

Diagnóstico molecular en tuberculosis: presente y futuro

CARLOS TORO RUEDA Y ARÁNZAZU AMOR ARAMENDÍA

Servicio de Microbiología. Hospital Carlos III, Madrid

Correspondencia: Carlos Toro Rueda
Calle Sinesio Delgado 10.
Madrid 28029

e-mail: carlostororueda@hotmail.com

RESUMEN

La tuberculosis es la séptima causa de muerte en el mundo, con un impacto dramático en las zonas menos desarrolladas del planeta, agravado por la emergencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes a los fármacos actuales. El diagnóstico microbiológico se sigue basando en la microscopía y el cultivo, junto con el antibiograma para conocer la sensibilidad antibiótica. Estas pruebas tienen importantes limitaciones, fundamentalmente son test lentos y requieren una importante infraestructura. Durante las últimas dos décadas se han implementado las pruebas de detección de ácidos nucleicos, que han contribuido notablemente a mejorar las deficiencias de las técnicas tradicionales. El propósito de esta revisión es describir los ensayos moleculares actualmente disponibles para el diagnóstico de la tuberculosis y la detección de mutaciones de resistencia. Se repasan brevemente también las nuevas herramientas de diagnóstico molecular que están en una fase avanzada de desarrollo, y que probablemente contribuirán de manera decisiva a una mejora en el control y tratamiento de la tuberculosis a nivel mundial.

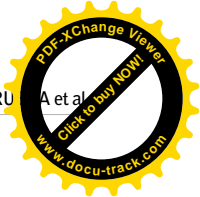
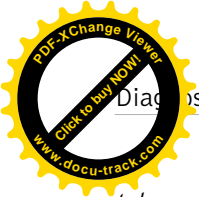
PALABRAS CLAVE: Tuberculosis, diagnóstico molecular, resistencia, PCR

Introducción

A principios del siglo XXI la tuberculosis sigue siendo una importante causa de morbimortalidad a nivel mundial. Cada año se diagnostican más de 9 millones de nuevos casos y se estima que se producen alrededor de 1,7 millones de muertes. En la mayoría de los países, la microscopía continúa siendo el método más utilizado para diagnosticar la enfermedad tuberculosa. Si bien es barata y fácil de realizar, tiene solo

una modesta sensibilidad (del 35% al 80%), siendo especialmente baja en los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en niños, poblaciones que constituyen la mayoría de casos de la enfermedad en gran parte de los países del África subsahariana^{1,2}.

El cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* sigue considerándose todavía hoy el "patrón oro" del diagnóstico. Es un método muy sensible que permite tanto la identificación de *M.*



tuberculosis como la realización del antibiograma para conocer la sensibilidad a los fármacos. No obstante, el cultivo tiene la limitación del tiempo prolongado de crecimiento (de 2 a 6 semanas) cuando se realiza en medios sólidos (p.e. Lowenstein-Jensen), retrasando la toma de decisiones clínicas adecuadas. Para acortar este periodo, en la pasada década se desarrollaron los cultivos en medios líquidos. Con dicha metodología se pueden obtener resultados en 10-14 días, sin embargo requiere equipos costosos así como personal técnico con una elevada capacitación, lo que impide su implantación sobre todo en zonas con limitados recursos económicos³.

Por otro lado, uno de los factores que dificulta el manejo y control clínico de la tuberculosis es la resistencia a fármacos. La OMS estima que el 20% de los casos de enfermedad a nivel mundial son resistentes a un fármaco y un 5,3% corresponde a pacientes con cepas multirresistentes (resistencia conjunta a isoniacida y rifampicina). En los últimos años se ha producido un alarmante incremento de estas cepas de las que sólo una pequeña proporción es identificada. Este hecho, junto con la aparición de casos de tuberculosis extremadamente resistente (resistencia a rifampicina, isoniacida, una fluoquinolona y un fármaco parenteral de segunda línea - amikacina, kanamicina y capreomicina-) ha subrayado la necesidad de implantar técnicas de cribado para el diagnóstico de las cepas multirresistentes⁴. Los métodos convencionales para detectar la resistencia a *M. tuberculosis* requieren el disponer previamente del cultivo. En general, y aun con la ventaja de utilizar medios de cultivo líquidos, el tiempo para la obtención de resultados oscila entre 25 y 45 días. Durante este tiempo, los pacientes pueden ser tratados inadecuadamente y transmitir cepas tuberculosas resistentes.

En las últimas dos décadas se han producido notables avances en el diagnóstico de la tuberculosis, con el desarrollo de herramientas de biología molecular que están contribuyendo a paliar las limitaciones de las técnicas tradicionales arriba comentadas. El propósito de esta revisión es describir los ensayos de detección de ácidos nucleicos actualmente disponibles, así como las nuevas técnicas moleculares en fase de desarrollo y evaluación, y que probablemente pasarán a formar parte de la rutina diagnóstica de los laboratorios en un futuro cercano.

Técnicas convencionales de detención de ácidos nucleicos

Sondas de ácidos nucleicos

La primera aplicación de las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos tuvo lugar con la introducción de sondas comerciales de ADN no radiactivas. Dichas sondas son complementarias con el ARN ribosómico (ARNr) micobacteriano; el híbrido ADN-ARNr produce una reacción de quimioluminiscencia que permite su identificación. Existen sondas comercializadas para la identificación del complejo *M. tuberculosis*, el grupo *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*. Se han diseñado sondas fluorescentes de ácidos nucleicos peptídicos que permite diferenciar *M. tuberculosis* del resto de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*.

Las sondas se aplican sobre los cultivos obtenidos tanto en medio sólido como líquido. El ARNr de la micobacteria es liberado para su detección mediante sonicación sin necesidad de realizar amplificación genética. Esto hace que sea una técnica sencilla que se puede realizar en poco tiempo (2 horas). Tanto la sensibilidad como la especificidad del ensayo son excelentes. No obstante, son varios los inconvenientes que han hecho que en la actualidad su uso haya disminuido a favor de otras técnicas moleculares. En primer lugar, la necesidad de disponer de un aislado previo, ya que la técnica carece de la sensibilidad suficiente para detectar micobacterias directamente sobre muestra clínica. Por otro lado, el número de sondas comercializadas es limitado (aunque incluye las más importantes desde el punto de vista clínico) y requiere una orientación presuntiva (p.e. según el aspecto de la colonia) para la elección de la sonda adecuada, ya que sólo se puede emplear una por reacción. Por último, la sonda es incapaz de detectar cultivos mixtos micobacterianos que pueden presentarse con relativa frecuencia en individuos inmunocomprometidos⁵.

Ensayos de amplificación genética con detección automática/semiautomática

Las técnicas de amplificación genética han revolucionado el diagnóstico microbiológico. De ellas, la más conocida es la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, *PCR*). La realización de una reacción de amplifica-



ción genética consta de tres etapas: 1) extracción de los ácidos nucleicos, 2) amplificación de la secuencia diana, y 3) detección de los fragmentos amplificados. En el caso de las micobacterias, la extracción de ácidos nucleicos es simple si se realiza a partir de cultivos tanto sólidos como líquidos, donde existe una cantidad muy elevada de ADN. Por el contrario, el rendimiento de la extracción es peor si se parte directamente de muestra clínica, entre otros factores porque la cantidad de ADN disponible es inferior, lo que puede comprometer la sensibilidad de la técnica⁶.

La amplificación del fragmento diana de ácido nucleico, en el caso de la PCR convencional, se lleva a cabo mediante sucesivos ciclos de desnaturalización y naturalización del ADN. Este proceso se realiza mediante cambios de temperatura y requiere un termociclador. La separación de las hebras permite que una enzima termoestable (Taq polimerasa) vaya formando copias de la diana genética de forma exponencial en cada ciclo. La amplificación tiene lugar en aproximadamente dos horas. Existen otros sistemas de amplificación utilizados en *M. tuberculosis* como la transcripción inversa (*transcription-mediated amplification*, TMA). En este caso se utilizan otras enzimas para llevar a cabo la amplificación que tiene como ventaja ser un proceso isotérmico y por lo tanto no necesitar termociclador.

El producto amplificado se puede detectar de diversas formas. En las PCR caseras se recurre a la observación directa del fragmento amplificado en un gel de agarosa, tras una electroforesis convencional. No obstante, este método no es suficientemente específico ya que tenemos que asegurarnos que el producto amplificado se corresponde con nuestra diana. Para ello se realiza una hibridación con una sonda que sea complementaria a la diana amplificada. En las PCR convencionales comercializadas para tuberculosis, la detección del híbrido está automatizada y se pone de manifiesto mediante quimioluminiscencia, emisión de fluorescencia o una reacción colorimétrica.

Existen diversos sistemas comercializados; los más utilizados son el ensayo AMTD-2 (*Amplified M. tuberculosis Direct Assay*) y el "COBAS AmpliCor M. tuberculosis test". El AMTD-2 consiste en una amplificación isotérmica mediante TMA cuya secuencia diana es el gen 16S ARNr. El proceso de amplificación se lleva a cabo en un bloque térmico y los resultados están disponibles en 2 horas y media. El "CO-

BAS AmpliCor M. tuberculosis test" es una PCR que amplifica un fragmento de 584 pb del gen 16S ARNr. Es una técnica automatizada y los resultados están disponibles entre 6 y 7 horas.

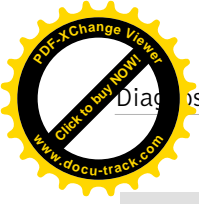
El desarrollo de estas nuevas técnicas de amplificación genética tenían como objetivo la detección de *M. tuberculosis* directamente de muestra clínica. Diversos estudios han demostrado que la especificidad de estos ensayos es aceptable tanto en muestras respiratorias como extrapulmonares. Sin embargo, la sensibilidad es variable, siendo muy buena en muestras respiratorias con baciloscopia positiva (88-100%), menor cuando la baciloscopia es negativa (50-96%) e impredecible entre las muestras extrarrespiratorias (27,5-85%)⁷.

Ensayos de sondas en línea

Esta tecnología se basa en la realización de una PCR en la que la detección del producto se realiza en tiras de nitrocelulosa marcadas con sondas específicas para las diferentes especies de micobacterias. Por lo tanto permite realizar la identificación en una única reacción. Además, tiene la ventaja de que este formato de tiras es de fácil lectura e interpretación. Actualmente se dispone de dos sistemas comercializados: "INNO-LiPA v2" y "GenoType". El "INNO-LiPA" v2 tiene como diana de amplificación un fragmento del espacio intergenético 16S-23S del ARNr e incluye 16 sondas diferentes que permiten la identificación del complejo *M. tuberculosis* y de las especies de micobacterias no tuberculosas de mayor interés clínico.

El sistema "GenoType" amplifica el gen 23S del ARNr; existen diversas tiras para diferentes niveles de identificación. Un primer formato de tiras ("GenoType CM") permite la identificación del complejo *M. tuberculosis* junto con otras 13 especies de micobacterias implicadas más frecuentemente en clínica. Si no se llega a un diagnóstico, existe otro formato ("GenoType AS") que incluye 16 especies adicionales. Por último, existe un tercera tira ("GenoType MTB") para la identificación de las especies que forman el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. canetti*).

Los ensayos de sondas en línea presentan una buena sensibilidad y especificidad a partir de aislados de cultivos, y tam-



IDENTIFICACIÓN

M. tuberculosis

- Sondas de ácidos nucleicos
- Ensayos de amplificación con detecc. auto/semiautomática
- Ensayos de sondas en línea
- PCR a tiempo real
- Xpert MTB/RIF

Micobacterias no tuberculosas

- Sondas de ácidos nucleicos
- Ensayos de sondas en línea

RESISTENCIA M. TUBERCULOSIS

Rifampicina

- Ensayos de sondas en línea
- PCR a tiempo real
- Xpert MTB/RIF

Rimfapicina y a otros fármacos

- Ensayos de sondas en línea
- PCR a tiempo real

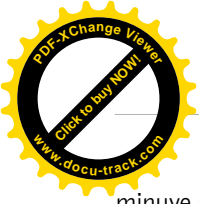
Tabla I. Test de ácidos nucleicos y su aplicabilidad para la identificación y detección de resistencias

bién ha demostrado ser útil en la detección directa sobre muestras respiratorias con baciloscopia positiva; sin embargo, no se recomienda su utilización si la baciloscopia es negativa. Estas técnicas se realizan en 1-2 días de trabajo y su diseño permite el diagnóstico de coinfecciones. Entre sus inconvenientes, hay que señalar que son pruebas caras y relativamente laboriosas⁷⁻⁹.

Las ventajas de este formato en tiras han llevado a que también se aplique en el estudio de las resistencias a *M. tuberculosis*, en particular para la detección de las mutaciones relacionadas con la resistencia a rifampicina e isoniacida. La resistencia a rifampicina se debe a mutaciones en el gen

rpoB en más del 95% de los casos. La resistencia a isoniacida está asociada principalmente a dos genes: el gen *katG* y el gen *inhA*. El primero, codifica para la enzima catalasa-peroxidasa responsable de la transformación de la isoniacida en su compuesto activo. La mutación más frecuente en este gen se encuentra en el codón 315 y se asocia a un nivel de resistencia alto. El gen *inhA* codifica la enzima enoíl ACP reductasa que participa en los procesos de síntesis de los ácidos micólicos de la pared bacteriana. Las mutaciones en la región reguladora se traducen en un aumento de la síntesis de la enzima, que compensa la acción inhibidora de la isoniacida. Por esa razón, las mutaciones que afectan a ese gen suelen producir una resistencia de bajo nivel. La resistencia a isoniacida puede encontrarse de forma aislada, en cambio las cepas resistentes a rifampicina suelen presentar también resistencia a isoniacida, por lo que la detección de resistencia a rifampicina constituye un marcador de posible multiresistencia¹⁰.

Existen varios ensayos de sondas en línea comercializados para la detección de resistencias. El sistema "INNO-LiPA Rif Tb" permite identificar simultáneamente el complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a rifampicina, mientras que el "GenoType MTBDRplus" detecta el complejo *M. tuberculosis* y las resistencias a rifampicina e isoniacida. Dichos ensayos tienen fijadas diferentes sondas para detectar las mutaciones más frecuentes asociadas a resistencia de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA*. Los resultados obtenidos por ambos ensayos se correlacionan bien con las mutaciones encontradas al realizar la secuenciación genética y con la resistencia fenotípica obtenida por el antibiograma convencional. Cuando se realiza el ensayo a partir del cultivo se obtiene una alta sensibilidad (>90%) y especificidad (>95%) en la detección de resistencias. También se han utilizado dichos ensayos directamente sobre muestras clínicas respiratorias, con una buena sensibilidad para aquellos pacientes con baciloscopia positiva, mientras que es baja en los pacientes con baciloscopia negativa y no se recomienda su uso¹¹⁻¹³. Recientemente se ha comercializado otro nuevo ensayo, "GenoType MTBDRsl", que incorpora las resistencias a fluoroquinolonas (*gen gyrA*), amikacina/capreomicina (*gen rrs*) y etambutol (*gen embA*). La sensibilidad de este ensayo para la detección de resistencias a estos fármacos está en torno al 88%, excepto para el etambutol para el que dis-



minuye notablemente (38,5%). Dicho ensayo ha obtenido un buen rendimiento tanto en las cepas aisladas de cultivo como sobre muestras respiratorias con baciloscopia positiva, aunque por el momento los estudios realizados son todavía escasos¹⁴. En la tabla 1 se resumen la aplicabilidad de los distintos test de ácidos nucleicos para la identificación de especies y detección de mutaciones de resistencia.

Los ensayos moleculares para la detección de resistencias permiten disponer de información mucho más rápidamente en comparación con el antibiograma. Además, cuentan con la ventaja de que el resultado conseguido directamente de la muestra puede ser más representativo de la población bacilar del paciente que el obtenido por cultivo¹⁵. No obstante, presenta importantes inconvenientes. El principal es que, con excepción de la rifampicina, no se conocen las alteraciones genéticas que causan entre el 20% y el 40% de las resistencias a la mayoría de los fármacos de primera línea¹¹. Otra limitación es la escasa sensibilidad que pudiesen tener estos ensayos en detectar poblaciones minoritarias resistentes (heterorresistencia) que fuesen las causantes de la resistencia fenotípica¹⁶.

Técnicas de ácidos nucleicos de reciente incorporación

PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real combina simultáneamente la amplificación genética y su detección mediante sondas fluorescentes (principalmente Taqman o Molecular Beacons) en sistemas automatizados. La combinación de ambos procesos en el mismo tubo de reacción evita la manipulación del producto amplificado minimizando los problemas de contaminación. Además, dicha tecnología es más fácil y rápida que la PCR convencional (resultados en menos de 3 horas), con una mayor sensibilidad y con la posibilidad de poder cuantificar el microorganismo¹⁷.

Existen varios ensayos comerciales con esta tecnología ya disponibles para el diagnóstico de *M. tuberculosis*. Los datos preliminares apuntan a que presenta un incremento de la sensibilidad, sin una merma importante de la especificidad, en el diagnóstico directo sobre muestra frente a la PCR convencional¹⁸. También son prometedores los datos referentes a

la detección de las mutaciones de resistencia a isoniacida y rifampicina^{19,20}. Su mayor desventaja es el elevado coste económico de los equipos.

Xpert MTB/RIF

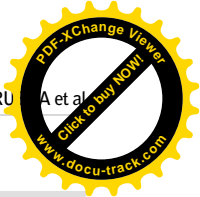
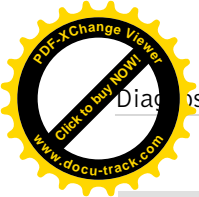
El Xpert MTB/RIF constituye el primer ensayo molecular de amplificación genética para tuberculosis completamente automatizado en todas sus fases (extracción, amplificación y detección). Esto hace que sea un test de muy fácil manejo y que puede ser realizado por el personal de laboratorio con un mínimo entrenamiento. El ensayo es una PCR a tiempo real que utiliza como sondas fluorescentes Molecular Beacons. El Xpert MTB/RIF permite el diagnóstico de *M. tuberculosis* con una cuantificación relativa de la carga bacilar junto con la presencia de mutaciones de resistencia a rifampicina. Los resultados se obtienen en menos de 2 horas y necesita una infraestructura mínima. Hasta el momento, los datos de los ensayos clínicos muestran un excelente rendimiento, tanto en pacientes con baciloscopia positiva como en los que tienen baciloscopia negativa, con una alta exactitud en la determinación de la resistencia a rifampicina^{21,22}. Todavía no se dispone de resultados sobre su rentabilidad en muestras no respiratorias (tabla 2).

El Xpert MTB/RIF figura entre las tecnologías que apoya la OMS para su implantación en zonas con escasos recursos económicos. Su principal inconveniente es el coste económico, no obstante este ensayo está llamado a ser un punto de partida que pueda cambiar el curso de la tuberculosis en dichos países²³.

Nuevas plataformas diagnósticas

Microarrays

Los *microarrays* o biochips son formatos en los que el producto amplificado por PCR se va a hibridar con sondas que se encuentran inmovilizadas en un soporte de sílice o vidrio²⁴. Su principal ventaja es que permite incorporar un mayor número de sondas que los ensayos de sondas en línea. Por lo tanto, con un notable incremento en la capacidad, tanto para la identificación de especies como de detección de mutaciones de resistencia. En la actualidad, existen disponibles



	Sondas de ácidos nucleicos	Ensayos de amplificación con detecc. auto/semiautomática	Ensayos de sondas en línea	PCR a tiempo real	Xpert MTB/RIF
Infraestructura	Mínima	Compleja	Compleja	Compleja	Mínima
Capacitación personal técnico	Media	Alta	Alta	Media	Mínima
Tiempo respuesta	2 horas	2,30-6 horas	1-2 días	3 horas	2 horas
Sensibilidad MTB muestra directa	-	+	+	ND	++*
Cribado MTB multirresistente	-	-	+	-/+**	+

MTB: M. tuberculosis

ND: No datos

*Sensibilidad alta para muestras respiratorias con baciloscopia negativa. **No hay datos sobre el cribado en muestra clínica.

Tabla II. Características operativas y de rendimiento de las técnicas de detección de ácidos nucleicos.

modelos comercializados o que pueden diseñarse a medida según el objeto de estudio. La sensibilidad y especificidad para la detección de mutaciones de resistencia sobre aislados ha sido buena, sin embargo no se conoce su rendimiento sobre muestras clínicas. Aunque se trata de una tecnología de coste elevado, existen modalidades de *microarrays* denominados de "baja densidad" mucho más económicos, que requieren una infraestructura mínima y por lo tanto más fácil de introducir en la rutina diagnóstica^{25,26}.

Pirosecuenciación

La secuenciación genética representa el patrón de referencia tanto para identificar el microorganismo como para conocer la presencia de mutaciones de resistencia. Hasta ahora era un método caro y laborioso, sin embargo recientemente se han producido avances tecnológicos sobresalientes en este campo con el desarrollo de una nueva metodología denominada pirosecuenciación. Se trata de una técnica semiautomatizada, de alto rendimiento y que puede convertirse en una alternativa real a las técnicas actuales.

Los estudios realizados hasta la fecha demuestran que puede ser útil en la identificación de las distintas especies de micobacterias, así como en la determinación de mutaciones de

resistencias a fármacos de primera y segunda línea. Parece que podría aplicarse tanto a partir del aislado del cultivo, como directamente de muestras clínicas respiratorias (con baciloscopia positiva o no) y extrarrespiratorias. No obstante, hacen falta más estudios que confirmen estos datos preliminares²⁷⁻²⁹.

LAMP

El ensayo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) es una técnica de amplificación genética que usa una reacción de desplazamiento de hebra. Tiene lugar a una temperatura constante, por lo que no requiere termociclador, y puede ser realizada en menos tiempo que la PCR (alrededor de 1 hora). La amplificación y la detección pueden ser completadas en un solo paso. Es altamente específica y eficiente, produciendo enormes cantidades de producto amplificado que permiten su detección de forma sencilla por visualización de turbidez o fluorescencia. Sus ventajas de rapidez, simplicidad y mínimos requerimientos de infraestructura la hacen una técnica prometedora para países con escasos medios. Existen ensayos basados esta tecnología destinados tanto al diagnóstico de *M. tuberculosis* como a la detección de resistencias, pero de momento no hay ninguno disponible comercialmente^{30,31}.



En conclusión, las técnicas moleculares han supuesto una mejora notable permitiendo un diagnóstico de *M. tuberculosis* más rápido y específico, y orientando sobre el manejo del paciente al detectar mutaciones de resistencia. No obstante, todavía presentan limitaciones como su escaso rendimiento al trabajar con muestras paucibacilares o extrarrespiratorias, o la todavía no buena correlación entre las resistencias genotípicas y las fenotípicas. Es más que probable que estas desventajas se solucionen en un futuro próximo, lo que junto con el avance vertiginoso de las técnicas y su universalización, hagan de estas herramientas un pilar básico en el diagnóstico y control de la tuberculosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO Report 2009. WHO, Geneva, Switzerland 2009.
2. WHO. Global Tuberculosis Control: A Short Update to the 2009 Report. WHO, Geneva, Switzerland 2009.
3. van Kampen SC, Anthony RM, Klatser PR. The realistic performance achievable with mycobacterial automated culture systems in high and low prevalence settings. *BMC Infect Dis* 2010, 10:93.
4. WHO. Anti-tuberculosis Drug resistance in the world. Fourth Global Report 2008.
5. Alcaide Fernández F. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006, 24 Supl 1:53-7.
6. Nolte FS, Caliendo AM. Molecular detection and identification of microorganisms. En "Manual of Clinical Microbiology" 9th edition. Eds: Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH, Pfaller MA. ASM Press. Washington DC, 2007.
7. Alcaide Fernández F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias. 2005.
8. Domínguez J, Blanco S, Lacoma A, García-Sierra N, Prat C, Auxina V. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008, 26 Supl 9:33-41.
9. Balasingham SV, Davidsen T, Szpinda I, Frye SA, Tonjum T. Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy. *Molecular diagnosis & therapy* 2009,13:137-51.
10. Zhan Y, Yew WW. Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009, 13:1320-30.
11. Cuevas-Córdoba B, Zenteno-Cuevas. Tuberculosis drogoresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010, 28:621-8.
12. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2005, 5:1-9.
13. Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML. Direct susceptibility testing for multidrug resistant tuberculosis: a meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2009, 9:67.
14. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2009, 47:1767-72.
15. Martín A, Herranz M, Ruiz Serrano MJ, Bouza E, García de Viedma D. The clonal composition of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens could be modified by culture. *Tuberculosis (Edinb)* 2010, 90:201-7.
16. Cho SN, Brennan PJ. Tuberculosis: diagnostics. *Tuberculosis (Edinb)* 2007, 87 Suppl 1:S14-7.
17. Parashar D, Chauchan DS, Sharma VD, Katoch VM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res* 2006, 124:385-98.
18. Kim JH, Kim YJ, Ki CS, Kim JY, Lee NY. Evaluation of COBAS TaqMan® MTB PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* (en prensa).
19. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000, 38:3194-9.
20. García de Viedma D, del Sol Díaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002, 40:988-95.
21. Blakemore R, Story E, Helb D, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol* 2010, 48:2495-501.
22. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010, 363:1005-15.
23. Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis – Time for a game change. *N Engl J Med* 2010, 363:1070-71.
24. Mikhailovich V, Gryadunov D, Kolchinsky A, Makarov AA, Zasedatelev A. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases. *Bioessays* 2008, 30:673-82.
25. Yao C, Zhu T, Li Y, et al. Detection of *rpoB*, *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray. *Clin Microbiol Infect* 2010, 16:1639-43.



26. Aragón LM, Navarro F, Heiser V, Garrigó M, Español M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J Antimicrob Chemother* 2006, 57:825-31.

27. Bao JR, Master RN, Schwab DA, Clark RB. Identification of acid-fast bacilli using pyrosequencing analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010, 67:234-8.

28. Bravo LT, Tuohy MJ, Ang C, et al. Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampin, isoniazid, and fluoroquinolones. *J Clin Microbiol* 2009, 47:3985-90.

29. Halse TA, Edwards J, Cunningham PL, et al. Combined real-time PCR and *rpoB* gene pyrosequencing for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and determination of rifampin resistance directly in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2010, 48:1182-8.

30. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol* 2003, 41:2616-22.

31. Geojith G, Dhanasekaran S, Chandran SP, Kenneth J. Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a resource limited setting. *J Microbiol Methods* (en prensa).