

Capítulo I.

Diagnóstico de tuberculosis: Desde Robert Koch hasta la actualidad

Gustavo Díaz

Luisa María Nieto Ramirez

Cita este capítulo:

Díaz G, Nieto Ramirez LM. Diagnóstico de tuberculosis: Desde Robert Koch hasta la actualidad. En: Nieto Ramirez, L.M. (ed.). *Estudios de la tuberculosis desde la Sucursal del Cielo*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali, Editorial Universidad Icesi; 2021. pp. 15-46. DOI: <https://doi.org/10.35985/9789585147256.1>

Capítulo I.

Diagnóstico de tuberculosis: Desde Robert Koch hasta la actualidad

Gustavo Díaz¹

<https://orcid.org/0000-0002-9313-1936>

Luisa María Nieto Ramirez²

<https://orcid.org/0000-0003-1566-5876>

Abstract. *Until the end of the 19th century, the diagnosis of tuberculosis (TB) rested solely on clinical approaches. Subsequently, Koch laid the foundations of the microbiological diagnosis of TB: microscopy and culture of Mycobacterium tuberculosis (Mtb). Today, these techniques remain as the basis for routine TB diagnosis in many countries. In fact, culturing Mtb is the gold standard for both diagnosis and TB treatment follow-up, either in solid (Lowenstein-Jensen, Ogawa, 7H11) or liquid culture systems (MGIT960, Proskauer-Beck, 7H9, among others). The advent of molecular methodologies led to the development of GeneXpert MTB/RIF (amplification of rpoB to identify Mtb and resistance to rifampicin, directly from sputum samples). Other molecular methods include LAMP-TB: isothermal amplification of IS6110 and gyrB, LPA: detection of resistance to first- and second-line drugs using DNA probes in nitrocellulose strips. The challenge imposed by the diagnosis of co-infected TB/HIV patients led to the development of LAM-TB. The latter method is based on the detection of Lipoarabinomannan in the urine of severely immunocompromised individuals with HIV-AIDS. Currently, the search for biomarkers in serum and urine represents a promising alternative. Metabolites, microRNAs and proteins derived from both Mtb and the human host have been also sought. In the last decades, the application of “omics” sciences has been decisive for the search of new TB biomarkers for diagnosis and prognosis.*

1. Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM
Universidad Icesi. Cali, Colombia.

✉ diaz.gustavo2011@gmail.com

2. Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia.

✉ nieto.luisa@gmail.com

Resumen. Hasta finales del siglo XIX la única alternativa para el diagnóstico de tuberculosis (TB) eran las aproximaciones clínicas. Posteriormente, Koch sentó las bases del diagnóstico microbiológico de TB: microscopía y cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), técnicas que siguen siendo hoy la base del diagnóstico rutinario de TB en muchos países. El cultivo de Mtb es el estándar de oro de diagnóstico y seguimiento al tratamiento de TB, bien sea cultivo sólido (Lowenstein-Jensen, Ogawa o 7H11) o cultivo líquido (MGIT960, Proskauer-Beck, 7H9, entre otros). El advenimiento de metodologías moleculares llevó al desarrollo del GeneXpert MTB/RIF (amplificación de *rpoB* para identificar Mtb y resistencia a rifampicina, directo del esputo). Otros métodos moleculares incluyen: LAMP-TB: amplificación isotérmica de IS6110 y *gyrB*, LPA: detección de resistencia a medicamentos de primera y segunda línea con sondas de ADN en tiras de nitrocelulosa. El reto impuesto por el diagnóstico de pacientes coinfectados TB/VIH llevó al desarrollo de LAM-TB. Este último detecta Lipoarabinomanano en la orina de individuos severamente comprometidos con VIH-SIDA. Actualmente, la búsqueda de biomarcadores en suero y orina representa una alternativa prometedora. Se vienen buscando metabolitos, microARNs y proteínas derivadas tanto de Mtb como del huésped humano. La aplicación de ciencias “ómicas” en las últimas décadas ha sido determinante para la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico.

Palabras clave: diagnóstico, IGRA, biomarcadores, TB latente, exosomas.

Aspectos históricos del diagnóstico clínico y microscópico de la tuberculosis

El diagnóstico de la tuberculosis (TB) estuvo por muchos siglos fundado en observaciones clínicas. EL desconocimiento del mundo microscópico y la falta de herramientas para detectar los microorganismos imposibilitaba siquiera concebir, que estos pudieran actuar como agentes etiológicos de enfermedades. Uno de los primeros informes en los que se describe presuntivamente el diagnóstico clínico de TB se encuentra en los aforismos hipocráticos descritos alrededor del año 400 a. C. (1). En estos reportes

ancestrales se describe una patología denominada tisis o consunción, la cual afectaba hombres y mujeres entre los 18 y los 35 años y se caracterizaba por una serie de síntomas pulmonares que incluían pleuritis con supuración y expectoración de sangre y pus, que llevaba generalmente a la muerte del individuo afectado (1). Otro ejemplo histórico del diagnóstico clínico de la TB está en los reportes de Galeno quien describió que los pacientes con tisis constantemente presentaban fiebre, sudoración y expectoraciones sanguinolentas. Galeno fue pionero (alrededor del año 170 de nuestra era) en sugerir que la TB podría pasar de una persona a otra al advertir que se debía evitar el contacto con las personas enfermas (2). Un giro histórico para el diagnóstico clínico de la TB se logró en 1816, cuando René Theophile Hyacinthe Laënnec descubrió el estetoscopio. Laënnec estudio con detalle los sonidos del corazón y los pulmones y los asoció a condiciones patológicas que encontraba durante el estudio *post mortem* de los órganos de sus pacientes. Las observaciones de Laënnec sobre los sonidos del cuerpo y su relación con afecciones pulmonares, mejoraron la precisión del diagnóstico clínico de pacientes con tisis (TB). Asimismo, Laënnec pudo definir la existencia de dos formas clínicas de TB, la pulmonar y la extrapulmonar (3).

El avance histórico tal vez más significativo en el diagnóstico de la TB fue posible gracias al encuentro de dos logros sorprendentes en la historia de la ciencia humana: el desarrollo y perfeccionamiento del microscopio y la confirmación de la teoría del germen de la enfermedad (4). Sobre la base de trabajos anteriores hechos por Galileo Galilei en 1609, se inventaron dos tipos diferentes de microscopio durante las últimas décadas del siglo XVII. Sus inventores, Robert Hook y Antonj van Leeuwenhoek, trabajando de forma independiente, pudieron describir y publicar las observaciones de estructuras diminutas de corchos, semillas e insectos. Sin embargo, fueron los trabajos de Leeuwenhoek, quien reportó de manera sistemática sus observaciones de diminutos organismos los cuales denominó “*animálculos*”, los que abrieron las puertas de un nuevo universo, el de los microorganismos (5). Poco después de las observaciones de Leeuwenhoek, Benjamin Marten, tal vez inspirado por la confirmación de la existencia de un universo de organismos vivos a escala microscópica, publicó en 1720, la que él

denominó: “La nueva teoría de las consunciones: más especialmente de una tisis o consunción de los pulmones”. En dicha publicación Marten asegura que la causa de la “inexplicable enfermedad” es un *animálculo* que infecta los pulmones. Esta fue quizás la primera vez en la historia de la humanidad, donde se propuso a un organismo vivo infectante como la posible causa de la consunción (TB) (6). Dicha hipótesis sería confirmada 163 años después por Robert Koch.

El 10 de abril de 1882 se publicó *Die Ätiologie der Tuberkulose*, donde Koch demostró de la manera más refinada que el “bacilo de la tuberculosis”, era el agente causal de la enfermedad que lleva su nombre (enfermedad de Koch). Vale la pena mencionar que el termino tuberculosis había sido acuñado décadas antes (1839) por el naturista Johann Lukas Schönlein (2). Koch había presentado ese trabajo 17 días antes, el 24 de marzo de 1882 (actualmente el día internacional de la lucha contra la TB) ante la Sociedad de Fisiología de Berlín. En el desarrollo de sus tesis sobre el origen de la TB, Koch describió la primera técnica para teñir y visualizar microscópicamente el agente etiológico de la enfermedad, *Mycobacterium tuberculosis* (7). La demostración de que *M. tuberculosis* era visible por microscopía dio lugar a que muchos científicos trabajaran en el desarrollo de diferentes métodos de tinción para mejorar la visualización del bacilo. De manera sobresaliente, Franz Ziehl y Friedrich Neelsen continuaron con el trabajo de tinción basado en la técnica desarrollada por Koch. Dicho procedimiento combinaba la utilización de un mordiente, la aplicación de calor y el uso de un reactivo decolorante. Si bien al perfeccionamiento de esta técnica de tinción se le conoce generalmente como “tinción Ziehl-Neelsen”, es importante mencionar que este proceso de tinción fue el resultado de esfuerzos independientes iniciados por Paul Ehrlich, Ziehl, y finalmente, la combinación de estos trabajos con los desarrollados posteriormente por Neelsen (8). Los principios de coloración para la detección microscópica de *M. tuberculosis* desarrollados entre 1882 y 1887, todavía se utilizan hoy día en muchos países como método de rutina para el diagnóstico y seguimiento de la TB.

Aunque los principios de esta técnica de tinción han permanecido, se han realizado varias modificaciones a los colorantes y reactivos utilizados. La modificación realizada por Joseph J. Kinyoun alrededor de 1896 (publicada formalmente en 1914) (8, 9), es actualmente la más utilizada en preparaciones derivadas de cultivo. El método de Kinyoun se diferencia del método de Ziehl-Neelsen en que es un procedimiento de tinción en frío para bacilos ácido-alcohol resistentes. Más tarde, en 1938, Hagemann desarrolló un método fluorescente para detectar *M. tuberculosis* mediante la tinción con auramina (10). Después de varias mejoras realizadas al método original de Hagemann, Truant desarrolló, en 1962, uno de los métodos alternativos más importantes para el diagnóstico de la TB: la tinción fluorescente de auramina y rodamina. Esta tinción fluorescente de *M. tuberculosis* sigue los mismos principios de la tinción ácida, pero reemplaza la fucsina con los fluorocromos auramina O y rodamina B (11). El examen microscópico de muestras de esputo de pacientes con TB, denominado baciloscopia, ha constituido una de las principales herramientas para el diagnóstico de esta enfermedad especialmente en países de bajos y medianos ingresos. La baciloscopia presenta ventajas notables para el diagnóstico de TB: bajo costo, modestos requisitos de infraestructura y resultados relativamente rápidos. Sin embargo, tiene también múltiples desventajas, entre las que se cuenta su baja sensibilidad (detecta entre 1.000 y 10.000 Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL de esputo) especialmente en pacientes coinfectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH (que va del 20% al 60%) quienes usualmente presentan bajas cargas de bacilos a nivel pulmonar (TB paucibacilar), inhabilidad para diferenciar especies de micobacterias ácido alcohol resistentes y la necesidad de personal altamente entrenado para obtener resultados satisfactorios (12, 13). Se ha demostrado que el uso de microscopía fluorescente (actualmente la OMS recomienda el uso de fluorescencia tipo LED-*light emitting diode*) es estadísticamente más sensible (6% más sensible) que la baciloscopia por microscopía tradicional sin pérdida de la especificidad (14).

Métodos diagnósticos basados en cultivo

La estrategia experimental desarrollada por Robert Koch para identificar el agente etiológico de la TB, lo llevó a establecer las bases para el cultivo microbiológico de *M. tuberculosis* (7). Antes de Koch otros habían contemplado la idea de una posible causa infecciosa de la TB (Marten, por ejemplo), sin embargo, ante la imposibilidad de demostración por los métodos microbiológicos de la época (segunda mitad del siglo XIX) todos sin excepción habían renunciado a esta idea. Para el cultivo de *M. tuberculosis*, Koch inicialmente utilizó un medio sólido muy simple, hecho de suero de vaca o de oveja y técnicas tradicionales de la época, el único componente especial del protocolo de Koch fue su inquebrantable paciencia. Decidió mantener los cultivos en incubación por encima de diez días, tiempo en el cual las micobacterias empezaron a formar diminutas colonias visibles macroscópicamente (7). Varias modificaciones al medio original utilizado por Koch se han desarrollado desde entonces. Inicialmente, *M. tuberculosis* se cultivó en diferentes medios sólidos a base de agar y huevo (15). Una de las múltiples preparaciones a base de huevo fue desarrollada originalmente por Wessely y Lowenstein en 1931, y posteriormente modificada por Jensen en 1932, dando lugar al Lowenstein-Jensen (LJ), uno de los medios de cultivo para *M. tuberculosis* más utilizados en el mundo (16). El medio LJ obtiene su color característico gracias al verde de malaquita; este es adicionado para inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes, lo que hace que este medio sea muy útil para la evaluación de muestras de esputo en entornos clínicos. Dos modificaciones de los medios LJ se utilizan comúnmente en los países de bajos y medianos ingresos. El primero, desarrollado por Ogawa en 1950 (Medio de Ogawa) y el segundo, una versión modificada de Ogawa (Ogawa-Kudoh) desarrollada por Kudoh y Kudoh en 1974. En estas versiones modificadas, se omite la adición del aminoácido asparagina, haciendo la preparación menos costosa, pero también menos sensible dado que no se concentra la muestra (17). Simultáneamente al desarrollo de medios de cultivo sólido para *M. tuberculosis*, se empezaron a desarrollar alternativas de cultivo líquido. Proskauer y Beck en 1894, establecieron las bases para el desarrollo de un medio líquido sintético (medio PB) que

contenía asparagina como única fuente de nitrógeno y glicerol como la única fuente de carbono. El medio PB todavía se utiliza, principalmente como un medio mínimo (o simple) para experimentos en los que la albúmina y el Tween 80 pudieran generar interferencias en aplicaciones posteriores (18).

Finalmente, una de las contribuciones más significativas para el mejoramiento del cultivo de *M. tuberculosis*, es el trabajo realizado por Rene Jules Dubos y Gardner Middlebrook durante la década de 1940. Estos científicos desarrollaron la formulación para el medio a base de agar Middlebrook 7H11 y el medio líquido Middlebrook 7H9 (19, 20). Ambos medios son ampliamente utilizados en la investigación y entornos clínicos en la actualidad. El desarrollo de un medio líquido para el crecimiento de *M. tuberculosis* permitió el diseño de varias metodologías semi y totalmente automatizadas para diagnosticar TB. A continuación, se presentan algunos ejemplos emblemáticos. El sistema de cultivo de micobacterias SEPTI-CHEK™ AFB se desarrolló a fines de la década de 1990. Este sistema combinó el medio 7H9 y tres medios sólidos: 7H11, un medio a base de huevo y un medio agar-chocolate, este último para detectar contaminaciones, en un sistema cerrado (21). Más tarde, Becton-Dickinson lanzó un sistema radiométrico semiautomático, Bactec 460. En este sistema, el crecimiento de *M. tuberculosis* se determinaba cuantificando el $^{14}\text{CO}_2$ liberado después del metabolismo de un sustrato marcado con ^{14}C en el medio (22). Al igual que el Bactec 460, se han desarrollado tres sistemas adicionales basados en cultivos que utilizan diferentes sensores para detectar el crecimiento de micobacterias. Primero, el Versa TREK (Trek Diagnostic Systems), que es un sistema semiautomático en el que se evalúa el crecimiento de *M. tuberculosis* mediante la detección de cambios en la presión dentro del tubo de cultivo (13). En segundo lugar, el BacT/ALERT MB (bioMérieux) que contiene un sensor de gas que cambia de color a medida que el CO_2 es producido por microorganismos en crecimiento (23).

Finalmente, el tubo indicador de crecimiento de micobacterias BACTEC-MGIT-960, que es un sistema totalmente automatizado que utiliza el sensor fluorescente, pentahidrato de rutenio, este emite fluorescencia en presencia

de bacterias con metabolismo aeróbico, cuando el oxígeno es consumido y reemplazado por dióxido de carbono (24). Los sistemas automatizados se utilizan ampliamente en entornos hospitalarios y se han adaptado para realizar pruebas de susceptibilidad a los medicamentos. El uso de cultivo mejoró notablemente el diagnóstico de TB. El cultivo sólido es aproximadamente 100 veces más sensible que la baciloscopia, detectando de 10 a 100 UFC/mL de espécimen (13), mientras que el cultivo líquido puede detectar desde 1 a 50 UFC/mL (25). Una de las grandes desventajas del cultivo está relacionada con el lento crecimiento de *M. tuberculosis*; cuando se utiliza cultivo sólido los tiempos de espera que pueden ser hasta de doce semanas. Sin embargo, la introducción de medio líquido en la rutina diagnóstica de TB ha permitido mejorar notablemente los tiempos de espera que pueden ser tan bajos como diez días con el BACTEC-MGIT-960 (13). Otra desventaja para el uso de cultivo es la necesidad de infraestructura relativamente compleja. No obstante, el cultivo de *M. tuberculosis* sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de la TB y la evaluación de la respuesta al tratamiento (14).

El uso de herramientas de biología molecular en el diagnóstico de TB

A finales de la década de 1980's se empezó a generalizar el uso de diferentes metodologías para la detección de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis* con fines diagnósticos. Los primeros ensayos desarrollados utilizaron pruebas radio-marcadas que identificaban secuencias específicas del genoma bacteriano (26). La mayor limitación de este tipo de ensayos era la necesidad de una gran cantidad de material genético bacteriano, haciéndolos en la mayoría de casos dependiente del cultivo (27). Alternativamente, y con el potencial de superar la necesidad de cultivo, surgieron las pruebas basadas en la Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAAT, del inglés *Nucleic Acid Amplification Tests*) mediante PCR (27). Los NAAT representan una alternativa prometedora para la detección rápida y específica de la infección por *M. tuberculosis* y como tal han sido la base para el desarrollo de una enorme variedad de ensayos y dispositivos con potencial diagnóstico. Una lista de las más recientes herramientas diagnósticas para TB en sus

diferentes etapas de desarrollo se presenta en la Tabla 1. Dentro de los métodos moleculares el Gene Xpert MTB/RIF es el que mayor impacto y aceptación ha tenido. En este método se procesan muestras de esputo en un sistema de cartucho cerrado amplificando mediante PCR el gen *rpoB* de *M. tuberculosis*. La ventaja más evidente de este método es que permite resultados confiables en dos horas, además de que es altamente sensible. La versión inicial tenía una capacidad de detección de 131 UFC/mL de esputo, mientras que la nueva versión Xpert Ultra es mucho más sensible (detecta hasta 15.6 UFC/mL), esta mayor sensibilidad se logra al amplificar regiones de inserción las cuales se encuentran en múltiples copias en el genoma de la micobacteria (*IS6110* e *IS1810*) (28).

Un enfoque molecular completamente diferente es la implementación de espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por una matriz por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) para detectar un patrón espectrométrico de proteínas específico para *M. tuberculosis*. En el ensayo MALDI-TOF MS, se utilizan cultivos puros de *M. tuberculosis* para generar bibliotecas espectrales. Luego, la muestra desconocida se procesa y los espectros se comparan con la biblioteca para su identificación (29). Esta tecnología podría tener gran impacto en la identificación de especies para discriminar *M. tuberculosis* de otras micobacterias no tuberculosis; se ha evidenciado capacidad para discriminar género en 85% de los casos y especie en 71% de casos, comparado con métodos de referencia moleculares (30).

Tabla 1. Pruebas moleculares actualmente reportadas por la Organización Mundial de la Salud para diagnóstico de tuberculosis y/o detección de resistencia a fármacos. Tabla adaptada del Reporte Global de Tuberculosis de la OMS de 2019 (14)

Prueba	Principio
Tecnologías avaladas por la OMS	
Xpert MTB/RIF and Xpert Ultra	Utiliza muestras de esputo. Proceso automatizado en un cartucho cerrado. La detección de <i>M. tuberculosis</i> es mediada por la amplificación de una región del gen <i>rpoB</i> . La resistencia a rifampicina es detectada por mutaciones en una subregión del fragmento amplificado de <i>rpoB</i> , utilizando PCR en tiempo real y sondas de horquilla. En el Caso de Xpert Ultra, el test está dirigido a los genes de múltiples copias <i>IS6110</i> / <i>IS1810</i>
Ensayos con sondas en línea (<i>line probe assays</i> -LPA), FL-LPA Hain Lifescience, Germany and Nipro, Japan SL-LPA), Hain Lifescience, Germany	Utiliza muestras de esputo con baciloscopia y/o cultivo positivo. Amplificación mediante PCR múltiple de fragmentos de genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea: rifampicina (<i>rpoB</i>) e isoniacida (<i>inhA</i> y <i>katG</i>) y de segunda línea: aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Los fragmentos amplificados reaccionan con tiras reactivas de nitrocelulosa que contienen regiones complementarias.
TB LAMP, Eiken, Japan	Utiliza muestras de esputo. El DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> es amplificado por métodos isotérmicos y los genes blanco son <i>IS6110</i> y <i>gyrB</i> . La OMS ha sugerido que esta prueba podría reemplazar a la evaluación microscópica en personas con signos y síntomas compatibles con TB.
Metodologías agendadas para ser evaluadas Por la OMS en 2019-2020	
FluoroType MTBDR, Hain Lifescience, Germany	Utiliza muestras de esputo y cultivo. El diagnóstico de TB se da mediante la amplificación de <i>rpoB</i> usando LATE-PCR. Detecta resistencia a fármacos de primera línea rifampicina (<i>rpoB</i>) e isoniacida (<i>inhA</i> y <i>katG</i>). Se pueden procesar 96 muestras al tiempo.
m2000 RealTime MTB System, Abbott, USA	Utiliza muestras de esputo. El diagnóstico de TB se da mediante la amplificación de <i>IS6110</i> y el gen <i>pab</i> . Detecta resistencia a fármacos de primera línea rifampicina (<i>rpoB</i>) e isoniacida (<i>inhA</i> y <i>katG</i>). Se pueden procesar 96 muestras al tiempo. La amplificación es mediante PCR en tiempo real.

BD Max MDR-TB, Becton Dickinson, USA	Utiliza muestras de esputo. El diagnóstico de TB se da mediante la amplificación de <i>IS6110</i> e <i>IS1081</i> . Detecta resistencia a fármacos de primera línea rifampicina (<i>rpoB</i>) e isoniácida (<i>inhA</i> y <i>katG</i>). Se pueden procesar 24 muestras al tiempo. La amplificación es mediante PCR en tiempo real.
Roche cobas® MTB system, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland ECHN	Utiliza muestras de esputo. El diagnóstico de TB se da mediante la amplificación de <i>16S ARNr</i> y cinco genes del complejo <i>esx</i> . Detecta resistencia a fármacos de primera línea rifampicina (<i>rpoB</i>) e isoniácida (<i>inhA</i> y <i>katG</i>). Se pueden procesar 96 muestras al tiempo. La amplificación es mediante PCR en tiempo real.
Radiología	Detección asistida por computador. Análisis computacional de imágenes digitales de rayos X de tórax. No hay evidencia hasta el momento de recomendación por parte de la OMS.

Fuente: Elaboración propia

El problema con este enfoque es la necesidad de cultivar la muestra antes del análisis. En general, el alto costo y la necesidad de una infraestructura compleja (con excepción de LAMP TB) son los obstáculos que actualmente se afrontan para la implementación de estos enfoques de diagnóstico molecular de TB, especialmente en países de bajos y medianos ingresos.

Diagnóstico de TB en personas coinfectadas con el VIH

El diagnóstico de TB en personas coinfectadas con el VIH enfrenta un reto adicional debido a que los pacientes con TB/VIH a menudo desarrollan formas diseminadas de la enfermedad. En consecuencia, las herramientas diagnósticas tradicionales que dependen de muestras de esputo presentan muy baja sensibilidad y especificidad (31). En este grupo de pacientes coinfectados TB/VIH, se ha encontrado una molécula distintiva de la micobacteria: el lipoarabinomano (LAM) en la orina de los individuos, especialmente en aquellos con infección diseminada. LAM es un lipopolisacárido (o lipoglicano) presente en gran abundancia en la pared celular de *M. tuberculosis* y se considera un análogo del lipopolisacárido de

las bacterias Gram negativas por su potencial endotóxico y sus composición bioquímica. La sensibilidad de la prueba depende del estado de la infección por VIH de los pacientes y su recuento de linfocitos CD4+ (31). Basados en la detección de LAM se han desarrollado varios tipos de ensayos. Clearview TB, es un ensayo inmuno-absorbente ligado a enzima (ELISA) que permite una detección cuantitativa de LAM en orina; se ha demostrado que esta prueba incrementa su sensibilidad cuando la orina se concentra 100 o más veces (32). Alternativamente, una versión simplificada de inmunoensayo de detección de LAM es la prueba Alere Determine™ TB-LAM-Ag. Este es un ensayo de flujo lateral de fácil ejecución, que se puede usar en puntos de atención médica con infraestructura mínima (*point of care assay*) y que proporciona resultados rápidos (31, 33). La sensibilidad de las pruebas de LAM es baja en pacientes VIH negativos (10% a 20%), pero aumenta en pacientes VIH positivos con un promedio de 56% (33). La sensibilidad de la prueba LAM es aún mayor (66.7%) en pacientes VIH positivos con recuentos de células T CD4 + muy bajos (50 células/ μ l) (34, 35). En el año 2015, la OMS publicó una política guía donde se recomienda el uso de TB-LAM exclusivamente en pacientes con estados avanzados de HIV (36).

Métodos diagnósticos para detectar la infección tuberculosa latente (ITBL)

La OMS ha definido la ITBL como un estado de respuesta inmunológica constante a la estimulación por antígenos y moléculas de la micobacteria, caracterizado por ausencia de signos y síntomas de la enfermedad activa (37). Para diagnosticar esta forma de TB, en lugar de buscar directamente el microorganismo, la infección o la exposición a *M. tuberculosis* se evalúa mediante la respuesta inmune del huésped. Una de las pruebas representativas que se fundamenta en la respuesta inmune del paciente, es la prueba intradérmica de tuberculina (también conocida como método de Mantoux o prueba cutánea de PPD). Actualmente, esta prueba representa la mejor herramienta para identificar la infección latente. Curiosamente las bases experimentales para el desarrollo de este test también fueron

establecidas por Koch en 1890 (38). Inicialmente, Koch consideró que la inyección de un preparado (inactivado) del cultivo de *M. tuberculosis* (posteriormente denominado tuberculina) podría ser un tratamiento para la TB a modo de “vacuna”. Poco después, se demostró que era ineficaz para prevenir la enfermedad, sin embargo, la tuberculina generaba en algunas de las personas inoculadas una reacción cutánea, circunstancia que sería aprovechada posteriormente como estrategia diagnóstica (38). Los hallazgos de la exposición a la tuberculina fueron estudiados más a fondo por Von Pirquet quien en 1907 desarrolló la primera prueba cutánea para identificar exposición a *M. tuberculosis* (39). Con base en los estudios de Von Pirquet, Charles Mantoux propuso la inyección intradérmica de tuberculina (38). Posteriormente, Florence Seibert, en 1934, realizó varios estudios tratando de definir una composición estandarizada de tuberculina, actualmente conocida como derivado de proteína purificada (PPD, nombre con el que también se le conoce a la prueba de tuberculina) (38, 40). La prueba cutánea de la tuberculina (TST, por sus siglas en inglés *tuberculin skin test*) se fundamenta en una reacción de hipersensibilidad de tipo IV en la que los linfocitos T CD4+, previamente expuestos a antígenos micobacterianos, migran al sitio de inyección de PPD (41). La PPD es actualmente la principal herramienta para identificar individuos con infección latente, desafortunadamente, la vacuna con el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y/o la infección con micobacterias no tuberculosas (MNT) pueden llevar a resultados falsos positivos. Entre otras limitaciones de la PPD, está la incapacidad para discriminar entre TB latente y TB activa, y la baja sensibilidad en pacientes con algún nivel de inmunosupresión. En el caso específico de pacientes con coinfección TB/VIH la lectura del test se ve fuertemente afectada por la reducción en la induración característica de un test positivo (40, 42). Alternativamente, los ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA, por sus siglas en inglés *Interferon-Gamma Release Assays*), son específicos para *M. tuberculosis* y presentan una mayor sensibilidad, siendo la alternativa al PPD para identificar individuos con ITBL coinfectados con VIH (aunque se debe resaltar que con el progreso de la infección por VIH decrece la sensibilidad), niños y mujeres embarazadas. Dos IGRA se utilizan ampliamente en entornos clínicos: la prueba QuantiFERON-TB Gold In-

Tube (QFT-GIT) y la prueba T-SPOT TB (T-Spot). QFT-GIT utiliza una combinación de antígenos de las proteínas micobacterianas ESAT-6, CFP10 y TB7.7. Estos antígenos no están presentes en el BCG ni en la mayoría de las MNT. Para la prueba, la sangre de un individuo se mezcla con los antígenos, en caso de exposición previa a *M. tuberculosis* se determina con base en la concentración de interferón gamma liberado (43, 44). Por otro lado, la prueba del T-Spot determina la infección por *M. tuberculosis* en función del número de células que producen interferón gamma utilizando un ensayo de inmunotransferencia ligado a enzimas. T-Spot utiliza los antígenos ESAT-6 y CFP10, por separado (45).

Además de los IGRA, se han desarrollado varias pruebas serológicas para una variedad de proteínas de *M. tuberculosis*: el antígeno de 38 KDa, HspX, ESAT-6, Ag85 entre otras (46, 47), en este caso dirigidas a la identificación de pacientes con TB activa. Sin embargo, la mayoría de estas pruebas han mostrado un rendimiento deficiente en el diagnóstico de TB con sensibilidades que van del 0,97% al 59% comparado con el cultivo. Consecuentemente, en 2011, la OMS declaró que los datos asociados con la evaluación de las pruebas serológicas para TB eran de baja calidad y que la cantidad de resultados falsos positivos y falsos negativos estaba impactando adversamente al paciente. Razón por la cual, la OMS recomendó que los clínicos no utilicen este tipo de pruebas en la rutina de diagnóstico de TB, entretanto no se genere nueva evidencia (48). En general, aparte de IGRA, la mayoría de las pruebas de diagnóstico desarrolladas para probar muestras diferentes al esputo (por ejemplo: suero u orina) se han centrado en la detección de biomoléculas de la micobacteria incluyendo proteínas, lipoglicanos y/o, como ya se mencionó antes, ácidos nucleicos. La evaluación combinada de marcadores derivados del huésped con los derivados de la bacteria podría aumentar la capacidad para el diagnóstico de TB y la identificación de diferentes etapas de evolución de TB entre infección y enfermedad activa.

TB en cifras y retos diagnósticos actuales

Según la OMS, alrededor de 7 millones de casos de TB pulmonar fueron notificados en 2018 por los programas nacionales de TB en todo el mundo, sobre un total de 10 millones de casos estimados. Se evidencia una brecha de notificación del 30% (14). Una brecha adicional del 45% fue observada entre los casos notificados y los que se confirmaron microbiológicamente (14). Es importante resaltar que la brecha entre los casos estimados y el número de casos notificados se ha mantenido constante desde el primer reporte de TB de la OMS en 1997. Dos razones principalmente podrían explicar esta brecha: 1) la falta de sistemas de información eficientes, especialmente en los países con mayor carga de TB; y 2) la falta de herramientas de diagnóstico más accesibles (limitaciones para acceder a los sistemas de salud), sensibles y precisas. La microscopía y el cultivo de muestras de esputo siguen siendo las dos herramientas más importantes para la confirmación bacteriológica de TB pulmonar, de hecho, la mayoría de los 3 millones de casos de TB que se confirmaron en 2018 fue únicamente con microscopía (14).

Otro componente importante que contribuye a la epidemia de TB es la gran proporción de casos de ITBL. Una reciente reevaluación del estimado de personas con ITBL en el mundo, mostró que aproximadamente el 25% de la población global tiene infección latente y se estima que del 5% al 10% desarrollará enfermedad activa en el transcurso de su vida (49, 50). El riesgo de progreso de ITBL a infección TB activa incrementa 10% cada año en personas que se coinfectan con el VIH (51). Desafortunadamente, las dos estrategias disponibles para la identificación de ITBL, TST e IGRA, son ensayos inmunológicos dependientes de células T y la inmunosupresión afecta gravemente su sensibilidad; lo que hace que sean insuficientes o poco efectivas para detectar la ITBL en pacientes con estados avanzados de infección por VIH. De hecho, a medida que disminuye el recuento de células CD4 +, disminuye la efectividad de IGRA (52). Dos grandes retos diagnósticos permanecen como prioridad para mejorar el control de la TB a nivel mundial: 1) No existe ninguna prueba que permita discriminar

la TB activa de ITBL; y 2) no hay ninguna prueba que permita identificar personas con infección latente que se encuentren en proceso de desarrollar enfermedad activa.

Biomarcadores de TB de muestras diferentes al esputo: la clave para nuevos desarrollos diagnósticos

Como se ha mencionado hasta ahora la mayoría de los enfoques para el diagnóstico de TB, depende de la visualización microscópica, el cultivo o la detección de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*. Además, la mayoría de las pruebas emplean muestras de esputo, donde usualmente se concentran las bacterias, particularmente en aquellos casos donde la presentación clínica es pulmonar (presentación clínica más frecuente de TB). Sin embargo, es importante tener en cuenta que depender de muestras de esputo para el diagnóstico tiene desventajas. Entre las más relevantes se sabe que obtener muestras de esputo de niños menores de cinco años es prácticamente imposible (53). Asimismo, los pacientes con TB coinfectados con el VIH normalmente tienen una carga bacteriana muy baja en su esputo (TB paucibacilar) (54).

La detección de moléculas de *M. tuberculosis* (proteína, lípido, ácido nucleico) en una muestra biológica derivada de paciente con indicios clínicos de padecer TB, es el punto de inicio para diagnosticar la enfermedad en el laboratorio. De la misma manera, los marcadores inmunológicos inequívocamente vinculados a la infección por *M. tuberculosis* también se pueden utilizar para fines de diagnóstico. En conjunto, los marcadores biológicos que permiten identificar a los pacientes que se encuentran en un proceso patológico se denominan biomarcadores de diagnóstico (55). En el caso de TB la identificación de biomarcadores diagnósticos debe considerar los múltiples procesos asociados a la infección. Una aproximación simplista del “ciclo de vida” de *M. tuberculosis*, sugiere que la infección inicial se establece mediante la inhalación de aerosoles cargados con bacterias generados por pacientes con TB pulmonar activa al expectorar o toser (56). Se plantea la hipótesis

de que existe un número muy reducido de personas que pueden eliminar la micobacteria vía respuesta inmune innata, en cuyo caso las TST e IGRA serán negativas. Otro grupo de individuos controla la infección y elimina la micobacteria mediante la respuesta inmune adaptativa lo que resulta en TST que puede ser negativo o positivo e IGRA positivo (56, 57). En un tercer grupo de individuos *M. tuberculosis* invade los macrófagos alveolares usualmente en la parte inferior del pulmón, estableciendo una infección intracelular que al ser completamente contenida (pero no eliminada) por la respuesta inmune (90% a 95% de los pacientes) conduce a la ITBL. El individuo puede mantener el estado latente de infección durante décadas. Sin embargo, una persona con ITBL puede progresar a TB activa con el potencial de propagar las micobacterias, mediante la generación de aerosoles al toser y/o expectorar (56, 57). Una cuarta posibilidad ocurre cuando, después del establecimiento de la infección intracelular, el sistema inmunitario del paciente no puede controlar la bacteria y el paciente desarrolla TB activa (5% al 10%). Después de recibir tratamiento, los pacientes con TB activa pueden convertirse en casos de ITBL u obtener una esterilización completa (58). Ninguno de los estados durante la infección por *M. tuberculosis* encaja en una clasificación dicotómica perfecta. Por el contrario, la transición de ITBL a enfermedad activa y de TB activa a curación definitiva o ITBL nuevamente (después del tratamiento), es un continuo de etapas (58). Para mejorar el control de la TB, es importante descubrir biomarcadores de diagnóstico para cada una de las diferentes etapas del continuo de la infección con la micobacteria (Figura 1).

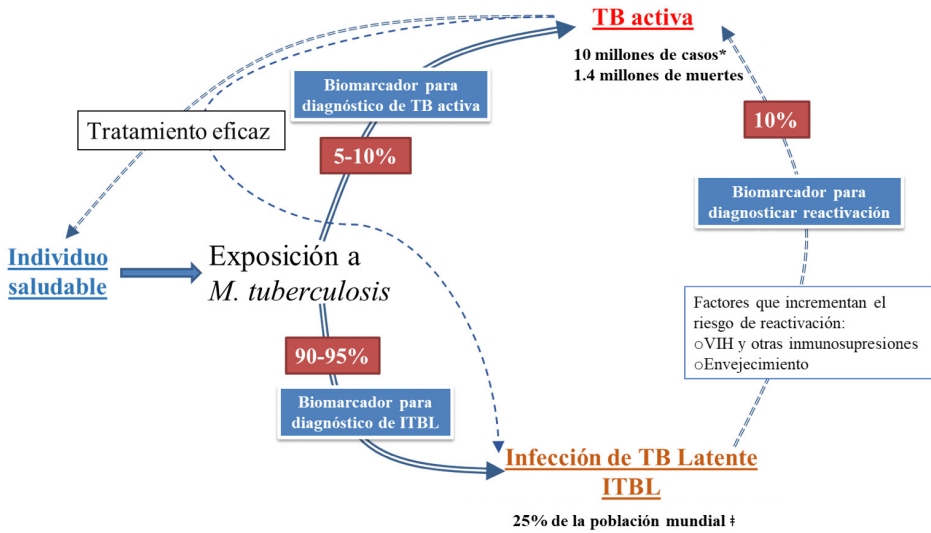


Figura 1. Biomarcadores para diagnóstico de tuberculosis. Para controlar efectivamente la TB, es necesario el descubrimiento de nuevos biomarcadores de diagnóstico no solo para la enfermedad activa, sino también para la identificación de la infección de TB latente y reactivación. Fuentes: (14), ‡ (49).

Fuente: Elaboración propia

Identificación de biomarcadores para TB activa y latente

En el contexto de las enfermedades infecciosas, los biomarcadores pueden ser derivados de patógenos, así como, derivados del huésped. Además de los biomarcadores ya mencionados que han jugado un papel importante en la detección de la infección por *M. tuberculosis* (el ADN micobacteriano encontrado en cualquier cavidad infectada y LAM en la orina), varios estudios han probado las biomoléculas micobacterianas como marcadores potenciales de enfermedad activa o infección latente. Las micoliltransferasas de unión a fibronectina comúnmente conocida como antígeno 85 (Ag85) se han encontrado formando complejos inmunes con inmunoglobulinas y fi-

bronectina en plasma de pacientes con TB (59). Sorprendentemente, no hay estudios recientes que prueben la presencia de Ag85 en la sangre de pacientes con TB activa, excepto en un estudio reciente realizado por Kruh-Garcia y colaboradores (60) abriendo una luz para una posible prueba diagnóstica no dependiente de esputo. Desde el lado del huésped, Sartain y colaboradores, propusieron una versión mejorada de un ensayo serológico para discriminar diferentes etapas de la TB activa. En su estudio Sartain desarrolló un ensayo de micro matrices de proteínas para la detección simultánea de reactividad serológica frente a varias proteínas de *M. tuberculosis*. En esta estrategia, generaron una biblioteca de 960 fracciones simples de citosol y proteínas secretadas de *M. tuberculosis*, que se analizaron con muestras de sueros de cinco grupos heterogéneos de pacientes: pacientes sin signos y síntomas de TB activa con PPD positiva (como casos de ITBL), TB cavitaria (una forma avanzada de TB activa caracterizada por la presencia de uno o más granulomas abiertos del que se expulsó el centro necrótico a través del árbol bronquial (61)), TB no cavitaria, coinfección VIH/TB y pacientes VIH+/TB negativos. Se encontraron cuatro antígenos micobacterianos asociados exclusivamente con la TB cavitaria (Pst1, HspX, Mpt64 y TrxC) y once antígenos (incluidos SodC y BfrB) que generaron la respuesta más fuerte en la TB cavitaria y no cavitaria (62); estos estudios experimentales sugieren una posible aplicación de la detección de anticuerpos frente a múltiples antígenos de *M. tuberculosis*, en el diagnóstico de TB que debe ser confirmada en estudios subsecuentes.

Un enfoque diferente basado en el suero para identificar TB activa o ITBL se basa en la caracterización de microARNs humanos circulantes (63, 64). Un estudio, mostró que 59 microARNs (incluidos miR93 * y miR29a) estaban sobre expresados en pacientes con TB activa. Una evaluación adicional demostró que miR29a presentaba un alto potencial diagnóstico que debería ser validado con estudios complementarios (65).

En el contexto de los biomarcadores de diagnóstico derivados del huésped, se encontró que la proteína amiloide A y la transtirretina (prealbúmina) en suero, mostraron una precisión diagnóstica para TB activa que osciló entre

el 78% y el 90%, utilizando ensayos complejos que acoplaban tecnología de *microarrays*, un tipo especial de espectrometría de masas (absorción/ionización laser en superficie con espectrometría de masas (SELDI-MS)) e inmunoensayos (66). Otro estudio comparó pacientes con TB tanto VIH+ como VIH- con individuos con ITBL y con pacientes que presentaban otras enfermedades respiratorias (OER) y voluntarios sin TB. Inicialmente, a través de ensayos de proteómica identificaron 165 proteínas expresadas diferencialmente en pacientes con TB (VIH-) en comparación con ITBL. Con el fin de disminuir la interferencia generada por las proteínas que se aumentan en fase aguda eliminaron del análisis aquellas que se sabe que forman parte de la respuesta de fase aguda en diversas enfermedades infecciosas. El análisis final mostró que diez proteínas podían discriminar TB/VIH- y de OER, mientras que ocho proteínas discriminaban TB/HIV+ de OER. CD14 y la glicoproteína extracelular SEPP1 fueron comunes en ambos grupos (67).

Uso de ciencias “ómicas” en el descubrimiento de biomarcadores de TB

Uno de los campos más recientes para el descubrimiento de nuevos biomarcadores es la identificación y cuantificación de moléculas pequeñas (<1.5 KDa) involucradas en todas las etapas de la función celular, en una aproximación experimental y metodológica conocido como metabolómica (68). Los metabolitos del patógeno y del huésped se han estudiado como biomarcadores potenciales de TB. Con respecto a los metabolitos de *M. tuberculosis*, varios autores han utilizado el cultivo *in vitro* para la identificación inicial de candidatos teniendo en cuenta las dificultades asociadas con la interferencia de la matriz del huésped (suero o plasma). Un metabolito con gran potencial es el ácido tuberculostearico (TBSA), el cual se ha identificado en diferentes muestras de pacientes con TB activa (69). Desafortunadamente, TBSA mostró una sensibilidad y especificidad bajas (54% y 80%, respectivamente) y un alto costo para su detección (69, 70). Finalmente, los lípidos de la pared celular (específicamente los ácidos micólicos) están bajo intensa investigación en este campo. La presencia /

ausencia de diferentes clases de ácidos micólicos ha demostrado potencial para discriminar entre *M. tuberculosis* y otro grupo importante de MNT clínicamente relevantes (Sistema de Identificación de Micobacterias MYCOLCS) (68, 71). Con respecto a los metabolitos derivados del huésped, los metabolitos del plasma mostraron una capacidad prometedora para discriminar a los pacientes con TB activa de pacientes con neumonía y de voluntarios sanos. Específicamente, la presencia de ceramida mostró una sensibilidad y especificidad superiores al 85% para el diagnóstico de TB (72). Un estudio comparó los metabolitos séricos de pacientes con TB y los controles sanos, mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), encontrando que trece metabolitos aumentaron significativamente y cuatro disminuyeron en el grupo de pacientes con TB. Según este arreglo de metabolitos, el proceso más afectado durante la infección por *M. tuberculosis* fue la biosíntesis de proteínas (73). Otro método con el cual se consiguió un alto grado de caracterización para detectar metabolitos potencialmente biomarcadores de diagnóstico de TB, consistió en el desarrollo de una “nariz electrónica” capaz de distinguir las especies de micobacterias en entornos de laboratorio; sin embargo, la prueba mostró una sensibilidad (75%) y especificidad (67%) bajas en entornos clínicos (68). Uno de los principales desafíos de los estudios de metabolómica en el campo del diagnóstico de la TB es su aplicación en campo debido al uso de tecnologías complejas y costosas.

Diversos enfoques proteómicos se han utilizado para encontrar biomarcadores de TB en suero/plasma y otras muestras alternativas al esputo (74). La concentración de proteínas en diferentes fluidos corporales puede reflejar procesos patológicos. Varias proteínas se usan actualmente como marcadores de condiciones normales o de enfermedad en entornos clínicos de rutina: albúmina, hemoglobina, transaminasas hepáticas, entre otras. Estas proteínas normalmente están presentes en gran abundancia en el plasma humano, lo que ha permitido el desarrollo de ensayos de detección simples, de bajo costo y alto rendimiento (ELISA, reacciones colorimétricas, de química seca, etc.) (79). Muchas proteínas involucradas en los procesos celulares pueden circular en el torrente sanguíneo, por lo tanto, el estudio del

proteoma plasmático (o del suero) puede reflejar condiciones de enfermedad clínicamente relevantes (75). La espectrometría de masas representa una herramienta robusta para el análisis del proteoma plasmático, generando “firmas biológicas” (matrices de proteínas/péptidos) asociadas a un estado particular de enfermedad. Lamentablemente, debido al rango dinámico extremadamente amplio de concentración de proteínas en el plasma (o suero) humano (> 10 órdenes de magnitud) la identificación de proteínas poco abundantes es un desafío importante (76). En 2014, Kruh-Garcia y colaboradores, utilizando una aproximación proteómica identificaron varias proteínas micobacterianas en suero de pacientes con TB (con y sin coinfección por VIH): Ag85b, Ag85c, Mpt32 (Apa), BfrB, GlcB, HspX, KatG y Mpt64. En estos experimentos, la identificación de las proteínas de *M. tuberculosis* en suero no se vio afectada significativamente por el estatus VIH del paciente. En dicho estudio, se utilizó inicialmente proteómica tipo *shotgun* para seleccionar 76 péptidos correspondientes a 33 proteínas candidatas. Posteriormente, se identificaron 29 péptidos correspondientes a 17 proteínas mediante el ensayo de Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM) en pacientes con TB positivo (60). Posteriormente, el mismo grupo de investigadores utilizando metodologías similares, identificaron 35/40 pacientes con TB activa, según la presencia de al menos un péptido micobacteriano. Al comparar muestras de pacientes con TB activa positivo con aquellas provenientes de individuos sanos, cuatro péptidos de las proteínas, Cfp2, Mpt32, Mpt64 y BfrB de *M. tuberculosis* se asociaron significativamente con los pacientes con TB (77). Los dos últimos estudios utilizaron una fracción única de muestras de sueros enriquecidas con nano vesículas secretadas por las células humanas conocidas como exosomas. El uso de exosomas no solo ayudó con la eliminación de la mayoría de las proteínas séricas humanas, sino que también facilitó la concentración de las proteínas bacterianas (60, 77).

Conclusiones

El diagnóstico de TB ha sido un reto para la humanidad que ha inspirado el desarrollo de herramientas empleadas en el área clínica y la microbiología. A pesar de que hoy día la microscopía sigue jugando un papel muy importante en el diagnóstico de TB (BK), especialmente en los países de bajos ingresos, los avances en los métodos de cultivo y biología molecular han permitido en desarrollo de nuevas tecnologías de uso cada vez más generalizado. Se ha logrado evolucionar en la detección de la *M. tuberculosis* de 10.000 UFC/ml de esputo usando microscopía, a detectar <50 UFC/ml de esputo amplificando ácidos nucleicos de la micobacteria vía PCR en tiempo real. De igual manera se ha podido acortar el tiempo para el diagnóstico confirmatorio de varias semanas usando cultivo sólido, a diez días usando sistemas con cultivo líquido. En este sentido los métodos moleculares también han logrado acortar de manera importante el tiempo de espera para el diagnóstico de TB con sistemas como el Gene-Xpert MTB-RIF que genera resultados en dos horas. Tomando en cuenta las fortalezas de las pruebas moleculares la nueva resolución colombiana para manejo de la TB (Resolución 227 del 2020) incorpora en los algoritmos de diagnóstico el uso de pruebas moleculares tales como el Gene Xpert MTB-RIF.

Las muestras empleadas para el diagnóstico de TB han sido principalmente de origen pulmonar (como esputo, lavado bronco alveolar, etc.), debido a la alta frecuencia de esta presentación clínica de la enfermedad. Sin embargo, la evolución de los métodos diagnósticos está dirigida a encontrar herramientas que permitan ser más versátiles, especialmente incluyendo como fuentes diagnósticas otros bio-fluidos que minimicen el riesgo de distribuir la enfermedad (por la generación de aerosoles) y que sean de fácil obtención para toda la población, garantizando resultados confiables. El diagnóstico de TB continúa siendo un problema en el siglo XXI, sumando a la necesidad de pruebas diagnósticas confiables y de fácil aplicación, la imperativa necesidad por metodologías que permitan identificar personas con infección latente y dentro de este grupo aquellos en estado de progresión a TB activa.

Referencias bibliográficas

1. Hipocrates the Aphorisms of Hippocrates: With a Translation Into Latin and English: A. J. Valpy; 1822.
2. Frith J. History of tuberculosis Part 1 – Pthisis, consumption and the White Plague. *Journal of Military and Veterans' Health*. 2014;22(2).
3. Roguin A. Rene Theophile Hyacinthe Laënnec (1781-1826): The man behind the stethoscope. *Clin Med Res*. 2006;4(3):230-5.
4. Chen CC, Chen YN, Liou JM, Wu MS, Consortium TGDaH. From germ theory to germ therapy. *Kaohsiung J Med Sci*. 2019;35(2):73-82.
5. Wollman AJ, Nudd R, Hedlund EG, Leake MC. From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. *Open Biol*. 2015;5(4):150019.
6. Doetsch RN. Benjamin Marten and his "New Theory of Consumptions". *Microbiol Rev*. 1978;42(3):521-8.
7. Koch R. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Rev Infect Dis*. 1982;4(6):1270-4.
8. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle*. 1970;51(2):196-206.
9. Kinyoun JJ. A note on uhlenhuths method for sputum examination, for tubercle bacilli. *Am J Public Health (N Y)*. 1915;5(9):867-70.
10. Darzins E. The bacteriology of tuberculosis. Minneapolis,: University of Minnesota Press; 1958. 488 p. p.
11. Truant JP, Brett WA, Thomas W. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull*. 1962;10:287-96.
12. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;1:CD009593.
13. Caulfield AJ, Wengenack NL. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. 2016;4:33-43.
14. World Health Organization. Global Tuberculosis Report; 2019. Available at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. revisado 08-08, 2020.

15. Schwabacher H. The pitfalls in the laboratory diagnosis of urinary tuberculosis: A Report of the Address given at the Urological Section of the Royal Society of Medicine. 1937;- 9(- 3):- 275.
16. Essawy TS, Saeed AM, Fouad NA. Comparative study between using Lowenstein Jensen, Bio-FM media and mycobacteria growth indicator tube (MGIT) system in identification of *Mycobacterium tuberculosis*. Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis. 2014;63(2):8.
17. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull World Health Organ. 1974;51(1):71-82.
18. Youmans AS, Youmans GP. Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. III. The growth of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* in the presence of various intermediates of the dissimilation of glucose to pyruvic acid. J Bacteriol. 1953;65(1):100-2.
19. Dubos RJ, Middlebrook G. Media for tubercle bacilli. Am Rev Tuberc. 1947;56(4):334-45.
20. Middlebrook G, Dubos RJ. The effect of tubercle bacilli on the antigenicity of a synthetic ester of oleic acid. J Immunol. 1947;56(4):301-6.
21. Sewell DL, Rashad AL, Rourke WJ, Poor SL, McCarthy JA, Pfaller MA. Comparison of the Septi-Chek AFB and BACTEC systems and conventional culture for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1993;31(10):2689-91.
22. Pfyffer GE, Cieslak C, Welscher HM, Kissling P, Rüscher-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(9):2229-34.
23. Mattei R, Savarino A, Fabbri M, Moneta S, Tortoli E. Use of the BacT/Alert MB mycobacterial blood culture system for detection of mycobacteria in sterile body fluids other than blood. J Clin Microbiol. 2009;47(3):711-4.
24. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. J Clin Microbiol. 1999;37(11):3578-82.
25. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and

- multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet*. 2011;377(9776):1495-505.
26. Lumb R, Lanser JA, Lim IS. Rapid identification of mycobacteria by the Gen-Probe Accuprobe system. *Pathology*. 1993;25(3):313-5.
 27. Machado D, Couto I, Viveiros M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes to genomes. *Infect Genet Evol*. 2019;72:93-112.
 28. Opota O, Zakham F, Mazza-Stalder J, Nicod L, Greub G, Jaton K. Added Value of Xpert MTB/RIF Ultra for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in a Low-Prevalence Setting. *J Clin Microbiol*. 2019;57(2).
 29. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One*. 2011;6(9):e24720.
 30. Cao Y, Wang L, Ma P, Fan W, Gu B, Ju S. Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1):4131.
 31. Shah M, Hanrahan C, Wang ZY, Dendukuri N, Lawn SD, Denkinger CM, et al. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in HIV-positive adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016(5):CD011420.
 32. Savolainen L, Kantele A, Sandboge B, Sirén M, Valleala H, Tuompo R, et al. Modification of clearview tuberculosis (TB) enzyme-linked immunosorbent assay for TB patients not infected with HIV. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(9):1479-82.
 33. Minion J, Leung E, Talbot E, Dheda K, Pai M, Menzies D. Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011;38(6):1398-405.
 34. Lawn SD, Wood R. Point-of-care urine antigen screening tests for tuberculosis and cryptococcosis: potential for mortality reduction in antiretroviral treatment programs in Africa. *Clin Infect Dis*. 2012;54(5):739-40.
 35. Lawn SD, Kerkhoff AD, Vogt M, Wood R. Diagnostic accuracy of a low-

- cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(3):201-9.
36. World Health Organization. The use of lateral flow urine lipoarabinomannan assay (LF-LAM) for the diagnosis and screening of active tuberculosis in people living with HIV. Policy update. Number of pages: 74. Publication date: 2015. ISBN: 978 92 4 150963 3. WHO/HTM/TB/2015.25..
 37. Nasreen S, Shokoohi M, Malvankar-Mehta MS. Prevalence of Latent Tuberculosis among Health Care Workers in High Burden Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164034.
 38. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862-70.
 39. Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(1):15-21.
 40. Nayak S, Acharjya B. Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatol Online J.* 2012;3(1):2-6.
 41. Vukmanovic-Stejic M, Reed JR, Lacy KE, Rustin MH, Akbar AN. Mantoux Test as a model for a secondary immune response in humans. *Immunol Lett.* 2006;107(2):93-101.
 42. Burl S, Adetifa UJ, Cox M, Touray E, Whittle H, McShane H, et al. The tuberculin skin test (TST) is affected by recent BCG vaccination but not by exposure to non-tuberculosis mycobacteria (NTM) during early life. *PLoS One.* 2010;5(8):e12287.
 43. Lempp JM, Zajdowicz MJ, Hankinson AL, Toney SR, Keep LW, Mancuso JD, et al. Assessment of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in United States Navy recruits. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177752.
 44. Arlehamn CS, Sidney J, Henderson R, Greenbaum JA, James EA, Moutaftsi M, et al. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c (EsxJ). *J Immunol.* 2012;188(10):5020-31.

45. Nicol MP, Davies MA, Wood K, Hatherill M, Workman L, Hawkrigde A, et al. Comparison of T-SPOT.TB assay and tuberculin skin test for the evaluation of young children at high risk for tuberculosis in a community setting. *Pediatrics*. 2009;123(1):38-43.
46. Baghaei P, Tabarsi P, Sabour H, Dehghani S, Marjani M, Shamaei M, et al. Detection of Antibodies Against 6, 16 and 38 kDa Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* as a Rapid Test for Diagnosis of Tuberculosis. *Tanaffos*. 2011;10(4):17-22.
47. Imaz MS, Schmelling MF, Kaempfer S, Spallek R, Singh M. Serodiagnosis of tuberculosis: specific detection of free and complex-dissociated antibodies anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(3):234-44.
48. Steingart KR, Ramsay A, Dowdy DW, Pai M. Serological tests for the diagnosis of active tuberculosis: relevance for India. *Indian J Med Res*. 2012;135(5):695-702.
49. Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med*. 2016;13(10):e1002152.
50. Hauck FR, Neese BH, Panchal AS, El-Amin W. Identification and management of latent tuberculosis infection. *Am Fam Physician*. 2009;79(10):879-86.
51. Kahwati LC, Feltner C, Halpern M, Woodell CL, Boland E, Amick HR, et al. Screening for Latent Tuberculosis Infection in Adults: An Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. 2016.
52. Aabye MG, Ravn P, PrayGod G, Jeremiah K, Mugomela A, Jepsen M, et al. The impact of HIV infection and CD4 cell count on the performance of an interferon gamma release assay in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2009;4(1):e4220.
53. Cuevas LE. The urgent need for new diagnostics for symptomatic tuberculosis in children. *Indian J Pediatr*. 2011;78(4):449-55.
54. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(10):664-74.

55. Group. BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
56. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* 2014;159(7):1497-509.
57. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. *Tuberculosis.* *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16076.
58. Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *Lancet.* 2010;375(9729):1920-37.
59. Bentley-Hibbert SI, Quan X, Newman T, Huygen K, Godfrey HP. Pathophysiology of antigen 85 in patients with active tuberculosis: antigen 85 circulates as complexes with fibronectin and immunoglobulin G. *Infect Immun.* 1999;67(2):581-8.
60. Kruh-Garcia NA, Wolfe LM, Chaisson LH, Worodria WO, Nahid P, Schorey JS, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS. *PLoS One.* 2014;9(7):e103811.
61. Gadkowski LB, Stout JE. Cavitory pulmonary disease. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):305-33, table of contents.
62. Sartain MJ, Slayden RA, Singh KK, Laal S, Belisle JT. Disease state differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(11):2102-13.
63. Fu Y, Yi Z, Wu X, Li J, Xu F. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4246-51.
64. Miotto P, Mwangoka G, Valente IC, Norbis L, Sotgiu G, Bosu R, et al. miRNA signatures in sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2013;8(11):e80149.
65. Harapan H, Fitra F, Ichsan I, Mulyadi M, Miotto P, Hasan NA, et al. The roles of microRNAs on tuberculosis infection: meaning or myth? *Tuberculosis (Edinb).* 2013;93(6):596-605.
66. Agranoff D, Fernandez-Reyes D, Papadopoulos MC, Rojas SA, Herbster M, Loosemore A, et al. Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum. *Lancet.* 2006;368(9540):1012-21.
67. Achkar JM, Cortes L, Croteau P, Yanofsky C, Mentinova M, Rajotte

- I, et al. Host Protein Biomarkers Identify Active Tuberculosis in HIV Uninfected and Co-infected Individuals. *EBioMedicine*. 2015;2(9):1160-8.
68. Preez ID, Luies L, Loots DT. Metabolomics biomarkers for tuberculosis diagnostics: current status and future objectives. *Biomark Med*. 2017;11(2):179-94.
69. Yorgancioğlu A, Akin M, Dereli S, Aktoğu S, Ilis Z, Sezgin A. The diagnostic value of tuberculostearic acid in tuberculous pleural effusions. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1996;51(2):108-11.
70. Traunmüller F, Zeitlinger MA, Stoiser B, Lagler H, Abdel Salam HA, Presterl E, et al. Circulating tuberculostearic acid in tuberculosis patients. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(11-12):790-3.
71. Olivier I, Loots dT. A metabolomics approach to characterise and identify various *Mycobacterium* species. *J Microbiol Methods*. 2012;88(3):419-26.
72. Lau SK, Lee KC, Curreem SO, Chow WN, To KK, Hung IF, et al. Metabolomic Profiling of Plasma from Patients with Tuberculosis by Use of Untargeted Mass Spectrometry Reveals Novel Biomarkers for Diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3750-9.
73. Zhou A, Ni J, Xu Z, Wang Y, Lu S, Sha W, et al. Application of (1)h NMR spectroscopy-based metabolomics to sera of tuberculosis patients. *J Proteome Res*. 2013;12(10):4642-9.
74. Haas CT, Roe JK, Pollara G, Mehta M, Noursadeghi M. Diagnostic 'omics' for active tuberculosis. *BMC Med*. 2016;14:37.
75. Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Syst*. 2016;2(3):185-95.
76. Parker CE, Borchers CH. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation--quality assurance and control of protein biomarker assays. *Mol Oncol*. 2014;8(4):840-58.
77. Mehaffy C, Dobos KM, Nahid P, Kruh-Garcia NA. Second generation multiple reaction monitoring assays for enhanced detection of ultra-low abundance *Mycobacterium tuberculosis* peptides in human serum. *Clin Proteomics*. 2017;14:21.