográfico, de los nueve millones que desarrollaron tuberculosis en 2013, 56% fueron de Asia, 29% correspondieron a África, 8% al Este del Mediterráneo, 4% de Europa y 3% de América.<sup>10</sup>

## ETIOLOGÍA

La tuberculosis es causada por *M. tuberculosis* perteneciente al género *Mycobacterium*, familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetaceae*. Bacteria que forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el que se incluyen además de *M. tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedi* y *Mycobacterium caprae*.<sup>1,11</sup> De estas especies, *M. tuberculosis* ocasiona la mayoría de los cuadros clínicos y es la más importante desde el punto de vista patógeno y sanitario.<sup>11</sup>

Características. Son organismos de morfología variable, de aspecto bacilar, rectos o ligeramente curvos o cocoides, no forman esporas, flagelos, ni cápsula, aunque en diferentes especies del género *Mycobacterium* se ha descrito una capa de glucopéptidolípidos semejante a una cápsula.<sup>2,12</sup> Miden de 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.0 a 10.0  $\mu\text{m}$  de longitud, algunas veces presentan un aspecto filamentoso que por agitación se fragmenta, dando el aspecto antes mencionado. Se consideran bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) sobre su base tintorial.<sup>13</sup> Rara vez se tiñen con la tinción de Gram; sin embargo, se les describe como Gram positivos débiles. El componente más representativo en su pared celular es el ácido micólico que se encuentra unido covalentemente a arabinogalactana, la que a su vez se enlaza de la misma manera al peptidoglucano, elemento parecido al de *Escherichia coli* sensible a  $\beta$  lactámicos. Estos tres elementos conforman el llamado *core* o centro de la pared celular de *M. tuberculosis*. Encontrándose además, otras moléculas que permiten establecer la estructura completa de la pared celular, como es la lipoarabinomana no asociada covalentemente al *core* de la pared. La trehalosa (disacárido de glucosa) acilada que se asocia por medio de enlaces hidrofóbicos al ácido micólico en la parte exterior de la envoltura celular. Otra molécula es la trehalosa sulfatada

y acilada. Sin embargo, su principal característica es su alto contenido en lípidos (20-40% del peso seco).<sup>14</sup>

Estas características estructurales de *M. tuberculosis* y otras micobacterias que conforman la familia *Mycobacteriaceae* están involucradas en sus propiedades tintoriales (ácido alcohol resistencia) y de manera indirecta en su lento metabolismo (con un tiempo de generación de 20 horas) que requiere más de siete días para poder observar el desarrollo en medios sólidos, además de conferirle propiedades inmunológicas (que son empleadas en el diagnóstico serológico del género *Mycobacterium*) y en su patogenicidad.<sup>14,15</sup>

*M. tuberculosis* es aerobia estricta, mesofílica (se desarrollan entre 20-37 °C) con alto contenido de G + C (62 a 70%) en su ADN, parecido al contenido en otras bacterias productoras de ácido micólico como *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium* entre otras, lo que les hace compartir ciertas similitudes (ácido alcohol resistente).<sup>8,14,16</sup>

Presenta un genoma formado por 4,411,532 pares de bases (pb), con 3,959 genes (90.8%) que codifican para proteínas, seis pseudogenes (en las que se incluyen las secuencias de inserción) y 912 genes desconocidos. Cabe mencionar que 250 genes se encuentran involucrados en el metabolismo de ácidos grasos.<sup>17,20</sup>

Existen además ciertos genes que son requeridos para sobrevivir dentro del hospedero y evadir los mecanismos de defensa de éste.<sup>18</sup>

## MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

La patogenicidad se define como la capacidad que tiene un microorganismo para producir enfermedad, para lo cual se requiere una serie de factores, entre los que se encuentran aquéllos involucrados en la localización intracelular, en su supervivencia y multiplicación en macrófagos no sensibilizados en pacientes inmunocompetentes como es el caso de *M. tuberculosis*, hecho que permite catalogarla como la bacteria patógena más exitosa.<sup>19</sup> Puede penetrar al macrófago a través de fagocitosis inespecífica o a través de una serie de receptores bien definidos como FcC, CR1, CR2, CR3 y lectinas.<sup>19,20</sup>

FcC reconoce a la bacteria cubierta de inmunoglobulina G (IgG) que promueve la opsonización que induce la formación de pseudópodos y fagocitosis de la bacteria (fagocitosis tipo I). En tanto que CR3 reconoce a la bacteria cubierta de C3bi que facilita la introducción del microorganismo en la membrana del macrófago, sin formación de pseudópodos (fagocitosis tipo II). Aparte de estos dos procesos de penetración de este BAAR existe un tercer tipo de reconocimiento no opsónico mediado

por carbohidratos de superficie mediante un receptor de manosa.<sup>19</sup> Sin embargo, no debe descartarse que su fagocitosis puede ser por inducción a través de la participación del fosfatidil-inositol-manósidos que actúa como adhesinas que permiten la unión al macrófago.<sup>21</sup>

La capacidad del microorganismo para sobrevivir dentro del macrófago requiere la expresión de una serie de genes que se traducen en un grupo de proteínas involucradas en la relación hospedero-patógeno, entre ellas están las que participan en la envoltura y secreción celular como son los componentes de superficie, enzimas del metabolismo y las que participan en la captura de metales ( $\text{Fe}^0$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ), reguladores transcripcionales<sup>19,22</sup> como en la modulación de la respuesta inmune innata o en la inducción a la exportación de factores de virulencia.

A nivel de pared celular, *M. tuberculosis* tiene una aciltrehalosa que estimula la respuesta inflamatoria, induciendo actividades mediadas por citocinas (toxicidad sistémica y actividad antitumoral) y propiciando la fusión mediada por calcio y la migración de leucocitos.

*M. tuberculosis* productora de sulfátidos de trehalosa es altamente virulenta en el cobayo por su interferencia en la activación de los macrófagos al prevenir la maduración del fagosoma y su acidificación al evitar la fusión del fagolisosoma que favorece la supervivencia intracelular de los BAAR.

Entre los componentes que intervienen en el crecimiento intracelular, encontramos:

Protección por los glicolípidos contra formas tóxicas del oxígeno. La lipoarabinomana, que tiene actividades parecidas al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, genera la supresión inespecífica de la activación de linfocitos T, suprime la proliferación de células T, bloquea la transcripción del gene inducible del interferón gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) e inhibe las células presentadoras de antígenos. El muramil-dipéptido estimula el sistema inmunológico a través de la producción de citocinas.

La destrucción tisular producida por hipersensibilidad celular es inducida por los antígenos de *M. tuberculosis*. Actualmente, no se le ha encontrado ninguna endotoxina (LPS) semejante a la de las bacterias Gram negativas. Sin embargo, en su pared celular existen componentes involucrados en el daño al paciente como los ácidos micólicos, mureína y otros.

## PATOGÉNESIS

Su transmisión se produce casi exclusivamente por medio de pequeñas gotas de expectoración, provenientes de personas con tuberculosis pulmonar altamente bacilíferas como son los adultos, adolescentes y niños mayores

con lesiones abiertas.<sup>13,23</sup> Se calcula que de 10 a 15 personas son infectadas anualmente por un paciente no tratado.<sup>17,24</sup> Los núcleos expectorados de 1 a 5  $\mu\text{m}$  se consideran altamente infectantes, al encontrarse suspendidos en el aire durante cierto tiempo, éstos son inhalados por personas que se encuentran cerca del paciente tuberculoso, sobre todo en un ambiente poco ventilado y de convivencia prolongada, ya que cuanto mayor es el número de enfermos que estén expectorando BAAR en la comunidad, mayor será la diseminación de esta bacteria.<sup>8</sup> Se considera que de todas las personas infectadas por *M. tuberculosis*, una de cada diez enferman al alcanzar la cavidad alveolar y entre 80 y 85% de todos estos casos son de tipo pulmonar.<sup>25</sup> Existen otras puertas de entrada como es la digestiva, por la que alcanzarán los pulmones a través de la vía portocava o linfocava, llegando a la corriente venosa con retorno al lado derecho del corazón y circuito menor. Esto se realiza previamente al reconocimiento inmunológico del hospedador.

En el desarrollo de tuberculosis pulmonar se han descrito cinco fases o estadios.<sup>15,26</sup>

La primera se inicia con la llegada y afectación del microorganismo a los bronquiólos y alvéolos, en donde el bacilo es fagocitado por macrófagos no activados. Para lo cual, las interacciones iniciales con los receptores de superficie decidirán la suerte del microorganismo en los macrófagos,<sup>17</sup> ya que las interacciones con receptores para la región constante de las inmunoglobulinas y receptores parecidos a Toll estimulan los mecanismos de defensa del hospedero, en tanto que los receptores del complemento favorecen la supervivencia de *M. tuberculosis*.<sup>17</sup>

En una segunda fase o de simbiosis todos los bacilos habilitados desde el punto de vista genético se multiplican intracelularmente y de manera exponencial, inhibiendo la maduración del fagosoma, así como la fusión de éste con el lisosoma.<sup>17</sup> La bacteria en esta situación se encuentra capacitada para captar el hierro a través de dos tipos de compuestos de unión a éste descritos en micobacterias: las exoquelinas y micobactinas necesarias para su supervivencia intracelular y que compiten con su hospedero quien también lo emplea en sus funciones inmunomoduladoras.<sup>22</sup>

Al fagocitar a los bacilos liberados, los macrófagos inmaduros procedentes de la circulación establecen una simbiosis en la que no hay daño entre los participantes de este estadio de infección.

Durante este lapso (periodo primario) en un hospedero inmunocompetente se observa un proceso inflamatorio intenso que es fundamental para detener

el desarrollo del microorganismo.<sup>26</sup> Este ataque contra el bacilo de la tuberculosis es iniciado por los neutrófilos y más tarde por macrófagos alveolares que destruyen cerca de 50% de las micobacterias. El resto de los BAAR prosiguen a través de los linfáticos, ya sean solos o dentro de los macrófagos, alcanzando y proliferando en los ganglios linfáticos regionales, lo que ocasionará adenopatías características del periodo primario.

Es indudable que la relación que se establezca entre el patógeno y el hospedero dependerá de una serie de fenómenos microbiológicos e inmunológicos que se van dando, ya que en este momento la respuesta desarrollada por el hospedero es todavía inespecífica.<sup>17</sup> Sin embargo, esta situación dificulta la permanencia y proliferación de *M. tuberculosis* en el sistema circulatorio, lo que obliga a las micobacterias presentes en los macrófagos a focalizarse en los tejidos, pese a su estado de latencia o proliferación a formas evolutivas agudas.

Por lo general las micobacterias en estado de latencia permanecen viables y después de establecer el estado alérgico (tuberculino positivo) provocarán el foco histológico característico de la tuberculosis por la reacción positiva a la tuberculina, reacciones inflamatorias perifocales alrededor del foco del establecimiento bacteriano y necrosis caseosa en él o en los focos. Con lo que se inicia el periodo postprimario, de hipersensibilidad o tercer estadio que es consecuencia de la respuesta del hospedero, generando daño a sus tejidos. Proceso mediado por la hipersensibilidad de tipo tardío ante varios antígenos bacterianos que permite la destrucción de macrófagos no activados que contienen bacilos. Por otro lado, se presenta una activación de macrófagos por el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que estimula los mecanismos antibacterianos de estas células (intermediarios del oxígeno y del nitrógeno reactivos), a través de los cuales se elimina al bacilo; sin embargo, el macrófago no es capaz de realizar la erradicación total de *M. tuberculosis*.

Con el desarrollo de la respuesta inmune específica, así como con la acumulación de un gran número de macrófagos activados en el sitio de la lesión primaria se forma un granuloma (tubérculo), estructura típicamente bien organizada, constituida por linfocitos T, macrófagos activados, algunos de los cuales se fusionan para formar células gigantes multinucleadas.<sup>17,27,28</sup>

Inicialmente la respuesta que daña al hospedero es el único evento que puede detener al bacilo en su desarrollo intracelular a través de la destrucción de los macrófagos, en la que participan las células T citotóxicas así como la liberación de productos bacterianos parecidos a la tuberculina que desarrollan necrosis en el centro de la lesión (desintegración y destrucción del material central

del granuloma). Aunque la micobacteria puede sobrevivir en esta zona de necrosis caseosa sólida, al constituirse en una zona rica en nutrientes, se produce un ambiente anoxigénico con un pH bajo, presencia de ácidos grasos reducidos que inhiben la multiplicación bacteriana. Un ejemplo de estas lesiones caseosas sólidas se observan en el mal de Pott.

En el cuarto estadio entran en juego la hipersensibilidad y la inmunidad celular. En esta fase de resolución se genera una matriz alrededor del granuloma, formada por fibroblastos que impiden la diseminación de las micobacterias.<sup>28</sup>

En el paciente pediátrico o en el inmunosuprimido, *M. tuberculosis* escapa del centro caseoso y es fagocitada por macrófagos no sensibilizados, lo que le permite realizar su multiplicación intracelular y posteriormente por medio de la hipersensibilidad tardía, el macrófago es destruido, agrandándose la lesión. Es a través del drenaje linfático o hemático que la lesión se disemina a otros sitios, propiciando las siembras próximas o distales, las cuales siguen la misma evolución (repetición en cadena del fenómeno de Koch).

Al escapar el bacilo del centro caseoso en pacientes inmunocompetentes, éste es fagocitado y destruido por los macrófagos activados por la respuesta inmune celular. De esta manera, el tubérculo disminuye su centro caseoso y la enfermedad es interrumpida por un tiempo.

En el último estadio, aun cuando el hospedero tenga una buena respuesta inmune celular, la enfermedad progresa debido a la licuefacción del nódulo caseoso. Este material licuado es, aunque no siempre, un excelente medio de cultivo para *M. tuberculosis* que le permite multiplicarse en el ambiente extracelular, alcanzando un número elevado. Por otro lado, la liberación de grandes cantidades de BAAR y de sus productos incrementa la hipersensibilidad tardía, dañándose los tejidos cercanos a la lesión. Las paredes bronquiales necrosadas terminan por romperse, descargando el material caseoso y bacilos a las vías aéreas, así como a otros sitios, incluyendo al ambiente exterior, lo que propicia la formación de cavidades. Asimismo, el bacilo viaja a los nódulos linfáticos hiliares, diseminándose a otros sitios con alta tensión de oxígeno, lo que genera enfermedad en la que se ven afectados otros órganos inmediatamente después de la infección primaria.<sup>29</sup>

*M. tuberculosis* puede mantenerse viable, en estado de latencia haciendo uso de su acervo genético al detener su multiplicación y causar tuberculosis posteriormente, incluso décadas más tarde.<sup>29</sup>

El tubérculo puede también resolverse, desaparecer, calcificarse y formar el llamado complejo de Ghon.



## MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas en la tuberculosis son inespecíficas, tanto en su forma pulmonar como extrapulmonar. Se expresan por síntomas sistémicos similares, independientemente de la localización de la enfermedad y por síntomas de acuerdo con el órgano dañado, considerando que cualquier parte del cuerpo puede ser afectada.

En las diferentes modalidades de tuberculosis, la pulmonar constituye de 80 a 85% de los casos que se presentan en pacientes inmunocompetentes.

La tuberculosis se presenta en cuatro formas en el niño:<sup>11</sup>

- Complejo primario simple
- Primoinfección progresiva
- Tuberculosis postprimarias
- Tuberculosis de tipo adulto

El complejo primario o tuberculosis infantil se considera la forma más frecuente, benigna y menos contagiosa de este padecimiento por estar constituida por lesiones cerradas que cursan de manera asintomática o poco expresiva.<sup>13</sup> Se manifiesta como consecuencia del daño del órgano afectado, ya que *M. tuberculosis* se disemina por todo el organismo. Entre las manifestaciones sistémicas se encuentra: pérdida de peso, anorexia, febrícula, sudores nocturnos, cansancio físico y dolores de tórax.<sup>30</sup>

De acuerdo con su localización la pulmonar es la más frecuente. La sintomatología de la tuberculosis primaria es inespecífica, los síntomas más característicos son: tos seca, irritativa y expectoración persistente por más de dos semanas. Las personas con estos síntomas son referidos como sintomáticos respiratorios (SR).<sup>11</sup> A la exploración física, los datos encontrados son inespecíficos y poco significativos en las formas leves y moderadas que en estadios de exposición y tuberculosis latente no existen.<sup>31</sup> La bibliografía médica reporta la presencia poco frecuente de eritema nodoso o conjuntivitis flictenular como únicos signos en niños recién infectados con *M. tuberculosis*.<sup>31,32</sup>

En lactantes y adolescentes las manifestaciones pulmonares tienen mayor expresividad clínica que en niños escolares. A la exploración física se observa disminución de ruidos respiratorios, estertores o sibilancias. En pacientes con afectación traqueal hay estridor.

Primoinfección progresiva. De inicio insidioso, con intervalo de semanas, presencia de hepatoesplenomegalia, linfadenopatías generalizadas y afectación de diferentes órganos. Ésta se presenta entre 5 y 10%, el resto se cura espontáneamente. Su diseminación se realiza por ex-

tensión a partir del foco primario, por compromiso de ganglios linfáticos y por diseminación linfohematógena, con lo que se propicia una diseminación miliar. En niños pequeños con historia de tos y signos de distrés respiratorio debe considerarse la posibilidad de tuberculosis miliar en la que, dependiendo de la forma de tuberculosis, se observa presencia de estridor y sibilancias en casos de adenopatías mediastínicas y granuloma endobronquial.<sup>30</sup> Dolor persistente en punta de costado que se incrementa con la respiración profunda, con o sin fiebre en derrame pleural, común en niños mayores.<sup>4</sup>

Entre 30 y 50% de los niños con tuberculosis miliar puede producirse meningitis. Es posible la presencia de sinovitis de una articulación grande o rara vez pequeña (artritis). Cifosis progresiva o dolor de espalda con o sin afectación de nervios periféricos, espondilitis.<sup>31</sup>

Dolor abdominal o franca peritonitis (tuberculosis abdominal). Hematuria o piuria estéril (tuberculosis renal y de vías urinarias). Abscesos o úlceras cutáneas.

Signos de hipersensibilidad tuberculínica como eritema nodoso o conjuntivitis flictenular.<sup>32</sup>

Tuberculosis postprimaria. En niños pequeños la tuberculosis puede resultar en consolidación y cavitación del lóbulo pulmonar superior, parecido al observado en niños mayores, convirtiéndose en pacientes altamente infecciosos.<sup>33</sup>

Tuberculosis de tipo adulto. Ésta se presenta con mayor frecuencia en los adolescentes, generalmente como una reactivación endógena o una reinfección.

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de tuberculosis es considerado difícil de establecer si se compara con el de cualquier infección ocasionada por otra bacteria, sobre todo cuando se está ante un paciente pediátrico paucibacilar, asintomático o un paciente con tuberculosis en estado de latencia.<sup>34</sup> Por otra parte, la tuberculosis requiere un diagnóstico seguro y rápido, con miras a realizar el control de este proceso infectocontagioso, ya que la carencia de un diagnóstico en pacientes con estas características representa un obstáculo que dificulta el control de la tuberculosis.<sup>35,36</sup>

Generalmente el diagnóstico de tuberculosis se basa en la historia clínica, la sintomatología, prueba de la tuberculina, radiografía de tórax, baciloscopia y cultivo del agente causal.<sup>37</sup> Sin embargo, su sensibilidad y especificidad son bajas o se carece de ambas, lo cual dificulta el diagnóstico de tuberculosis en estos pacientes paucibacilares.

Entre los procedimientos tradicionales más rápidos para establecer evidencias de infección por *M. tubercu-*

losis se encuentra la observación microscópica de frotis teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen o su variante (Kinyoun), empleada en la detección de BAAR a partir de muestras clínicas,<sup>38,39</sup> la cual en niños tiene una sensibilidad < 10-15%, sobre todo en zonas endémicas, así como el uso de la tinción fluorocrómica de auramina-rodamina o auramina-o de manera simultánea al Ziehl-Neelsen, lo que tiende a facilitar la detección de *M. tuberculosis*.

La baciloscopia ha sido considerada la piedra angular en el control de la tuberculosis, es rápida y económica, pero de especificidad limitada, con un reducido alcance de observación y requiere de 5,000 a 10,000 BAAR/mL de muestra.<sup>38</sup> Este procedimiento detecta principalmente pacientes bacilíferos.<sup>38</sup>

Ante la sospecha de tuberculosis por baciloscopias positivas al cultivar la muestra, es necesario demostrar la presencia del agente causal de la tuberculosis a través de su aislamiento y desarrollo. Procedimiento considerado el estándar de oro que permite realizar la confirmación de certeza. Las ventajas de este procedimiento son: que cuenta con mayor sensibilidad y especificidad que la baciloscopia, ya que requiere de 500 a 1,000 bacilos/mL de muestra, es útil en pacientes paucibacilares y en el control de tratamiento antifímico.<sup>8</sup> Su desventaja es que requiere mayor tiempo para la obtención de resultados por el crecimiento extremadamente lento de la micobacteria.

En el aislamiento primario a partir de la muestra clínica se prefiere el empleo de un medio sólido en combinación con uno líquido no selectivo.

Entre los medios de cultivo más empleados se encuentran los considerados tradicionales: Lowenstein-Jensen y Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 se desarrollan entre tres y cuatro semanas, con sensibilidad de 30 a 40% y elevada especificidad.

En la década de los 80 se introdujeron sistemas de cultivo semiautomatizados y posteriormente automatizados que son más sensibles (< 50%) que los medios sólidos y permiten la obtención de evidencias de desarrollo bacteriano en menor tiempo (2-3 semanas).<sup>37,38</sup> Éstos inicialmente portaban un sistema de detección radiométrico (<sup>14</sup>C-palmitato como única fuente de carbono), que fue sustituido posteriormente con mayor ventaja por sistemas no radiométricos que facilitaron su manejo.<sup>37</sup> Entre ellos se encuentran los medios MB/BacT, BACTER 9000 y MGTI (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*). En los que se determina la producción de CO<sub>2</sub>, consumo de oxígeno o bien aumento de presión. Estos medios se han usado en la determinación de desarrollo y/o sensibilidad a antimicrobianos, con empleo de fluorescencia o colorimetría. Pueden utilizarse de manera manual y usar simultáneamente el medio sólido (LJ) que permite

observar las características morfológicas de las colonias y maximizar la recuperación de las micobacterias.

Entre los sistemas automatizados se cuenta con:

El Sistema automatizado MGIT 960 en medio líquido con empleo de antimicrobianos; estreptomycin, isoniazida, rifampicina y etambutol con un tiempo medio de detección de 14.4 días. Otros sistemas automatizados son BacT/ALERT MP, Bactec 460 con un tiempo de detección de 15.2 días para el último.<sup>38,40</sup>

Ante la situación económica que implica el empleo de los sistemas automatizados, se han propuesto métodos no convencionales, no moleculares para el cultivo y la determinación de sensibilidad a antimicrobianos, entre ellos se cuenta con un grupo de métodos que tratan de optimizar el empleo del microscopio como la prueba rápida de MODS (*microscopic observation drug susceptibility assay*) que se realiza directamente del esputo.<sup>39,41</sup> Este método se basa en el uso de caldo Middlebrook 7H10 en placas de microtitulación y antimicrobianos a diferentes concentraciones. El método MODS permite la observación del desarrollo bacteriano, de la presencia o ausencia de formación de cordones (agrupación bacteriana) y determina la sensibilidad antimicrobiana a diferentes concentraciones del agente probado. Cabe mencionar que su realización requiere un laboratorio con infraestructura adecuada y contar con un grupo de trabajo preparado. El método no ha sido estandarizado hasta la fecha, por lo que se considera que está limitado a laboratorios con experiencia en el manejo de *M. tuberculosis*.<sup>24,39,42</sup>

Un procedimiento más reciente que permite optimizar el microscopio en la detección de micobacterias con la seguridad de un frote, es LED (*Light-Emitting Diode Microscopy*). Con este sistema las muestras son procesadas de igual manera que en la observación con un microscopio óptico, con la diferencia de que son examinadas con LED, siendo igual de sensible al microscopio de fluorescencia convencional y tiene la ventaja de ser económico, aunque inicialmente implica una inversión.<sup>25</sup>

TLA (*thin-layer agar*). Considerado un cultivo rápido para *M. tuberculosis*. Requiere una solución stock de trimetoprim, anfotericina B y sal sódica de piperazina. Solución de ácido p-nitro benzoico (PNB) en medio de Middlebrook 7-H11 agar y en Middlebrook 7-H11+PNB en placas de petri divididas en dos compartimentos. Requiere de 10 a 100 BAAR para tener un cultivo positivo. El empleo del medio sólido permite detectar el crecimiento bacteriano y la morfología colonial en un periodo de 9-14 días con el uso del microscopio convencional con obje-

tivo de 10x. Procedimiento económico, rápido y puede implementarse en laboratorios con escasos recursos.<sup>43,44</sup>

NRA (*nitrate reductase assay*) también conocido como método de Griess. Permite detectar crecimiento y farmacorresistencia a isoniazida y rifampicina. La técnica es de tipo colorimétrico y está basada en la determinación de reducción de nitratos a nitritos por *M. tuberculosis* en medio de LJ. Se emplea en la detección del crecimiento y su interpretación se efectúa por inspección visual (coloración) y evidencia de desarrollo bacteriano. Es rápido, confiable, sencillo y económico. Sus desventajas son: se requieren muestras positivas, no es cuantitativo y se contamina fácilmente.

*Colorimetric assays*. Procedimiento empleado en la detección de resistencia de *M. tuberculosis* a través de la conversión del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro, de color amarillo a color púrpura. El desarrollo de *M. tuberculosis* se detecta por el cambio de color, ya sea visualmente o con ayuda de un espectrofotómetro. Se emplea en la determinación de resistencia a isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomycin. Sus requerimientos son escasos, sin embargo no ha sido estandarizado.<sup>39</sup>

*Phage amplification-assays*. Procedimiento basado en la formación de placas de lisis producidas por un bacteriófago sobre *M. tuberculosis*, sembrada en medio de cultivo sólido con concentraciones decrecientes del antibiótico a probar.

Un producto comercializado de este tipo de prueba lo constituye FASTPlaqueTB Assay, por el cual se determina no sólo la presencia de *M. tuberculosis* viables, sino además resistencia a rifampicina, requiere de 100 a 300 células/mL. En éste, el principio de detección se hace con el empleo de luminometría o fotografía producida por presencia de luciferasa que porta el virus localizado intracelularmente en la micobacteria.<sup>42,45</sup>

Mientras que la baciloscopia y el cultivo son la parte medular del laboratorio en el diagnóstico de tuberculosis, los nuevos métodos que incluyen los moleculares han evolucionado en los últimos 30 años.<sup>18</sup>

## MÉTODOS MOLECULARES

*Line probe assays* (INNO-LIPA-RIF-TB). Método con alta sensibilidad (95%) y especificidad (100%). No obstante, estas dos características disminuyen al realizar la prueba directamente con muestras clínicas. Su fundamento se basa en el empleo de 10 sondas de oligonucleótidos (una específica para el complejo *M. tuberculosis*, cinco sondas S de tipo silvestre y cuatro sondas R para detectar mutaciones involucradas en la resistencia a rifampicina)

inmovilizadas en nitrocelulosa. El procedimiento se efectúa a través de la extracción directa de la muestra o del cultivo del ADN, la amplificación por PCR del gene que determina la resistencia a rifampicina (*rpoB*) y cuyos productos son hibridados con las sondas inmovilizadas. Esta prueba es de utilidad en la detección de poblaciones de pacientes sospechosos de presentar resistencia a antimicrobianos.<sup>39,46,47</sup>

Una segunda prueba tipo *line-probe assay* es Genotype MTBDRplus assay. Reporta una sensibilidad aproximada de 94% para la detección de ADN en frottes positivos de muestras clínicas de vías respiratorias para *M. tuberculosis*. Actualmente existe una segunda versión de MTBDRplus assay que es MTBDRs/ empleada en la determinación de resistencia a antifímicos de segunda línea.<sup>39</sup>

Xpert MTB/RIF. Prueba rápida para la detección de *M. tuberculosis* y resistencia a rifampicina. La prueba emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la modalidad de multiplex o PCR anidado en tiempo real. Como sonda se usan cadenas únicas de ADN con presencia de estructura de tallo y horquilla (*stem and loop*), en el que la horquilla sirve para hibridación o alineamiento, siendo complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*, lo que se busca en este caso es el *core* del gene *rpoB*. Este gene es altamente conservado, permite su amplificación con el fin de detectar resistencia a rifampicina en mutantes de *M. tuberculosis* en 95% de los casos.<sup>39</sup>

*Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Técnica que no requiere termociclador debido a que la reacción es isotérmica, es rápida (60 minutos), con alto rendimiento en la amplificación y el producto puede ser detectado a simple vista. Al ser comparada con la PCR presenta la misma sensibilidad de detección. Esta prueba es simple, rápida, altamente eficiente, efectiva y de costo accesible.<sup>39</sup>

Señales luminosas moleculares (*molecular beacons*). Esta prueba se encuentra entre las consideradas rápidas en la detección de resistencia a rifampicina, con una sensibilidad de 89 a 98% y especificidad de 99 a 100%. Sin embargo, su empleo en la determinación de resistencia a isoniazida es menor debido a las múltiples mutaciones que pueden conducir a resistencia a este antifímico. Su fundamento radica en el empleo de sondas de ADN (*hair-pin-shaped DNA*) con un marcador fluorescente y el uso de PCR en tiempo real.<sup>42</sup>

PCR casero. La amplificación de ácidos nucleicos con blancos específicos como la secuencia de inserción 6110 (IS6110), presente en número variable de copias en *M. tuberculosis*.<sup>48</sup> Esta metodología puede ser aplicada directamente a partir de la muestra clínica, por lo que ha recibido el nombre de pruebas de amplificación directa.<sup>46</sup>

Por lo general ésta se aplica simultáneamente con la baciloscopia y el cultivo de la muestra clínica o bien a partir del cultivo.<sup>39</sup>

## PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

Desde hace varias décadas se ha realizado la detección de antígenos (Ag), anticuerpos (Ac) y complejos antígenos-anticuerpos (Ag-Ac) en pacientes con *M. tuberculosis*, a fin de detectar respuesta inmune humoral.

A pesar de las evidencias de carecer de seguridad para reemplazar el frote y el cultivo, éstos continúan usándose. Entre las explicaciones para este hecho en tuberculosis se encuentra la exposición al agente causal u otras micobacterias, del paso del estado de latencia a la enfermedad activa y la forma severa de tuberculosis. Aunado a esto, hay otros factores como la aplicación de la vacuna con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y la coinfección VIH.

Como lo refieren Pai y cols. una prueba inmunogénica correcta debe distinguir entre los diferentes estadios de la tuberculosis, la exposición a *M. tuberculosis* y micobacterias distintas.<sup>49</sup> El sistema inmunológico deberá distinguir los antígenos que codifican los diferentes genes que se expresan durante las distintas fases de la enfermedad. Un ejemplo de ello es el antígeno MPB64 específico del complejo *M. tuberculosis*, secretado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis*-BCG. Este Ag es capaz de inducir una respuesta en pacientes con tuberculosis activa, mas no en la forma latente, con una sensibilidad de 98% y especificidad de 100%. Una variante de éste es la prueba del parche con el empleo de un recombinante (rMPT64).<sup>42</sup>

Durante décadas se usó el derivado proteico purificado (PPD) como antígeno para diagnosticar tuberculosis latente. Sin embargo, dicho derivado presenta baja especificidad en poblaciones vacunadas con BCG y en aquéllas expuestas a micobacterias no tuberculosas (MNT), además su sensibilidad disminuye en sujetos inmunodeprimidos. Una alternativa a esta situación se ha presentado gracias al empleo de la respuesta inmune celular por medio de la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) generada por linfocitos T sensibilizados con Ag de *M. tuberculosis* (PPD). La producción elevada de IFN- $\gamma$  supone infección por *M. tuberculosis*.<sup>49</sup>

Hay nuevas pruebas que utilizan como Ag estimulante ESAT6 (*early secretory antigenic*) y CEP10 (*culture filtrate protein 10*), proteínas codificadas por genes localizados en la región diferente 1 (RD1) de *M. tuberculosis*.<sup>49</sup>

Entre las pruebas comercializadas están QuantiFERON-TB en la que se emplea el método de ELISA y sangre total, los resultados se expresan en picogramos por milili-

tro (pg/mL) o en unidades internacionales por mililitro (UI/mL). Otra variante en la detección de IFN- $\gamma$  es T-SPOT-TB que usa células mononucleares de sangre periférica, los Ags ESAT6 y CEP10 y en su detección se emplea ELISPOT. Los resultados se dan en número de células secretoras de IFN- $\gamma$  o células formadoras de spot.<sup>42,49</sup>

## CONCLUSIONES

A partir de que la OMS declaró la tuberculosis como una emergencia en salud pública a nivel mundial en 1993 y hasta la fecha, ha surgido la necesidad de contar con pruebas de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad, que sean reproducibles y de costo accesible, sobre todo en las zonas más afectadas que incluyen aquéllas que se encuentran en condiciones económicas limitadas para poder hacer uso de ellas.<sup>10</sup> Sin embargo, el problema no es sólo de diagnóstico sino que es multifactorial (*millenium development goals*), por lo que resolver los factores que propician la presencia de tuberculosis y el conocimiento de su etiología desde diferentes ángulos, llevará a su control.

## REFERENCIAS

1. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR Jr, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready. *J Clin Microbiol.* 1993; 31 (4): 767-770.
2. Lemassu A, Ortalo-Magné A, Bardou F, Silve G, Laneéle MA, Daffé M. Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology.* 1996; 142: 1513-1520.
3. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006; 100: 1862-1870.
4. Cruz-Anleu ID, Velásquez-Serrato JR. Tuberculosis infantil. ¿Cómo diagnosticarla? *Arch Argent Pediatr.* 2012; 110 (2): 144-151.
5. Sudre P, ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull World Health Organ.* 1992; 70 (2): 149-159.
6. Schaaf SH, Geldenduys A, Gie RP, Cotton MF. Culture-positive tuberculosis in human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatr Infect Dis.* 1998; 17: 599-604.
7. Chin PD, Crane CM, Diul MY, Sum SJ, Agraz R, Taylor S et al. Spread of *Mycobacterium tuberculosis* in a community implementing recommended elements of tuberculosis control. *JAMA.* 2000; 283: 2968-2974.
8. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: normas y guía técnica. Parte I. Baciloscopia. OPS; 2008.
9. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG et al. The growing burden of tuberculosis. *Arch Intern Med.* 2003; 163: 1009-1021.
10. Global tuberculosis report 2014. France: World Health Organization; 2014.
11. Farga V, Caminero JA. Tuberculosis. 3a ed. Santiago de Chile: Publicaciones Mediterráneo; 2012.
12. Riechman LB. Defending the public's health against tuberculosis. *JAMA.* 1997; 278: 865-867.
13. Marks J. Notes on the ziehl-neelsen staining of sputum. *Tubercle.* 1974; 55: 241-244.



14. McNeil MR, Besra CS, Brennan PJ. Chemistry of the mycobacterial cell wall. In: Rom WM, Garay SM (Ed). *Tuberculosis*. Boston: Little, Brown and Company; 1993. pp. 171-185.
15. Dannenberg AM. Pathophysiology: basic aspect. In: Schlossberg D (Ed). *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections*. 4th edition. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 1999. pp. 17-47.
16. Cernoch PL, Enns PK, Saubolle MA, Wallace Jr RL. Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. *Cumitech 16*: ASM Press; 1994.
17. Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2001; 1: 20-30.
18. Cho SN, Brennan PJ. Tuberculosis: diagnostics. *Tuberculosis*. 2007; 87: S14-S17.
19. Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, Av-Gay Y. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Rev*. 2015; 264: 220-232.
20. Gorocica P, Jiménez-Martínez MC, Garfías Y, Sada I, Lascrain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2005; 18: 142-153.
21. Vergne I, Daffé M. Interaction of mycobacterial glycolipids with host cell. *Front Biosci*. 1998; 3: 865-876.
22. González-Ruiz C, Reyes-Cortés R. Capítulo 10. Transportando hierro a través de la superficie bacteriana. En: De la Garza-Amaya M, Vaca-Pacheco S (editores). *La lucha por el hierro patógenos vs hospedero*. México, D.F.: Cinvestav; 2010.
23. Starke JR. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to and from children and adolescents. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2001; 12: 115-123.
24. Arnez-Durán RA, Ayllón-Anzaldo LA, Castro-Soto R, Lozano-Beltrán D. El método MODS, una alternativa para el diagnóstico de la tuberculosis y la detección de cepas multirresistentes. *Rev Cient Med*. 2010; 13 (2): 81.
25. Law SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011; 378: 57-72.
26. Maulén NP. Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Med Chile*. 2011; 139: 1605-1610.
27. Cardona PJ, Ausina V. Histopatología de la tuberculosis. Aproximación de la evolución de las lesiones pulmonares en modelos experimentales inducidos mediante aerosol. *Arch Bronconeumol*. 2000; 36: 645-650.
28. Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol*. 2004; 113: 130-136.
29. Ehrt S, Rhee K, Schnappinger D. Mycobacterial genes essential for the pathogen's survival in the host. *Immunol Rev*. 2015; 264: 319-326.
30. Marais BJ, Gie RP, Obihara CC, Hesseling AC, Schaaf HS, Beyers N. Well defined symptoms are of value in the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis. *Arch Dis Child*. 2005; 90: 1162-1165.
31. Moreno-Pérez D, Martín AA, Gómez NA, Baquero-Artigao F et al. Diagnóstico de la tuberculosis en la edad pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SENPI). *An Pediatr (Barc)*. 2010; 73 (3): 143e1-143e14.
32. Guidance for National Tuberculosis Programmes on the management of tuberculosis in children. WHO/TB/2006.371.
33. Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann. Pediatric tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8: 498-510.
34. García GR, Lara HA, Nájera GMC, Arzate BP. Detección de *Mycobacterium tuberculosis*, con el empleo de dos sistemas de cultivo y su confirmación con la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Enf Infec Ped*. 1999; 12: 323-328.
35. Saltini C. Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. *Respir Med*. 2006; 100: 2085-2097.
36. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000; 356: 1099-1104.
37. Lighter J, Rigaud M. Diagnosing childhood tuberculosis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2009; 39: 61-88.
38. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3 (3): 141-147.
39. Wilson MD. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and drug susceptibility testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137: 812-819.
40. Agudelo CA, Builes NL, Hernández M, Robledo J. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. *Iatreia*. 2008; 21: 321-332.
41. Moore DAJ, Evans CAW, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A et al. Microscopic-observation drug susceptibility assays for the diagnosis of TB. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1539-1550.
42. Pai M, Kalanteri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006; 6: 423-432.
43. Minion J, Leung E, Menzies D, Pai M. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10: 688-698.
44. Martin A, Palomino JC. Procedure manual. Thin layer agar (TLA) microcolony detection. Antwerp, Belgium: Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit; 2009.
45. Kalantri S, Pai M, Pascopella L, Riley L, Reingold A. Bacteriophage based test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2005; 5: 59.
46. Nahid P, Pai M, Hopewell PC. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3: 103-110.
47. Carvalho WS, Miranda SS, Pesquero JL, Gomes MA. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 43: 31-36.
48. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18 (1): 188.
49. Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon  $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4: 761-776.