

Epidemiología molecular de infecciones por micobacterias en pacientes del Hospital Regional 1° de Octubre

RESUMEN

En este trabajo se comentan varios aspectos acerca de la tuberculosis y se analizan los resultados de muestras remitidas por el Departamento de Epidemiología al Servicio de Medicina Genómica para integrar diagnósticos de probable infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En el periodo comprendido de diciembre de 2012 a agosto de 2013, se analizaron 89 muestras de las cuales obtuvimos una identificación positiva en 24 de ellas, 22 fueron positivas a *M. tuberculosis* y 2 a *M. abscessus*. De acuerdo con el origen de las muestras la distribución de probable tuberculosis pulmonar fue de 54.4%; el resto correspondió a tuberculosis extrapulmonar, incluyendo 2 casos de meningitis tuberculosa infantil.

Palabras clave: epidemiología molecular, micobacteria.

Molecular epidemiology of infections by *Mycobacteria* in patients from Hospital Regional 1° de Octubre

ABSTRACT

In this work we discuss several current topics about tuberculosis and analyze the isolation results in the samples provided by the epidemiology department and processed at the genomic medicine laboratory of The Regional Hospital 1° de Octubre, in order to confirm the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. The samples were collected from December 2012 to August 2013. A total of 89 samples were analyzed, identification was performed in 24 samples, (22 positive for *Mycobacterium tuberculosis* and 2 positive for *Mycobacterium abscessus*). According to the sample source, we classify tuberculosis as pulmonary (54.4%) or extrapulmonary, including 2 cases of tuberculous meningoencephalitis in children.

Key words: Molecular epidemiology, *Mycobacterium*.

María del Rocío Thompson Bonilla¹
Gabina Calderón Rosete²
Hayde Nallely Moreno Sandoval³
José Luis Merino García⁴
Manuel Lara Lozano⁵
Celia Piña Leyva⁶
Guillermina Rosas Sandoval⁷
Sergio Israel Rangel Guerrero⁸
Esmeralda Morán Mendoza⁹
Jorge Rodríguez Gallegos¹⁰
Juana Salazar Salinas¹¹
Ricardo Núñez Ceballos¹²
Juan Antonio González Barrios¹³

¹⁻⁷⁻¹³ Doctor en Ciencias

²⁻³⁻⁵⁻⁶ Maestro en Ciencias

⁴⁻¹¹ Químico

¹² Epidemiólogo

⁸⁻⁹⁻¹⁰ Pasante de la carrera de Química

¹⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷⁻¹³ Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1° de Octubre.

² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina.

⁸ Facultad de Química, UNAM.

⁹⁻¹⁰ Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

³ Laboratorio de Virología, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

¹¹ Jefatura de Servicios de Vigilancia y Control Epidemiológico Dirección Médica ISSSTE.

¹² Depto. de Vigilancia y Control Epidemiológico, Dirección Médica, ISSSTE.

Recibido: octubre 2013

Aceptado: enero 2014

Correspondencia

Dr. Juan Antonio González Barrios
Hospital Regional 1o de Octubre
Avenida IPN No. 1669
Colonia Magdalena de las Salinas
CP. 07760 México, D.F.
Tel: 01 (55) 51415300 Ext. 16605
jantgonzalez@issste.gob.mx

Este artículo debe citarse como

Thompson Bonilla MR, Calderón Rosete G, Moreno Sandoval HN, Merino García JL, Lara Lozano M, Piña Leyva C. Epidemiología molecular de infecciones por micobacterias en pacientes del Hospital Regional 1° de Octubre. Rev Esp Med Quir 2014;19:80-87.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa que, de acuerdo con el reporte de la OMS de 2013, es la segunda causa de muerte originada por un agente infeccioso a escala mundial. En 2011, 8.7 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.4 millones murieron por esta causa.¹

La TB es una enfermedad transmisible causada por el bacilo de Koch o *Mycobacterium tuberculosis*, que generalmente ingresa al ser humano por vía respiratoria. Los datos clínicos de la enfermedad son tos, fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso. Estos síntomas pueden ser leves incluso durante meses, por lo que el paciente puede buscar atención médica hasta que la enfermedad se encuentra en un estadio avanzado, siendo este lapso de tiempo cuando existe mayor probabilidad de contagio para las personas con las que el enfermo se relaciona.²

En general, el foco primario del *Mycobacterium tuberculosis* es el tejido pulmonar, causando una lesión del lóbulo medio llamado foco de Ghon. El drenaje del foco de Ghon, a lo largo del sistema linfático, causa la formación de nódulos y su posterior drenaje a uno o más ganglios hiliares o mediastinales que conforman el denominado complejo primario de Ranke.² En general el paciente puede mejorar, sin embargo, la infección se mantiene latente durante años o puede alojarse en diferentes órganos hasta que se manifiesta cuando el paciente se encuentra en condiciones de inmunodepresión. Se considera que la incidencia de tuberculosis está estrechamente relacionada con factores socioeconómicos como: desnutrición, bajo nivel educativo, marginación, sistemas de salud insuficientes que condicionan un diagnóstico tardío y en ocasiones diagnósticos imprecisos que conllevan a tratamientos inespecíficos y efectuados por tiempo insuficiente; además, la existencia de cepas resistentes a los fármacos antifímicos condiciona un número importante de muertes por tuberculosis en el

mundo. En México hay estudios en los que se señala que la diferencia de género es un factor importante para el adecuado seguimiento del tratamiento.³ De las enfermedades asociadas con la tuberculosis (TB) se ha señalado a la diabetes mellitus con mayor frecuencia, VIH y alcoholismo. En nuestro país se han desplegado campañas intensivas de vacunación con el propósito de prevenir la incidencia de tuberculosis en la población mexicana. De acuerdo con el informe de la Secretaría de Salud en 2012⁴ la cobertura de la población con la vacuna del bacilo de Calmette y Guérin (BCG) se ha mantenido por arriba de 99%, mientras que la cobertura preliminar para el período de enero a junio de 2012 es de 99.7%.⁴ No obstante, la identificación de nuevos casos tanto de tuberculosis pulmonar como de tuberculosis extrapulmonar sigue en aumento a lo largo del país.

Institucionalmente, el diagnóstico de tuberculosis se realiza mediante el análisis microscópico del esputo con la tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR) y cultivo bacteriano (de Lowenstein-Jensen) aunque, actualmente, se puede disponer de técnicas que permiten diagnósticos más precisos y rápidos para confirmar el diagnóstico de infección por micobacterias. La enfermedad puede ser causada por micobacterias del complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* y *M. microti*)⁵ o no tuberculosis (*M. abscesus*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. Chelonae* y *M. fortuitum*), por lo que la genotipificación de estos microorganismos es esencial para el tratamiento específico de la especie.

Es por eso que a partir de la secuenciación completa del ADN genómico del *Mycobacterium tuberculosis*, descrita en junio de 1998 por Cole y sus colaboradores en la cepa H37Rv,⁶ se han desarrollado técnicas no moleculares (ensayo de susceptibilidad de observación directa, microscopia con diodo emisor de luz, prueba de coloración MDR-XDRTB, ensayos colorim-

métricos, ensayo de amplificación de fagos) y pruebas moleculares (ensayos de sonda en línea, prueba automatizada de amplificación de ácidos nucleicos, amplificación isotérmica mediada por asas, microarreglos de oligonucleótidos, PCR de punto final y PCR en tiempo real). Para utilizar estas técnicas se deben considerar sus ventajas y desventajas de acuerdo con las características de las muestras y de las condiciones del laboratorio que las realice. Las técnicas moleculares son útiles para efectuar diagnósticos precisos y rápidos, aunque para poder hacer uso de ellas se requiere de una infraestructura especializada, así como de personal calificado para efectuarlas.⁷

El Hospital Regional 1° de Octubre cuenta con el Laboratorio de Medicina Genómica, en el que se ha implementado el diagnóstico de TB con la técnica de biología molecular denominada *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR por sus siglas en inglés) en dos modalidades, PCR de punto final y PCR en tiempo real, ambas complementarias; lo que permite precisar si la muestra es positiva a micobacterias y determinar la especie.

En este trabajo hicimos el análisis del total de solicitudes de diagnóstico para TB, tanto pulmonar como extrapulmonar, que se han procesado en el laboratorio de medicina genómica durante el periodo comprendido entre diciembre de 2012 y agosto de 2013. Utilizamos la técnica de PCR en tiempo real para identificar muestras positivas a los integrantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y no tuberculosis, seguida de una PCR de punto final para identificar las especies (*M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. avium*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Medicina Genómica a partir de pacientes hos-

pitalizados en los diferentes servicios médicos del Hospital Regional 1° de Octubre, ISSSTE, cuando existía sospecha clínica y radiológica de tuberculosis. Todas las solicitudes de diagnóstico molecular debieron ser avaladas por el Servicio de Epidemiología que envió al laboratorio los estudios epidemiológicos correspondientes.

Tratamiento de las muestras

Extracción del ADN micobacteriano

Se recibieron diferentes tipos de muestra incluidas muestras de líquidos corporales (sangre total, orina, líquido cefalorraquídeo y secreciones). Todas las muestras fueron procesadas inmediatamente para obtener el ADN metagenómico. Para las muestras de esputo se requirió adicionar N-acetil-L-cisteína (Sigma-Aldrich A8199) para facilitar la homogenización de la muestra. La purificación del ADN se efectuó mediante la extracción por columna de gel de sílica utilizando el paquete RTP Phatogen KIT (Invitex 1040500300, Alemania). Brevemente: la muestra se centrifuga a 3,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos, se decanta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 400 µL de solución amortiguadora; se transfiere la muestra a un tubo de extracción (tubo L), se incuba secuencialmente durante 10 minutos a 37°, 65° y 95°C y, al final de la lisis por calor, se adicionan 400 µL de la solución de unión. Se mezcla con micropipeta 3-5 veces y en vortex durante 5 segundos. Se transfiere la muestra a la columna (Spin Filter), se incuba 1 minuto a temperatura ambiente (TA), se centrifuga a 10,000 rpm durante 1 minuto. Después se transfiere el total de la muestra a la columna previamente montada en un tubo RTA receptor nuevo y a continuación se adicionan, en el siguiente orden, 500 µL de la solución amortiguadora de lavado R1; se incuba a TA x 1 min, centrifugación a 10,000 rpm 1 minuto y se transfiere nuevamente la

columna a un tubo RTA receptor nuevo, se adicionan 700 µL del solución amortiguadora de lavado R2, se incuba nuevamente 1 min, se centrifuga a 10,000 rpm x 1 min y se transfiere la columna a un tubo RTA receptor nuevo y se centrifuga a 12,000 rpm x 4 min; se transfiere la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL (estéril) y se agrega a la columna 60 µL del solución amortiguadora de elusión R, precalentada a 80°C. Se incuba durante 1 minuto a TA, se centrifuga a 10,000 rpm x 1 min, se descarta la columna y el tubo con el eluyente se coloca directamente en hielo, de esta forma el metagenoma de la muestra está listo para ser utilizado en la reacción de PCR; se debe almacenar a -20°C hasta su utilización.

Diagnóstico molecular

PCR en tiempo real

Para identificar el complejo *M. tuberculosis* se efectuó PCR en tiempo real con el sistema Anyplex Plus MTB/NTM (Seegene, Corea). El producto amplificado se detectó por monitoreo de fluorescencia en un termociclador de PCR de tiempo real modelo CFX96 (Bio-Rad, Nusloch Alemania) bajo el protocolo estándar de termociclado (Cuadro 1A).

PCR de punto final

En caso de identificar el complejo del gen para *Mycobacterium* se efectuó PCR de punto final para la identificación diferencial de las siguientes cepas: *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. bovis*, *M. avium* y *M. intracellulare* con oligonucleótidos específicos⁵ para la identificación de la especie infectante (Cuadro 2). Con protocolos de termociclado específicos para cada especie (Cuadro 1B) utilizamos un termociclador GeneAmp PCR System 9700 Gold (Applied Biosystems).

Cuadro 1. A) Programa de termociclado para PCR en tiempo real. **B)** Programa de termociclado para PCR de punto final

A			
Segmento	No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	50° C	5 min
2	1	95° C	15 min
3	45	95° C	30 s
		60° C	1 min

B			
Segmento	No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95° C	3 min
2	36	95° C	30 s
		55° C	1 min
		72° C	2 min
3	1	72° C	5 min
		4°	∞

Electroforesis

La reacción de PCR de punto final se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa a 2% (Invitrogen Núm. de catalogo 15510-019) en solución amortiguadora TAE 1X (Tris base a 40 mM, EDTA 1 mM y ácido acético 20 mM, pH 7.5). El patrón de corrimiento electroforético se evidencia mediante la base intercalar bromuro de etidio. La electroforesis se realiza en una cámara de electroforesis de tipo electromagnética Horizon 58 (Biometra, Alemania) bajo los siguientes parámetros: 70 Volts durante 50 minutos. El patrón de corrimiento electroforético fue revelado mediante luz ultravioleta en un fotodocumentador Gel Logistic 3000 (Kodak, Nusloch Alemania); se fotodocumentó la imagen en formato *.bip y se analizó con el programa Molecular Imaging (Kodak, Nusloch Alemania).

RESULTADOS

En el período comprendido entre diciembre de 2012 y agosto de 2013, en el Servicio de Medicina Genómica, se han atendido 89 solicitudes de diagnóstico molecular de tuberculosis. Esta

Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y de cada una de las especies que es posible diagnosticar tomando como referencia el tamaño del amplicón identificado en pares de bases (pb).⁵

Oligonucleótido	Secuencia	Amplicón (pb)	Género y especie
MTB-F	CGGGTATGCTGTTAGGCGACG	488	Complejo
MTB-R	CCACCACAAGACATGCATG		<i>M. tuberculosis</i>
RAC-1	TCGATGATCACCGAGAACGTGTTC	934	Todas las especies
RAC-8	CACTGGTGCCTCCCGTAGG	407	<i>M. gordonae</i>
		1100	<i>M. fortuitum</i>
		1200	<i>M. chelonae</i>
		1300	<i>M. abscessus</i>
Y277-32F	ACATGTACGAGAGACGGCATGAG	1031	Todas las especies del complejo
Y277-32R	AATCCAACACGCAGCAACCAG		<i>M. tuberculosis</i> excepto <i>M. bovis</i> .
G1	CCCTACGCAGACTGACAGCAA	407	<i>Mycobacterium gordonae</i>
G3	AGCCACCGACGAACCCC		
RAC-8	CACTGGTGCCTCCCGTAGG	176	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
Mycint-F	CCTTAGGCGCATGTCTTTA		
RAC-1	TCGATGATCACCGAGAACGTGTTC	900	<i>Mycobacterium avium</i>
Mycav-R	ACCAGAAGACATGCGTCTTG		

prueba se utiliza junto con otros estudios para confirmar o descartar el diagnóstico de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar.

En este trabajo se analizaron las 89 muestras y en 65 de ellas no se logró identificar ADN del bacilo, emitiéndose un diagnóstico negativo (Figura 1A). En 24 muestras se logró un diagnóstico molecular positivo para bacilos tuberculosos miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 1A). La distribución de la enfermedad por sexo en los casos positivos fue de 11 femeninos y 13 masculinos. La distribución de los casos positivos de acuerdo con el origen de la muestra fue predominantemente para el esputo (Figura 1B). La mayor proporción de casos (n = 12) correspondió a *Mycobacterium tuberculosis*. En segundo lugar, con tres casos positivos, estuvieron las muestras de líquido cefalorraquídeo; entre estos casos se corroboraron 2 pacientes con diagnóstico de meningoencefalitis tuberculosa infantil. En tercer lugar, dos casos en muestras de orina y de sangre. Los otros cuatro casos fueron únicos para biopsia de hígado, líquido de ascitis, líquido pericárdico y tejido óseo (Figura 1B).

En todos los casos positivos se efectuó PCR de punto final para determinar la especie; en 22 casos se identificó *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 2A) y sólo hubo dos casos positivos para *Mycobacterium abscessus*, identificados en una muestra de líquido de ascitis y una de esputo, por PCR de punto final (Figura 2B). Todos los resultados obtenidos se reportaron al servicio de epidemiología del hospital en un máximo de 72 horas después de recibida la muestra. Los resultados se obtuvieron empleando dos técnicas de biología molecular como se muestra en las figuras 2A (PCR en tiempo real) y 2B (PCR de punto final).

DISCUSIÓN

El incremento en la incidencia de la tuberculosis (TB) a escala mundial presenta un panorama complejo y multicausal. Recientemente se ha establecido que la susceptibilidad para infectarse y la manifestación clínica de la enfermedad tienen importantes componentes genéticos, incluso se ha descubierto que la mutación del gen IRF8 está asociada con dos formas de inmunodeficiencia primaria que se asocian con susceptibilidad a

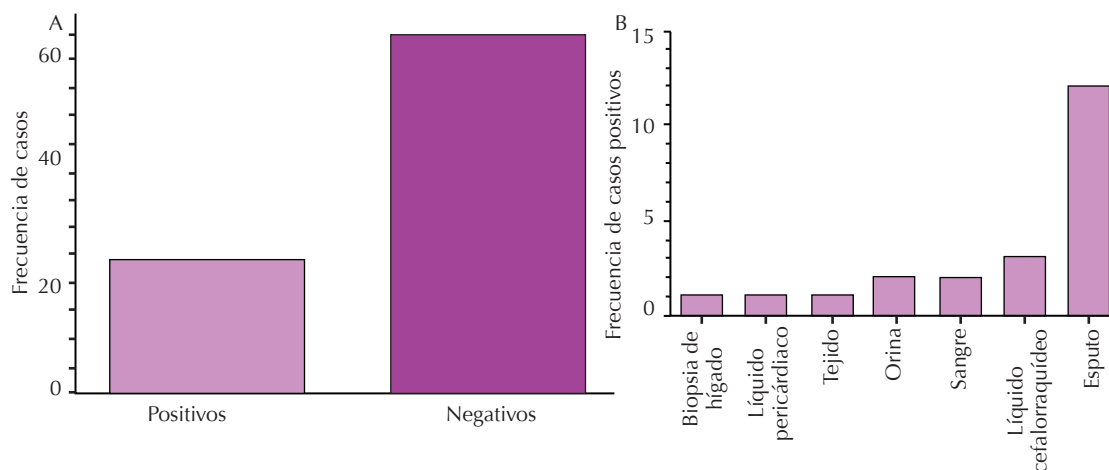


Figura 1. Muestras analizadas. **A)** Total de muestras analizadas del mes de diciembre de 2012 al mes de agosto del 2013 (n = 89). Se muestra el número de casos positivos al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (n = 24) y los negativos (n = 65). **B)** Se muestra la distribución de los casos positivos a *M. tuberculosis* de acuerdo con el origen de las muestras analizadas, así como el número de casos en que las muestras fueron positivas para esos sitios.

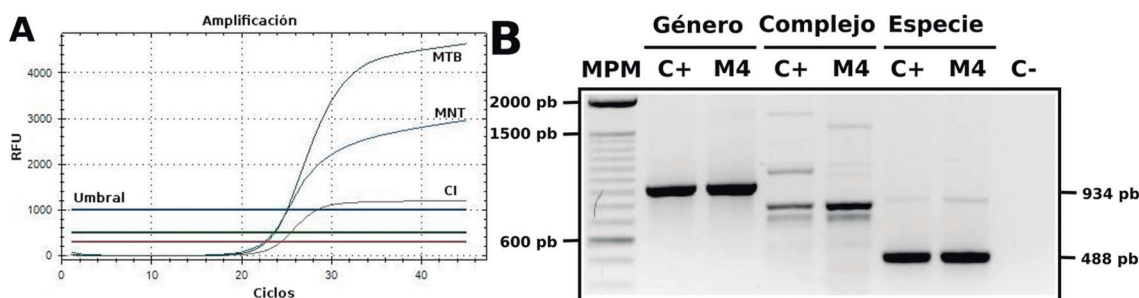


Figura 2. Técnicas de PCR utilizadas para el diagnóstico molecular de la tuberculosis. **A)** Se muestra una gráfica representativa de un caso de identificación positiva de *Mycobacterium tuberculosis* obtenida por PCR en tiempo real. En las abscisas se muestra el número de ciclos y en las ordenadas las unidades de fluorescencia de referencia. La curva superior corresponde a la amplificación obtenida de la muestra proveniente de un paciente y las dos curvas inferiores corresponden a un control negativo y a un control interno. **B)** Gel de agarosa donde se analiza el resultado de reacciones de PCR de punto final para identificación de género y especie; el primer carril corresponde a marcador de peso molecular (MPM); C+ (control positivo) y C- (control negativo).

micobacterias.⁸ El incremento en casos de VIH y el hecho de que se haya detectado una mayor susceptibilidad a la coinfección con TB es probablemente una de las causas de incremento de los casos registrados mundialmente, además

de indicios de algunas otras coinfecciones reportadas con enfermedades parasitarias en zonas del mundo en que ciertas parasitosis son endémicas.⁹ Existe la probabilidad de que las estadísticas reportadas estén subvaluadas pues

según reportes del programa de estrategias para detener la tuberculosis (*World Health Organization*) existen casos de muerte relacionadas con TB en niños infectados con VIH que son clasificadas como muertes por VIH, al igual que casos de neumonías severas o malnutrición que podrían ser casos de tuberculosis no reconocidos.¹⁰ En México hay indicios de que la coinfección es igualmente frecuente en pacientes con diabetes mellitus y con VIH.¹¹ El panorama resulta preocupante en vista del incremento de casos de diabetes registrados en los últimos años en nuestro país. Otro aspecto es que cada año se reporta un número creciente de las denominadas tuberculosis multirresistentes en las que la bacteria ha desarrollado resistencia a isoniazida y a rifampicina; los fármacos antifímicos más potentes. Para 2011 el número de casos de TB multirresistente reportados era de 630,000 a escala mundial.¹

En este trabajo identificamos que la infección extrapulmonar casi iguala porcentualmente los casos de TB pulmonar. Los resultados obtenidos muestran que 91.6% de los casos positivos al complejo MTB fueron positivos a *Mycobacterium tuberculosis*; y de ellos 54.4% correspondieron a TB pulmonar, 45.6% a infecciones tuberculosas extrapulmonares. 13% de la TB en el sistema nervioso por arriba de las infecciones identificadas en sangre y orina (9%). Cabe señalar que en este análisis las especies identificadas en las muestras fueron *M. tuberculosis* y *M. abscesus*. Los organismos del complejo *Mycobacterium* se clasifican como organismos de crecimiento rápido (que forman colonias en 1 semana) y de crecimiento lento. Del grupo de crecimiento rápido sólo *M. abscessus* es agente patógeno en humanos. Entre las especies de crecimiento lento se incluyen el complejo *M. Tuberculosis* y algunas otras especies asociadas con enfermedad en humanos como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, y *M. kansasii*. Se

sabe que las micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento asociadas con enfermedad en humanos son patógenos oportunistas que no se transmiten de persona a persona y, por lo tanto, se mantienen en el ambiente hasta que infectan a un individuo susceptible.¹² Es importante recalcar que debido a que la TB puede afectar varios órganos deben tenerse presente los signos y síntomas que pueden hacer sospechar la infección por *Mycobacterium*. Institucionalmente se puede hacer uso de métodos diagnósticos alternativos en menos tiempo para instituir el tratamiento adecuado, sobre todo en casos tan graves como la meningitis tuberculosa en la que la falta de antibióticos específicos sólo puede llevar a un desenlace fatal.

El 24 de marzo ha sido instituido como el Día Mundial de la Tuberculosis con el fin de hacer conciencia del estado de esta enfermedad y tratar de incentivar avances para su control y prevención. A pesar de que se ha disminuido un 40% la mortalidad causada por la TB, de acuerdo con los datos de la OMS, la tuberculosis sigue siendo una enfermedad fuertemente asociada con la marginación. Se requiere de una política decidida que mejore las condiciones de vida de la población en general como el mejor método preventivo; por otro lado, hace falta la instauración de métodos de diagnóstico con poder de resolución tanto en la identificación de la micobacteria como de las características de resistencia a fármacos que permitan al médico establecer un tratamiento específico y personalizado.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección Médica y a al Departamento de Vigilancia Epidemiológica del ISSSTE por su confianza para que el Laboratorio de Medicina Genómica, del Hospital Regional 1° de Octubre, implementara las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de mi-

cobacterias, así como los recursos financieros otorgados para tal fin. Asimismo se agradece al Dr. Jorge González y Merchant, investigador de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por habernos donado los cultivos positivos de las diferentes especies de micobacterias analizadas en este estudio.

Conflictos de interés

Los autores declaramos que no existen conflictos de interés de ninguna índole.

REFERENCIAS

1. Campañas mundiales de salud pública de la OMS 2013. Disponible en: www.who.int/campaigns/tb-day/2013/event/es/index.html
2. Ferrufino LC. Patología de la tuberculosis pulmonar. Disponible en: www.upch.edu.pe/famed/rmh/4-2/v4n2ce4.pdf.
3. Romero Hernández C. Diferencias de género en las redes de apoyo social entre los pacientes con tuberculosis pulmonar: Estudio cualitativo en dos poblaciones del estado de Veracruz, México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;17:80-90.
4. Secretaría de Salud. 2012. Informe de rendición de cuentas 2006-2012,12.11.3:8.
5. Pérez-Martínez I, Ponce de León A, Bobadilla M, Villegas-Sepúlveda N, Pérez-García M, Sifuentes-Osornio J y cols. A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:451-459.
6. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-544.
7. Wilson ML. Rapid Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and drug susceptibility testing. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:812-819.
8. Salem S, Gros P. Genetic determinants of susceptibility to Mycobacterial infections: IRF8, a new kid on the block. *Adv Exp Med Biol* 2013;783:45-80.
9. Li XX, Zhou XN. Co-infection of tuberculosis and parasitic diseases in humans: a systematic review. *Parasit Vectors* 2013;22:79.
10. Marais BJ, Graham SM, Maeurer M, Zumla A. Progress and challenges in childhood tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2013;13:287-9.
11. Medina Morales F, Echegoyen Carmona R, Medina Zarco LE. Tuberculosis extrapulmonar. *Neumología y Cirugía de Torax* 2003;62:92-95.
12. Behr MA. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. The new paradigm of immunity to Tuberculosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;783:81-91.