

Nuevos métodos en el diagnóstico rápido de la tuberculosis

JOSÉ DOMÍNGUEZ, IRENE LATORRE, BÁRBARA MOLINA-MOYA,
ALICIA LACOMA Y CRISTINA PRAT-AYMERICH

Servicio de Microbiología. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.
Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. CIBER Enfermedades Respiratorias.
Universitat Autònoma de Barcelona.

jadominguez@igtp.cat

RESUMEN

La tuberculosis (TB) presenta una elevada morbilidad y mortalidad a nivel mundial. El factor esencial para el control de la TB es el diagnóstico de la enfermedad en sus primeras etapas y el tratamiento correcto de los pacientes. El diagnóstico microbiológico de la TB se basa fundamentalmente en el estudio microscópico y el cultivo de las muestras clínicas, con limitaciones en su sensibilidad y rapidez. La introducción de métodos moleculares para la detección del microorganismo y de su resistencia a los principales fármacos anti-tuberculosos ha supuesto un avance considerable aunque insuficiente. Además, para controlar realmente la TB es necesario identificar y tratar a los individuos infectados antes de que progresen hacia enfermedad y se conviertan en nuevas fuentes de contagio. Los métodos en el diagnóstico de la infección son la tuberculina, y las técnicas *in vitro* de detección de IFN- γ (IGRAs). Sin embargo, a pesar de las técnicas disponibles y los nuevos avances en el diagnóstico de la infección y de la enfermedad tuberculosa, y aunque la TB puede ser curada, aún está lejos de estar erradicada. Se está llevando a cabo una intensa actividad para desarrollar nuevas técnicas que permitan un mejor manejo y control de la TB. La complejidad de la enfermedad requiere del seguimiento de las recomendaciones y documentos de consensos disponibles, y de la buena comunicación de todos los profesionales implicados.

Palabras clave: Examen microscópico; Cultivos; Métodos Moleculares; IGRAs.

Introducción

Mycobacterium tuberculosis, el agente causal de la tuberculosis (TB)¹, es un patógeno intracelular capaz de multiplicarse en el interior de los fagosomas de los macrófagos para posteriormente destruirlos. Como consecuencia de esta infección primaria, por un lado se produce una diseminación sistémica bacilar y, por otro lado, la formación de un complejo primario. Únicamente en un 5% de casos este

complejo puede originar una enfermedad primaria, ocasionando cuadros patológicos de diferente gravedad. En el resto de los individuos infectados, la enfermedad puede desarrollarse a partir de la reactivación de los focos infecciosos localizados. La reactivación de la TB puede presentar una clínica lentamente progresiva favoreciendo el contagio, dado el retraso en el diagnóstico.

Los factores esenciales para el control de la TB son el diagnóstico de la enfermedad en sus primeras etapas y la

identificación de su patrón de resistencias a los principales fármacos anti-TB para el tratamiento correcto de los pacientes. A pesar de las técnicas convencionales disponibles y los nuevos avances en el diagnóstico, y aunque la TB puede ser curada, en 2015 se declararon a nivel mundial unos 10,4 millones de nuevos casos, y 1,4 millones de muertes como consecuencia de la TB¹.

La situación se ha agravado con la aparición de cepas resistentes, multi-resistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR). La Organización Mundial de la Salud (OMS) notificó alrededor de 250.000 (margen 160.000-340.000) muertes en 2015 de casos de MDR-TB, siendo un 10% de ellos XDR, aunque la cifra es posiblemente mayor¹. El tratamiento convencional de la TB requiere de la combinación de 3-4 fármacos durante un período de 6-9 meses. Sin embargo, las formas resistentes de la TB requie-

ren de la utilización de fármacos que son menos eficaces, con muchos efectos adversos y que necesitan ser administrados hasta dos años². Esto provoca bajas tasas de cumplimiento y también de curación. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevas estrategias diagnósticas, nuevas vacunas y alternativas terapéuticas que permitan un mejor control de la enfermedad. Además, para un completo control de la TB se necesita también identificar y tratar a los individuos infectados antes de que progresen hacia enfermedad.

A continuación se detallan las técnicas de laboratorio disponibles para el diagnóstico tanto de la infección como de la enfermedad tuberculosa (Tabla I). Se hace énfasis en las técnicas actualmente disponibles, como también en las potenciales técnicas futuras que ahora están en fase de estudio y desarrollo.

Técnica diagnóstica	Diana diagnóstica	Muestra clínica	Tiempo de resultado	Ventajas / Limitaciones
<i>Tuberculina</i>	Hipersensibilidad retardada frente antígenos	Sangre	48-72h	Puede practicarse en la consulta clínica / Inespecífica. No diferencia infección de enfermedad
<i>IGRAs</i>	Detección células T sensibilizadas	Sangre	24h	Específica <i>M.tuberculosis</i> / No diferencia infección de enfermedad
<i>Microscopía</i>	Visualización BAAR ¹	Del foco de infección	1h	Resultados rápidos / Baja sensibilidad
<i>Cultivo</i>	Aislamiento microorganismo	Del foco de infección	Varias semanas	Técnica de referencia. Aislamiento de la bacteria para TSA ³ / Resultados lentos
<i>Métodos Moleculares</i>	Detección DNA microorganismo	Del foco de infección	2-6h	Resultados rápidos. Detección resistencias / Interpretar los resultados según la sospecha clínica
<i>Detección antígeno</i>	Detección LAM ²	Orina	1h	Técnica rápida / Solo de utilidad en pacientes HIV con bajos recuentos de CD4

Tabla I: Características de las técnicas disponibles en el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa.

¹BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes; ²LAM: Lipoarabinomanano; ³TSA: Técnicas de susceptibilidad antibiótica *in vitro*

Diagnóstico de la infección tuberculosa

Los métodos disponibles actualmente para el diagnóstico de la infección son la tuberculina, y las técnicas *in vitro* de detección de interferón (IFN)- γ (IGRAs, de su acepción en inglés: *Interferon-gamma release assays*)³.

Tuberculina

Para conocer si un individuo ha sido infectado por *M. tuberculosis* se estudia su respuesta de hipersensibilidad retardada frente a determinados compuestos antigénicos específicos del bacilo. Este sería el principio en que se basa la tuberculina. La tuberculina, que se obtiene del filtrado del cultivo de *M. tuberculosis* esterilizado y concentrado, actualmente está constituida por un derivado proteico purificado (PPD). Su principal inconveniente radica en que la mayoría de proteínas presente en el PPD no son específicas de *M. tuberculosis* sino compartidas con otras micobacterias. Esto provoca una disminución en la especificidad de la prueba, ya que individuos sensibilizados por exposición previa a otras micobacterias o vacunados con BCG (Bacilo de Calmette y Guérin; que son cepas atenuadas de *Mycobacterium bovis*) también responden inmunológicamente al PPD. Además su utilización presenta una reconocida baja sensibilidad en personas inmunodeprimidas con alteraciones de la inmunidad celular.

IGRAs

Estas técnicas se basan en métodos de cuantificación de la respuesta inmune celular frente a diferentes antígenos de *M. tuberculosis*, mediante la detección *in vitro* de la liberación de IFN- γ ^{4, 5}. Fundamentalmente se basan en técnicas inmunológicas, de enzimo-inmunoensayo (EIA) y de enzimo-inmunospot (ELISPOT), que respectivamente han dado lugar a dos técnicas disponibles comercialmente: QuantiFERON-TB Gold (Qiagen, Düsseldorf, Alemania) y T.SPOT-TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido), respectivamente. La técnica consiste en una estimulación *in vitro* de los linfocitos con los antígenos *Early Secretory Antigen Target-6* (ESAT-6) y *Culture Filtrate Protein 10* (CFP-10), seguida de una detección del IFN- γ producido por las células sensibilizadas (Figura 1). Los antígenos uti-

lizados están codificados en la región de diferenciación 1 (RD1), que son antígenos secretados por el complejo *M. tuberculosis* y que están ausentes en la vacuna BCG y en otras micobacterias ambientales⁶.

Los estudios realizados han demostrado que estas técnicas tienen una mejor correlación con el grado de exposición de los contactos a *M. tuberculosis* que la tuberculina, y que además la vacunación con BCG no interfiere en el resultado³. Sin embargo, a pesar de disponer de un valor predictivo negativo excelente, presentan un valor predictivo positivo similar o sólo ligeramente superior al de la tuberculina, por lo que muchos pacientes con resultado positivo no progresan a enfermedad activa^{7, 8}. Por otro lado, los IGRAs, aunque en menor medida que la tuberculina, se ven también afectados por diferentes estados de inmunosupresión (pacientes HIV, tratamientos inmunosupresores, ...) ⁹⁻¹².

Recientemente, ha aparecido una nueva generación del QuantiFERON, el QFN-TB Gold Plus, que incluye diferentes mezclas de péptidos derivados de ESAT-6 y CFP-10 que permiten estimular, además de a los linfocitos T CD4, a los linfocitos T CD8. Dado que muchas inmunodeficiencias están asociadas con una disminución de las células T CD4,

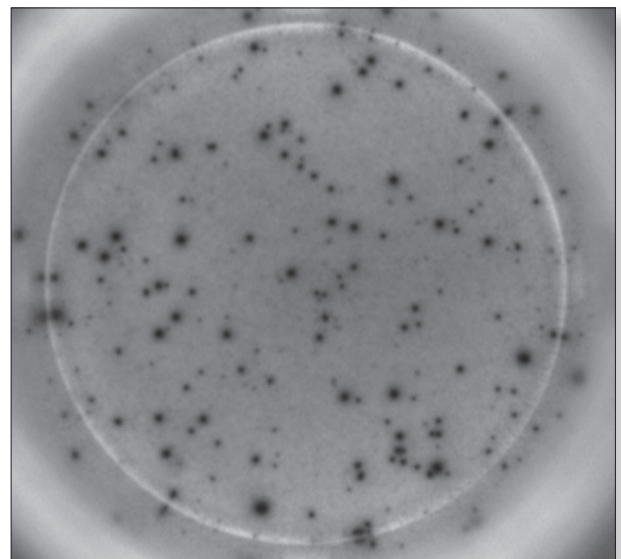


Figura 1. T-SPOT.TB con resultado positivo. La presencia de células T reactivas se observa mediante la aparición de spots (puntos) en el fondo del pocillo de la placa de ELISPOT. Se considera que un resultado es positivo si la muestra presenta más de 6 puntos.

se ha hipotetizado que esta nueva versión de QFN aumentará la sensibilidad en diferentes grupos de inmunodeprimidos, disminuyendo potenciales resultados indeterminados. Sin embargo, publicaciones recientes no parecen observar diferencias significativas con la versión previa del QFN¹³.

Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa

El diagnóstico de la TB activa se basa fundamentalmente en el examen microscópico y el cultivo de las muestras clínicas, que presentan limitaciones en cuanto a sensibilidad y rapidez, respectivamente¹. En los últimos años, se han ido incorporando a la práctica clínica nuevas técnicas moleculares, basadas en la amplificación genética, que han permitido detectar la presencia de *M. tuberculosis* en las muestras clínicas, así como la detección de las principales mutaciones que confieren resistencia a los fármacos anti-tuberculosos¹⁴.

Examen microscópico

El examen microscópico de las muestras biológicas mediante tinción de Ziehl-Neelsen es un método rápido, sencillo y económico, que permite visualizar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. La utilización de microscopía de fluorescencia convencional o de *light-emitting diode* (LED) son una buena alternativa a la microscopía convencional, aumentando la sensibilidad alrededor de un 10%¹⁵. Sin embargo, la microscopía presenta, en general, una baja sensibilidad en comparación con el cultivo, y evidenciando un menor rendimiento en determinados grupos de pacientes, como los pacientes infectados con el virus HIV, en los que la microscopía frecuentemente es negativa.

La sensibilidad de la microscopía está condicionada por la localización de la TB (en algunas formas extrapulmonares la sensibilidad es muy baja), el grado de afectación de la enfermedad y la calidad de la muestra. Sin embargo, su especificidad es muy elevada, superior al 95%. Por consiguiente, una baciloscopia negativa no descarta TB, pero una baciloscopia positiva prácticamente la confirma en el 95% de los casos y es indicación de iniciar tratamiento. Además, la microscopía requiere de personal con experiencia y pericia en la observación microscópica.

Cultivos microbiológicos

El cultivo es el único método que puede asegurar con certeza la presencia de TB si se acompaña de identificación, y el único que es completamente válido para evaluar el seguimiento del paciente y garantizar su curación. Sin embargo, requiere de una larga incubación, superior a 2-4 semanas, para obtener un resultado. Además, las muestras clínicas para el cultivo de micobacterias pueden proceder de lugares con flora comensal (respiratorias, heces, etc.). El rápido crecimiento de la flora comensal impediría el crecimiento de las micobacterias en los medios de cultivo, por lo que es necesario aplicar técnicas de descontaminación de la flora comensal y de homogeneización de las muestras clínicas.

Los medios de uso habitual para el cultivo de micobacterias pueden ser sólidos o líquidos. El cultivo sólido más utilizado es el clásico de Löwenstein-Jensen. Sin embargo, la utilización combinada de un medio sólido y un medio líquido se considera actualmente idónea para tener sensibilidad óptima y rapidez en la detección. En los últimos años se han popularizado los cultivos en medios líquidos en sistemas automatizados, que reducen el tiempo necesario para obtener resultados positivos a aproximadamente dos semanas¹⁶. El principal inconveniente de los cultivos es el lento crecimiento de *M. tuberculosis* que impide obtener resultados de forma rápida. Además, el procesamiento de muestras para el estudio de TB requiere de la utilización de laboratorios de nivel 3 de bioseguridad, lo que dificulta su implantación en algunos laboratorios (Figura 2). Los medios de cultivo permiten aislar la cepa micobacteriana para realizar posteriormente estudios de susceptibilidad fenotípica a los antibióticos, que son esenciales para determinar los patrones de resistencia.

Métodos moleculares

En los últimos años se ha desarrollado y evaluado un gran número de técnicas para la detección de micobacterias, fundamentalmente *M. tuberculosis*, directamente de muestras clínicas. En estas técnicas se amplifican diferentes dianas genéticas y se utilizan diferentes métodos de amplificación y de revelado del producto amplificado. Es necesario señalar que la sensibilidad de estas técnicas es dependiente en gran medida de la utilización de métodos de calidad y muy optimizados para la extracción del material genético,



Figura 2. Procesamiento de muestras clínicas para cultivo de micobacterias en un laboratorio de bioseguridad tipo P3.

y es recomendable emplear técnicas que incluyan controles internos de amplificación para detectar las posibles inhibiciones.

La mayoría de evaluaciones llevadas a cabo con sistemas de amplificación ofrecen resultados satisfactorios, aunque todavía quedan por resolver algunas limitaciones de estas técnicas y su aplicación en el diagnóstico de la TB. En muestras Ziehl-Neelsen positivas, las técnicas han demostrado una excelente sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en muestras de pacientes con diagnóstico de TB y tinción negativa, las técnicas reflejan una gran variabilidad de resultados, dependiendo del sistema de amplificación utilizado y del origen de las muestras. El grado de sospecha clínica es fundamental para la interpretación de los resultados. Dada la óptima sensibilidad y especificidad de las técnicas de amplificación cuando se aplican en muestras con baciloscopia positiva, un valor positivo de la amplificación establecería el diagnóstico de la TB. En cambio, un

valor negativo de amplificación obtenido de una muestra con baciloscopia negativa, no descartaría en ningún caso el diagnóstico de la TB¹⁷.

En los últimos años las bases moleculares de la resistencia a los fármacos anti-TB han sido dilucidadas. Las principales mutaciones implicadas en resistencia a la rifampicina (RIF) se han detectado en la subunidad-beta de la RNA polimerasa (*rpoB*); y las asociadas a isoniacida (INH) se han localizado en el gen de la peróxido catalasa (*katG*), y en el gen y el promotor de *enoyl acyl carrier protein reductasa* (*inhA*)¹⁸. Paulatinamente se han ido describiendo mutaciones relacionadas con resistencias al resto de fármacos de primera línea, y a algunos de segunda línea. De forma paralela se han desarrollado métodos que además de detectar la presencia de *M. tuberculosis*, detectan de forma simultánea las principales mutaciones asociadas a resistencia. Los métodos moleculares basados en hibridación reversa, pirosecuenciación y PCR multiplex han de-

mostrado utilidad para la identificación de las mutaciones más relevantes^{10, 19-23}.

Algunas técnicas, como el GenoType MTBDRplus y GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) han sido recomendadas por la OMS para el diagnóstico de la TB-MDR^{24, 25}. Sin embargo, se han descrito mutaciones asociadas a resistencia en las que no hay una clara correlación con la resistencia fenotípica de la micobacteria. Además la sensibilidad para la detección de resistencia a algunos fármacos es limitada. Por lo tanto, la interpretación de los resultados de los métodos moleculares debe hacerse con cautela, teniendo en consideración cual ha sido la mutación identificada¹⁸. Sin embargo, la reciente introducción del GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), que permite la detección molecular del microorganismo y de su resistencia a RIF, ha supuesto un avance considerable en el diagnóstico y manejo de la TB y TB-MDR. La técnica ha presentado resultados de sensibilidad muy elevados en muestras con baciloscopia positiva y también negativa²⁶. La técnica GeneXpert MTB/RIF es un sistema automatizado basado en un sistema integrado



Figura 3. Pre-tratamiento de las muestras clínicas para su inoculación en los cartuchos GeneXpert MTB/RIF.

de micro-fluídica y en una PCR a tiempo real. La muestra se trata con un reactivo de pre-tratamiento durante 15 minutos y posteriormente se transfiere a un cartucho de reacción que contiene todos los reactivos necesarios para la extracción de ADN y la amplificación en el interior del equipo del GeneXpert. La sensibilidad y especificidad de esta técnica para detectar *M. tuberculosis* se estiman en un 89% y 99%, respectivamente; y para la detección de resistencia a RIF en un 95% y 98%, respectivamente²⁷. Este tipo de técnica está especialmente indicada para aquellas áreas geográficas con elevada incidencia de TB-MDR (Figura 3)²⁸.

Whole genome sequencing (WGS)

WGS es una nueva generación de técnicas de secuenciación que permiten secuenciar todo el genoma microbiano en un tiempo reducido y a un coste cada vez más asequible. Estas técnicas están siendo utilizadas para la detección de mutaciones asociadas a resistencias y también para estudios de epidemiología molecular^{29, 30}. WGS permite, no solo identificar las mutaciones ya conocidas, si no también mutaciones nuevas. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es que produce una gran cantidad de datos, que ineludiblemente requieren de un *software* específico y herramientas bioinformáticas para procesar toda la información; además es necesario ser prudentes en la atribución de implicaciones clínicas a las mutaciones que se identifiquen. Por el momento, esta técnica no está disponible para el trabajo diario, y solo está al alcance de centros especializados.

Detección de lipoarabinomanano (LAM)

LAM es un antígeno micobacteriano de pared celular, que no es específico de *M. tuberculosis*. Se ha desarrollado una técnica inmunológica, ELISA primero e inmuno-cromatografía (ICT) después, que detecta la presencia de LAM en muestras de orina. Este tipo de técnica es especialmente interesante, pues ofrece un diagnóstico rápido mediante la utilización de una muestra no invasiva. Desafortunadamente, la técnica no es totalmente específica de *M. tuberculosis*, y solo presenta una sensibilidad aceptable en enfermos de HIV con un bajo número de CD4, o con unas formas de TB muy evolucionadas³¹.

Nuevas técnicas en desarrollo

Por lo que respecta al diagnóstico de la infección tuberculosa, aunque de forma clásica se ha definido la infección tuberculosa como aquella situación en que la bacteria está confinada en el organismo en una forma inactiva, recientemente esta definición incluye diversas situaciones, desde aquella en que la infección ha sido completamente eliminada por el sistema inmunitario, hasta aquella en que la bacteria está replicándose activamente aunque en ausencia de síntomas clínicos⁴.

A falta de técnicas que predigan el riesgo de progresión a TB activa, caracterizar la respuesta inmune mediada por células T frente a antígenos de persistencia se muestra como una alternativa en el proceso de identificar biomarcadores específicos de latencia, de transición hacia TB activa y de inmunidad protectora, para el desarrollo efectivo de mejores vacunas y métodos inmunodiagnósticos³²⁻³⁴. La identificación de nuevos biomarcadores como resultado de la respuesta inmunológica, como puede ser la detección de IP-10, también es de gran interés^{34,35}.

Recientemente, se han presentado los resultados de la evaluación clínica de una nueva tuberculina, basada en ESAT-6 y CFP-10, con resultados muy prometedores y equiparables a los obtenidos por el QFN³⁶.

Respecto al diagnóstico de la enfermedad tuberculosa, se están desarrollando nuevas técnicas de lectura automatizada de las extensiones microscópicas, que permitirán una lectura más homogénea, más rápida y con una mejor sensibilidad que el método manual³⁷. También se está trabajando en la optimización del transporte de muestras para el estudio de micobacterias, mediante la utilización de reactivos que estabilizan la muestra e inician la descontaminación de la misma³⁸.

Desde el punto de vista de técnicas moleculares, se está desarrollando una nueva generación del GeneXpert: GeneXpert Ultra, el cual aumenta su capacidad de detección con dos dianas diferentes de multi-copia, un cartucho que permite inocular un volumen mayor de muestra, que detectará mutaciones silentes y realizará la reacción de forma más rápida. Además se está trabajando en un GeneXpert-XDR.

También existe interés en las evaluaciones clínicas de las técnicas de amplificación isotérmicas, que simplifican los

requerimientos técnicos y permiten una mejor utilización en numerosos laboratorios³⁹. Se ha descrito la utilidad de la caracterización de determinados micro-RNAs que en enfermedad están *up-regulated* o *down-regulated*, en comparación con la infección tuberculosa⁴⁰. La principal dificultad de esta aproximación es el coste económico de la técnica.

Finalmente, se están destinando esfuerzos en el estudio del metaboloma para el diagnóstico de la TB. Los metabolitos son los productos finales de los procesos de regulación celular, por lo que el estudio de los niveles de éstos puede interpretarse como una respuesta de los sistemas biológicos ante un estrés interno o externo (infecciones). Es posible encontrar perfiles metabolómicos específicos en orina y plasma que ayudan en el diagnóstico y en la monitorización del tratamiento⁴¹. Existen pruebas de la utilidad de la detección de compuestos volátiles orgánicos (VOC) para el diagnóstico de la TB. Estos VOC proceden de la combinación del metabolismo de *M. tuberculosis*, así como de las lesiones producidas a nivel tisular en el paciente. Se han descrito diferentes aproximaciones para la detección de VOC en muestras de aire exhalado^{42,43}. En la mayoría de los casos los resultados de sensibilidad y especificidad no han sido adecuados para su uso en la práctica clínica. Sin embargo, en los últimos años se han producido avances en la sensibilidad analítica de los instrumentos de detección que han permitido contemplar la detección de VOC en el aire exhalado como una potencial herramienta diagnóstica⁴⁴. Una técnica que ha demostrado aumentar la sensibilidad y especificidad es el *Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometer* (FAIMS)⁴⁵. Disponer de una técnica metabolómica que permita recoger fácilmente la muestra y su análisis sería de gran interés.

Conclusiones finales

Las técnicas convencionales de diagnóstico microbiológico hemos de considerarlas de referencia, aunque somos conocedores de sus limitaciones. Es importante, para mejorar el rendimiento del diagnóstico microbiológico obtener muestras biológicas de calidad y en cantidad suficiente. Las técnicas moleculares son de gran utilidad para un diagnóstico rápido de la enfermedad y de la detección de resistencias, pero deben utilizarse con prudencia, ya que para el diagnóstico están condicionadas por la carga bacteriana y el gra-

do de sospecha clínica y para la detección de resistencias existen mutaciones que no correlacionan adecuadamente con la resistencia fenotípica. Las técnicas de detección de IFN- γ *in vitro* contribuyen a un mejor diagnóstico de la infección tuberculosa.

Tanto para el diagnóstico de la enfermedad como para el de la infección se están desarrollando nuevas técnicas que deberán mejorar a las actuales, pero mientras tanto, debe recomendarse utilizar las diferentes normativas y documentos de consenso publicados por organizaciones internacionales y sociedades científicas^{18,46}. Por último, para poder llevar a cabo un manejo adecuado de esta compleja enfermedad se necesita aumentar la buena comunicación entre los diferentes profesionales implicados en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

Agradecimientos

Nuestro más sincero reconocimiento a nuestros colaboradores clínicos habituales del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (J. Ruiz-Manzano, I. Casas, L. Mateo, C. Ferrándiz, J.M. Carrascosa, M. Méndez); Unidad de Control de TB de Drassanes (M.L. De Souza-Galvao, MA. Jiménez, A. Campos, C. Milà, J. Solsona, T. Soriano, M. Espasa); Serveis Clínic (J. Maldonado, J.P. Millet, N. Altet, I. Molina, J. Soteras, Y. González); Hospital Sant Joan de Déu (A. Noguera, E. Velasco); Hospital de Sant Joan Despí-Moisés Broggi (F. Sabrià, C. Torras); Hospital Universitari Vall d'Hebrón (A. Sánchez, I. Molina, C. Rodrigo); Unitat de Vigilància Epidemiològica Vallès Occidental i Vallès Oriental (L. Clotet); y Hospital Universitari Mútua Terrassa (X. Martínez-Lacasa, R. Font), y también al personal técnico de la Sección de Micobacterias e Infecciones Respiratorias del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (L. Haba, y M. Pérez).

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. 2016. Global tuberculosis control. (WHO/HTM/TB/2016.13). Geneva, Switzerland.
2. Lange C, Abubakar I, Alffenaar J W, et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2014; 44: 23-63.
3. Domínguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvao M, et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 168-71.
4. Andersen P, Munk M E, Pollock J M, Doherty T M. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1099-104.
5. Lalvani A, Pathan A A, Durkan H, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001; 357: 2017-21.
6. Brock I, Weldingh K, Leyten E M, Arend S M, Ravn P, Andersen P. Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2379-87.
7. Zellweger J P, Sotgiu G, Block M, et al. Risk Assessment of Tuberculosis in Contacts by IFN-gamma Release Assays. A Tuberculosis Network European Trials Group Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 1176-84.
8. Altet N, Domínguez J, Souza-Galvao M L, et al. Predicting the Development of Tuberculosis with the Tuberculin Skin Test and QuantiFERON Testing. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12: 680-8.
9. Sester M, van Leth F, Bruchfeld J, et al. Risk assessment of tuberculosis in immunocompromised patients. A TBNET study. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 1168-76.
10. Mínguez S, Latorre I, Mateo L, et al. Interferon-gamma release assays in the detection of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthritis scheduled for anti-tumour necrosis factor treatment. *Clin Rheumatol* 2012; 31: 785-94.
11. Latorre I, Martínez-Lacasa X, Font R, et al. IFN-gamma response on T-cell based assays in HIV-infected patients for detection of tuberculosis infection. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 348.
12. Latorre I, Carrascosa J M, Vilavella M, et al. Diagnosis of tuberculosis infection by interferon-gamma release assays in patients with psoriasis. *J Infect* 2014; 69: 600-6.
13. Petruccioli E, Chiacchio T, Peponi I, et al. First characterization of the CD4 and CD8 T-cell responses to QuantiFERON-TB Plus. *J Infect* 2016.
14. World Health Organization. 2016. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. (WHO/HTM/TB/2016.04). Geneva, Switzerland.
15. Marais B J, Brittle W, Painczyk K, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 203-7.
16. Pfyffer G E, Cieslak C, Welscher H M, Kissling P, Rusch-Gerdes S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2229-34.
17. Catanzaro A, Perry S, Clarridge J E, et al. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *JAMA* 2000; 283: 639-45.

18. Domínguez J, Boettger E C, Cirillo D, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016; 20: 24-42.
19. García-Sierra N, Lacoma A, Prat C, et al. Pyrosequencing for rapid molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3683-6.
20. Lacoma A, Molina-Moya B, Prat C, et al. Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* second-line drugs and ethambutol resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 83: 263-9.
21. Molina-Moya B, Kazdaglis G, Lacoma A, et al. Evaluation of GenoFlow DR-MTB Array Test for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 1160-3.
22. Molina-Moya B, Lacoma A, Prat C, et al. AID TB resistance line probe assay for rapid detection of resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Infect* 2015; 70: 400-8.
23. Molina-Moya B, Lacoma A, Prat C, et al. Diagnostic accuracy study of multiplex PCR for detecting tuberculosis drug resistance. *J Infect* 2015; 71: 220-30.
24. World Health Organization. 2008. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), Geneva, Switzerland.
25. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman M E. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 787-92.
26. Boehme C C, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010; 363: 1005-15.
27. Steingart K R, Schiller I, Horne D J, Pai M, Boehme C C, Den-dukuri N. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 1: CD009593.
28. World Health Organization. 2011. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system (WHO/HTM/TB/2011.4). Geneva, Switzerland.
29. Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniowski F, Cirillo D M, Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* 2016.
30. Witney A A, Cosgrove C A, Arnold A, Hinds J, Stoker N G, Butcher P D. Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Med* 2016; 14: 46.
31. Zijenah L S, Kadzirange G, Bandason T, et al. Comparative performance characteristics of the urine lipoarabinomannan strip test and sputum smear microscopy in hospitalized HIV-infected patients with suspected tuberculosis in Harare, Zimbabwe. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 20.
32. Serra-Vidal M M, Latorre I, Franken K L, et al. Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol* 2014; 5: 517.
33. Latorre I, Domínguez J. Dormancy antigens as biomarkers of latent tuberculosis infection. *EBioMedicine* 2015; 2: 790-1.
34. Ruhwald M, Andersen P L. New tests for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection: sufficient to meet the WHO 2035 targets? *Future Microbiol* 2016; 11: 1101-4.
35. Ruhwald M, Domínguez J, Latorre I, et al. A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with *M. tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2011; 91: 260-7.
36. Hoff S T, Peter J G, Theron G, et al. Sensitivity of C-Tb: a novel RD-1-specific skin test for the diagnosis of tuberculosis infection. *Eur Respir J* 2016; 47: 919-28.
37. Lewis J J, Chihota V N, van der Meulen M, et al. "Proof-of-concept" evaluation of an automated sputum smear microscopy system for tuberculosis diagnosis. *PLoS One* 2012; 7: e50173.
38. Maharjan B, Shrestha B, Weirich A, Stewart A, Kelly-Cirino C D. A novel sputum transport solution eliminates cold chain and supports routine tuberculosis testing in Nepal. *J Epidemiol Glob Health* 2016; 6: 257-265.
39. Nagai K, Horita N, Yamamoto M, et al. Diagnostic test accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016; 6: 39090.
40. Latorre I, Leidinger P, Backes C, et al. A novel whole-blood miRNA signature for a rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 2015; 45: 1173-6.
41. Oresic M, Vidal-Puig A, Hanninen V. Metabolomic approaches to phenotype characterization and applications to complex diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 575-85.
42. Phillips M, Basa-Dalay V, Blais J, et al. Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2012; 92: 314-20.
43. Bruins M, Rahim Z, Bos A, van de Sande W W, Endtz H P, van Belkum A. Diagnosis of active tuberculosis by e-nose analysis of exhaled air. *Tuberculosis (Edinb)* 2013; 93: 232-8.
44. Dorman S. Advances in the diagnosis of tuberculosis: current status and future prospects. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19: 504-16.
45. Westenbrink E, Arasaradnam R P, O'Connell N, et al. Development and application of a new electronic nose instrument for the detection of colorectal cancer. *Biosens Bioelectron* 2015; 67: 733-8.
46. Santin M, García-García J M, Rigau D, et al. Executive summary of the guidelines for the use of interferon-gamma release assays in the diagnosis of tuberculosis infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34: 304-8.

