

Actualidad en el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio

Jaime Robledo R. MD *
Gloria Isabel Mejía M. Bact. *

Resumen

La tuberculosis ha sido declarada por la Organización Mundial de la salud como una emergencia mundial, el número de casos nuevos y de muertes atribuidas a esta infección viene aumentando considerablemente por año. El diagnóstico es una de las estrategias fundamentales para el control, y la rapidez en proporcionar resultados incide en el manejo inicial del paciente y en el control de la cadena de transmisión. Implementar, desarrollar o evaluar nuevas tecnologías es una actividad importante en un laboratorio de referencia de tuberculosis como medio para realizar diagnósticos rápidos y precisos. La actualidad

del diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio se presenta en forma de revisión de tema, haciendo énfasis en los métodos diagnósticos actualmente utilizados o en los cuales se ha tenido experiencia en el laboratorio de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias en la Corporación para Investigaciones Biológicas. El reto en la situación actual consiste en que el laboratorio utilice los mejores métodos disponibles sin que los costos comprometan su viabilidad.

Palabras clave: tuberculosis, diagnóstico, nuevos métodos de diagnóstico. **b**

Infectio 2001; 5(4): 251-259

Introducción

La tuberculosis continúa siendo un problema de salud pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay ocho millones de casos nuevos y tres millones de muertes atribuidas a esta enfermedad infecciosa cada año, siendo los países en desarrollo los más afectados (1). La resistencia a medicamentos antituberculosos es un fenómeno en crecimiento que acompaña el cuadro general de la tuberculosis en el mundo y que plantea mayores dificultades para su futuro control (2). En Colombia se calculan aproximadamente 10.000 casos nuevos de tuberculosis por año (3) y la resistencia inicial global es de 13% (2).

El diagnóstico de tuberculosis es esencialmente microbiológico y es uno de los pilares en el control, en conjunto con la búsqueda activa de

casos y el tratamiento directamente supervisado (4). El laboratorio de micobacteriología realiza, por lo tanto, labores cruciales e indispensables para el control de la tuberculosis y necesita proporcionar resultados tan rápidos y precisos como sea posible.

Dos retos se plantean para un laboratorio de micobacteriología actual, de un lado, el de proporcionar resultados rápidos y precisos, balanceando el uso de la tecnología con los costos, y de otro, muy importante también, el de proporcionar la suficiente seguridad para el personal, garantizando un nivel 3 de seguridad (BSL-3) que incluya acceso restringido, presión negativa con flujo de aire direccionado y el uso de guantes y ropa especial de laboratorio (5,7).

* Unidad de Bacteriología y Micobacterias, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín, Colombia.

El desarrollo de nuevas técnicas para el aislamiento e identificación de micobacterias permite reducir de una manera importante el tiempo para el reporte de los resultados, y concomitantemente mejora de manera apreciable la sensibilidad. Es así como en países con economías sólidas los métodos recomendados por su sensibilidad y/o rapidez incluyen el directo con tinción de auramina rodamina, el cultivo en caldo con métodos radiométricos o similares para la detección de crecimiento, la identificación con sondas de ADN o HPLC y pruebas de sensibilidad con métodos radiométricos, de tal manera que los tiempos de reporte de resultados sean mínimos (5-7).

En contraste, en países con economías débiles que dedican pocos recursos a la salud, la norma establece el uso de métodos más tradicionales. Éstos, aunque son poco costosos y cumplen una función importante en el diagnóstico de la tuberculosis, deberían ser complementados con métodos más rápidos y sensibles disponibles con nuevas tecnologías, tal como lo ha enfatizado la OMS (8) y más recientemente en su programa de iniciativa para el diagnóstico de tuberculosis (TB Diagnostics Initiative –TBDI). Una comparación entre los tiempos promedios necesarios para reporte de resultados utilizando los métodos tradicionales de diagnóstico y los métodos recomendados por el CDC se muestra en la tabla 1.

La Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB ha desarrollado un laboratorio de referencia en diagnóstico de infecciones causadas por micobacterias, que a la vez que presta servicio de diagnóstico con estándares internacionales, desarrolla actividades de investigación para evaluar, adaptar o desarrollar nuevas tecnologías diagnósticas, que puedan aplicarse a las condiciones del país y de la región. La siguiente revisión presenta la experiencia de varios años de trabajo en el desarrollo y evaluación de diversas técnicas diagnósticas para tuberculosis.

Coloración de auramina-rodamina para detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)

La auramina-O y la rodamina son colorantes inespecíficos, fluorescentes bajo luz ultravioleta, que se unen a los ácidos micólicos de las micobacterias reteniéndolos luego de la decoloración con un alcohol-ácido. Esta coloración es equivalente a las coloraciones convencionales que utilizan fucsina, pero con la ventaja sobre éstas de que pueden ser observadas con menor aumento 200X y 400X, permitiendo la observación de la muestra en menos tiempo y con mejor sensibilidad en muestras paucibacilares (9,10). Debido a esta ventaja comparativa se ha recomendado su implementación de rutina en los laboratorios que hacen diagnóstico de tuberculosis (6,7).

En una experiencia en nuestro laboratorio con 120 muestras utilizando auramina-rodamina, comparativamente con una coloración convencional para detección de bacilos ácido-alcohol resistentes, como es Kinyoun, se observó una sensibilidad del 95.6%, una especificidad del 98%, un VPP de 95.5% y un VPN de 98.9% (observación no publicada). La ventaja real se observó en el tiempo necesario para la lectura, ya que con la coloración de Kinyoun se demora un promedio de 15 minutos por placa de extendido, mientras que con auramina-rodamina, el tiempo es de tres minutos. La diferencia en tiempos de lectura tiene un impacto, no sólo en la oportunidad del resultado cuando el laboratorio tiene un volumen importante de muestras, sino también en los costos de la prueba, los cuales a largo plazo se hacen equiparables a los de las coloraciones convencionales, a pesar de necesitar un equipo costoso como el microscopio de fluorescencia. La tabla 2 muestra una comparación de los tiempos necesarios para lectura de exámenes directos con tinción de auramina-rodamina y una coloración con fucsina como el Kinyoun.

TABLA 1

Tiempo promedio para reporte de resultados en diagnóstico de tuberculosis utilizando métodos tradicionales y métodos recomendados por el CDC

Procedimiento	Tiempo promedio para reporte de resultados desde el día en que se procesa la muestra	
	Métodos Tradicionales*	Métodos Recomendados CDC**
Examen directo	24 horas	24 horas
Detección de crecimiento	20-25 días	15 días
Identificación de especie	50-55 días	18 días
Pruebas de sensibilidad	60 días	30 días

* Examen directo por coloración de Kinyoun o Ziehl-Neelsen, cultivo en medio de Lowenstein-Jensen u Ogawa-Kudoh, identificación por pruebas bioquímicas tradicionales y pruebas de sensibilidad por método de las proporciones.

** Examen directo por auramina/rodamina, cultivo en caldo por BACTEC o similares, identificación por sondas de ADN o HPLC y pruebas de sensibilidad por BACTEC.

TABLA 2

Comparación entre los tiempos requeridos para observar extendidos negativos coloreados con una coloración convencional para bacilos ácido-alcohol resistentes y Auramina-Rodamina

Condición	Auramina-Rodamina	Fuscina
Aumento	400X	1000X
Máximo de campos observados	30	300
Tiempo total para observar un extendido	3 minutos	15 minutos
Tiempo total para 50 extendidos	2 horas con 5 minutos	12 horas con 50 minutos

El método de cultivo en capa delgada permite la detección rápida de crecimiento y la identificación inicial de *Mycobacterium tuberculosis*

El medio de cultivo utilizado para el método de agar en capa delgada (MCD) es el Middlebrook 7H11 suplementado con OADC (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa) y antibióticos (8,9). Cuando se usa como capa delgada, por ser un agar transparente, permite visualizar tempranamente, utilizando un microscopio convencional, microcolonias cuya morfología puede sugerir la especie de micobacteria que está creciendo (10,11).

Para evaluar el desempeño del MCD al compararlo con un método de cultivo tradicional

como el Lowenstein-Jensen, se procesaron 761 muestras clínicas (12). El 62% de las muestras positivas para *Mycobacterium tuberculosis*, lo fueron en MCD a los siete días, en contraste con el Lowenstein-Jensen (LJ), en el cual todas las muestras fueron negativas en este mismo período de tiempo. A las dos semanas, más del 80% de las muestras multibacilares fueron detectadas como positivas por MCD y el 10% por LJ. Microcolonias características se observaron tan temprano como tres días después de sembrada la muestra en MCD. Mas allá de dos semanas de observación la detección fue igual para los dos medios comparados. Se observaron diferencias en muestras paucibacilares con relación a la sensibilidad, ya que el MCD detectó sólo el 2.18% y LJ el 4.57%, diferencia que puede explicarse por el mayor período de observación de LJ frente a MCD (ocho semanas vs cuatro semanas). Un hallazgo importante fue el

encontrar 11 aislamientos en LJ que no crecieron en MCD y cuatro que lo hicieron en ACD y no en LJ (12).

Los resultados mostrados soportan la utilidad del MCD en el diagnóstico rutinario de tuberculosis por la rapidez con que puede proporcionar un resultado, la morfología de las microcolonias, de acuerdo a la experiencia del laboratorio, puede sugerir el crecimiento de *M. tuberculosis*. La combinación de este método de cultivo con medios tradicionales como el LJ garantizan una mayor sensibilidad.

Evaluación del sistema MGIT para el diagnóstico de tuberculosis

El sistema denominado MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, Becton Dickinson and Company, Sparks MA, USA), es un tubo con medio líquido (Middlebrook 7H9), el cual posee una resina en el fondo del tubo, que tiene la capacidad de fluorescer bajo luz ultravioleta (365nm) cuando disminuye la tensión de oxígeno en el medio, al ser consumido por crecimiento bacteriano (13). Este sistema tiene un promedio para detección de crecimiento de micobacterias de 13 días, no utiliza elementos radioactivos como lo hace El BACTEC 460 (Becton Dickinson and Company, Sparks MA, USA), y puede utilizarse en un formato manual o un formato automatizado cuando los laboratorios tienen mayor volumen de muestras (13 -15).

En una experiencia publicada en este número (16), se evaluó comparativamente el MGIT con ACD y el cultivo en Ogawa-Kudoh (OK), se procesaron 218 muestras de pacientes sintomáticos respiratorios, que no habían recibido tratamiento previo para tuberculosis. Los principales resultados fueron una sensibilidad similar para MGIT y OK, mayor que para ACD (24.3%, 24.7% y 15.1% respectivamente). El ACD detectó el 56.2% de los positivos en los primeros 15 días, frente al 38.8% con MGIT y el 7.2% con OK, para el mismo período de tiempo. Particularmente importante fue observar una

mayor sensibilidad del MGIT para muestras paucibacilares (15.5%, 4.6% y 5.6% para MGIT, ACD y OK respectivamente), lo cual enfatiza la utilidad de adicionar un medio líquido en la rutina del laboratorio que realiza diagnóstico de tuberculosis. La frecuencia de contaminación observada para MGIT, 22.9%, así como el promedio de detección en días, 26.9, fueron problemas evidenciados en este estudio, directamente relacionados con el proceso de las muestras por dos laboratorios diferentes y la falta de experiencia en el manejo de medios líquidos de cultivo en el diagnóstico de tuberculosis (16).

Experiencias recientes soportan la efectividad del MGIT para detectar rápidamente crecimiento de micobacterias, con tiempos de detección similares a los de otros métodos rápidos, particularmente cuando se usa en su forma de detección automatizada y combinado con sistemas rápidos de identificación (13-15,17). En la experiencia actual de nuestro laboratorio, utilizando el MGIT con monitoreo continuo (Bactec MGIT 960, Becton Dickinson) de rutina, la contaminación es de 7.5% y el promedio para detectar cultivos positivos es de 9.8 días (datos no publicados).

Amplificación genómica, PCR en el diagnóstico de tuberculosis

Técnicas basadas en amplificación genómica como es la reacción de polimerasa en cadena (PCR), se utilizan para realizar diagnóstico rápido de tuberculosis. Se han descrito muchas variaciones de estas técnicas incluyendo métodos comerciales y métodos preparados en el laboratorio ("in house"), cuyas evaluaciones han reportado resultados importantes para considerar el uso de estas pruebas en el diagnóstico (18-22).

Particular importancia se le ha dado a la utilidad de estas pruebas, por su sensibilidad, en el diagnóstico de tuberculosis paucibacilares y extrapulmonares (18, 19). Con el objetivo de

evaluar el desempeño de la PCR en tuberculosis paucibacilares y extrapulmonares, se utilizó una técnica con iniciadores descritos previamente por el Grupo de Inmunología del Hospital San Juan de Dios (22). Los resultados de la PCR se compararon con los resultados obtenidos por métodos estándar de diagnóstico en muestras de 147 pacientes, la mayoría de ellas extrapulmonares. Los valores obtenidos para la PCR de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron en su orden: 100%, 95.3%, 93.8% y 100% (23). Estos resultados validan el uso potencial de esta tecnología en el diagnóstico de tuberculosis, sin embargo la experiencia con este estudio demostró que la PCR es técnicamente demandante y requiere condiciones especiales del laboratorio que la quiera implementar.

De acuerdo con lo anterior, se han hecho evaluaciones en la reproducibilidad interlaboratorio de los resultados de PCR utilizando métodos comerciales o métodos preparados en el laboratorio, con resultados controversiales (24,25). Una de estas evaluaciones se realizó en laboratorios de seis países latinoamericanos participantes de RELACTB (Red Latinoamericana y del Caribe de investigación en tuberculosis). Cada laboratorio recibió 30 muestras, pero sin conocer la presencia o no de *M. tuberculosis* en ellas, para ser procesadas por el método de amplificación preparado en el laboratorio que estuviera usando de rutina. Los resultados mostraron gran variabilidad en la sensibilidad y especificidad de acuerdo al laboratorio, la sensibilidad y especificidad general obtenida fue 55% y 71.6% (25). El estudio concluye que con los resultados obtenidos no es posible utilizar la PCR preparada en el laboratorio como único método diagnóstico para tuberculosis y enfatiza la necesidad de utilizar los suficientes controles positivos y negativos para interpretar adecuadamente los resultados.

Una aplicación diferente de la PCR es su utilización en la identificación rápida de los aislamientos obtenidos por cultivo, mediante el uso

de amplificación y la restricción enzimática de lo amplificado, el patrón de fragmentos resultante permite diferenciar las distintas especies de micobacterias (26-28). Actualmente se está participando en una evaluación de esta técnica en diferentes laboratorios latinoamericanos, con el fin de definir su reproducibilidad y aplicabilidad en la rutina del diagnóstico.

Técnicas recientes en la detección directa de *M. tuberculosis*

En 1947 fue descrito el primer bacteriófago que infectaba micobacterias y a partir de este momento se han descrito aproximadamente 250 micobacteriófagos. Inicialmente se utilizaron en la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis* como un apoyo al estudio epidemiológico, pero la utilización más reciente de técnicas moleculares para tipificación hizo que se abandonaran los fagos para este tipo de aplicación. Más recientemente se ha publicado el uso del micobacteriófago D29 para el diagnóstico y pruebas de sensibilidad en tuberculosis. Este es un virus lítico que infecta un amplio rango de micobacterias incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias de crecimiento rápido (29,30). El método consiste en poner en contacto la muestra del paciente, con el fago, luego de ser tratada con NaOH+NAC e incubada con 7H9 + OADC por una noche a 37°C, si en la muestra se encuentran micobacterias, el fago las infecta después de un período de incubación, que es solo de una hora y al adicionar una micobacteria de crecimiento rápido (en 24 horas), las placas de lisis indican presencia de *M. tuberculosis* en la muestra inicial. En nuestro laboratorio utilizando un estuche comercial con este método (PhageTek MB, Biotec, Bélgica), las experiencias preliminares dan una sensibilidad superior a la del examen directo, con resultados disponibles a las 48 horas después de procesada la muestra (datos no publicados). Evaluaciones más extensas permitirán definir la utilidad de este ingenioso método para el diagnóstico de la tuberculosis.

Nuevas técnicas para pruebas de sensibilidad a medicamentos antituberculosos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con MCD en la detección temprana de *Mycobacterium tuberculosis*, se adaptó este método al de las proporciones múltiples (MP) estándar para determinar sensibilidad a rifampicina, isoniazida, etambutol y estreptomycin. Se comparó con el método estándar utilizando las mismas concentraciones recomendadas de los medicamentos (31). La formación de microcolonias se observó desde la primera semana en los controles y en las cepas resistentes en MCD pudiéndose tener datos definitivos a los siete días en el 56% de los aislamientos y en el 100% a los 14 días. Con el MP tradicional los resultados definitivos se obtuvieron después de los 20 días en el 100% de los aislamientos probados, la concordancia observada para los dos métodos fue de 100%. El MCD demostró ser fácilmente adaptable en cualquier laboratorio que haga pruebas de sensibilidad a medicamentos antituberculosos, con la ventaja de obtener resultados más tempranamente (32).

Otras técnicas nuevas se han utilizado para proporcionar resultados rápidos de sensibilidad a medicamentos antituberculosos, con buena concordancia cuando se comparan con los métodos más tradicionales. Entre ellas están la utilización del sistema MGIT (33,34), métodos moleculares o genéticos (37) y métodos colorimétricos con Alamar Azul y MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (35,36). Estas últimas sustancias cambian de color cuando existen condiciones de reducción en el medio como las que se obtienen cuando hay crecimiento bacteriano, propiedad que es útil cuando se pone a crecer *M. tuberculosis* en un caldo con concentraciones dadas de un medicamento antituberculoso, el cambio o no cambio de color obtenido indica la resistencia o sensibilidad (37).

Una evaluación hecha en nuestro laboratorio en 40 aislamientos de *M. tuberculosis* para

comparar el desempeño de Alamar-Azul comparativamente con el MP, mostró una concordancia mayor del 90% en los resultados de sensibilidad para rifampicina y estreptomycin y entre 75% y 80% para isoniazida y etambutol. Los resultados definitivos se obtuvieron entre seis y ocho días comparativamente con los 20 días necesarios para el MP (datos no publicados). Estos resultados sugieren que los métodos colorimétricos pueden ser una buena alternativa para realizar pruebas de sensibilidad a medicamentos antituberculosos.

Conclusión

En esta revisión se presentó la experiencia de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB en el desarrollo, evaluación y adaptación de nuevas tecnologías diagnósticas para tuberculosis e infecciones causadas por micobacterias.

Esta experiencia ha permitido no solo validar técnicas, sino también incorporarlas a la rutina del diagnóstico, de tal manera que el reporte de resultados se haga de una manera oportuna. El proceso actual de las muestras incluye el examen directo con Auramina-rodamina, el cultivo inicial en MGIT (automatizado, con monitoreo continuo) y Lowenstein-Jensen, el subcultivo en capa delgada de los cultivos positivos en MGIT, teniendo así información preliminar de identificación si es *M. tuberculosis* y las pruebas de sensibilidad con método de proporciones adaptado a capa delgada. Se tiene en proceso de incorporación a la rutina la identificación de especie con PCR. Esta secuencia en el proceso ha permitido una mejor eficiencia en el reporte de resultados, con tiempos de reporte similares a los recomendados, (tabla 3).

La importancia actual de la tuberculosis indica la necesidad de encontrar nuevas herramientas que permitan un diagnóstico más rápido, sin comprometer la eficiencia, como una medida con impacto en el control de la tuberculosis. Esto plantea la necesidad de laboratorios de micobacteriología necesariamente especializados que puedan responder a la demanda

TABLA 3

Técnicas aplicadas en la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB y tiempos promedio de reporte de resultados.

Procedimiento	Método o tecnología	Tiempo en proporcionar resultados	Total tiempo (acumulado)
Examen directo Cultivo inicial	Auramina-rodamina MGIT	24 horas o menos Cultivos positivos 9.8 días	1 día 11 días
	Lowenstein-Jensen	24.5 días	26 días
Subcultivo del MGIT e identificación preliminar de <i>M. tuberculosis</i>	Agar de capa delgada	4-5 días	16 días
Identificación definitiva	Pruebas bioquímicas convencionales	15 días	31 días
Pruebas de sensibilidad	Adaptación del método de las proporciones a capa delgada	15 días	31 días

técnica de los nuevos métodos, garantizando precisión y oportunidad en los resultados. El reto adicional en nuestro medio es ofrecer tecnología o nuevos desarrollos en el diagnóstico, sin que los costos comprometan la viabilidad del laboratorio. **b**

Abstract

The World Health Organization has declared tuberculosis a world emergency, the number of new cases and deaths per year, due to this infection, have been increasing considerably. Diagnosis is one of the main strategies aimed at its control, the initial treatment for the patient and the control of the transmission chain, are modified sharply by the rapidity with which final results are obtained. To be able to give accurate and fast diagnosis, tuberculosis reference laboratories have to develop, to evaluate and to implement new technologies. The update on diagnosis of tuberculosis by the laboratory is presented as a review of the subject, emphasizing the methods that are being used at the moment, or those on which the Unidad de Bacteriología y Micobacterias of the Corporación para Investigaciones Bioló-

gicas has had any experience. The actual situation of tuberculosis requires laboratories that are prepared to make adequate diagnosis. New technologies and developments lead to better standard diagnostic methods, the challenge of laboratories consists of being able to use new available methods without compromising its own viability. **Key words:** tuberculosis, diagnosis, new methods for diagnosis.

Referencias

1. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Control. Geneva: World Health Organization, 2000; document No. WHO/CDS/TB/2000.275.
2. **World Health Organization.** Anti-tuberculous drug resistance in the world. Report No. 2. Prevalence and trends. The WHO/IUATLD Global project on anti-tuberculous drug resistance surveillance. World Health Organization, Geneva 2000.
3. **Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.** Situación de Salud en las Américas. Indicadores Básicos 1998. Programa Análisis de Situación de Salud, División de Salud y Desarrollo Humano.

4. **Guías para el manejo de la tuberculosis.** Ministerio de Salud, Colombia. 2000.
5. **Centers for Disease Control and Prevention.** Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health care facilities. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1994;43(RR 13):1-132.
6. **Centers for Disease Control and Prevention.** Essential Components of a Tuberculosis Prevention and Control Program. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1995; 44 (RR-11): 1-16.
7. **Hale IM, Pfyffer GE, Salfinger M.** Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: New tools and lessons learned. Clin Infect Dis 2001;33:834-846.
8. **WHO Tuberculosis diagnostics workshop:** Product development guidelines. Cleveland, Ohio, 27 July, 1997. World Health Organization. Global tuberculosis Programme.
9. **Beberly G. Metchock, Frederick S. Nolte, Richard J. Wallace. JR.** Mycobacterium. Manual of Clinical Microbiology, 7th edition 1999, Chapt. 25, p 399.
10. **Chernoch PL, Enns KR, Saubolle MA, Wallace RJ.** Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Cumitech 16 A. 1994. ASM
11. **Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Charles HS, Gilchrist MJ.** Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. J Clin Microbiol 1993; 31:2178-2184.
12. **Mejía GI, Castrillón L, Trujillo H, Robledo J.** Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1999;3:138-142.
13. **BACTEC MGIT 960 System User's Manual.** Becton Dickinson and Company. Sparks, Maryland. May 1999.
14. **F. Alcaide., M.A. Benítez., J.M.Escriba., R.Martin.** Evaluation Bactec MGIT 960 and MB/Bact Systems for recovery of Mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. J Clin Microbiol 2000;38: 398-400.
15. **Somoskövi., C. Ködmön., A. Lantos., Z. Bartfai., L.Tamási., J. Füzy., P. Magyar.** 2000. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system and Lowenstein-Jensen medium. J Clin Microbiol 2000;38:2395-2397.
16. **López N, Vélez CI, Zuluaga LM, Estrada S, Posada P, Guzmán A, Mejía GI, Robledo J.** Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. Infectio 2001; 5(4): 235-240.
17. **N. Williams-Bouyer., R. Yorke.,H.I.Lee., G. Woods.** Comparison of BACTEC MGIT and ESP Culture System II for growth and detection of Mycobacteria. J. Clin. Microbiol 2000; Vol 38, N° 11: 4167-4170.
18. **Scarpato P, Piccoli A, Rigon G, Ruggiero M, Scagnelli C, Piersimoni.** Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in respiratory and extrapulmonary specimens. J. Clin. Microbiol 2000; Vol 38, N° 4:1559-1562.
19. **G.L. Woods., J.S. Bergmann., N.Williams-Bouyer.** Clinical evaluation of the gene probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in select nonrespiratory specimens. J. Clin. Microbiol 2001; Vol 39 N° 2, p 747-749.
20. **Eing BR, Becker A, Sohns A, Ringelman R.** Comparison of Roche COBAS amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998;36:2023-2029.
21. **Dalovisio JR, Montenegro-James S, Kemmerly SA, et al.** Comparison of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) Direct Test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. Clin Infect Dis 1996; 23:1099-1106.
22. **Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME.** Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in the diagnosis. J Clin Microbiol 1991;29:2163-2168.

23. **Sierra P, Robledo J, Murillo LA, Trujillo H, Mejía GI, Castrillón L.** Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la enfermedad producida por *M. tuberculosis* de tipo paucibacilar. Boletín Epidemiológico de Antioquia 1995; XX:192-206.
24. **Noordhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ.** Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol 1996;34:2522-2525.
25. **Suffys P, Palomino JC, Cardoso Leão S, Espitia C, Cataldi A, Alito A, Velasco M, Robledo J, Fernández J, da Silva Rosa P, Romano MI.** Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4(2):179-183.
26. **Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al.** Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993;31:175-178.
27. **Devallois A, Seng Goh K, Rastogi N.** Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997;35:2969-2973.
28. **Roth A, Reischl U, Strubel A, et al.** Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. J Clin Microbiol 2000;38:1094-1104.
29. **McNerney R.** Phage replication technology for diagnosis and drug susceptibility testing. Methods in molecular medicine- *Mycobacterium tuberculosis* protocols- Parish T, Stoker N G, editors. Humana Press, Totowa, New Jersey. 2000:145-154.
30. **McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, et al.** Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4:69-75.
31. **Kent PT, Kubica GP.** Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control, Atlanta, 1985.
32. **Correa AN, Mejía GI, Guzmán A, Robledo J.** A simple and fast method to measure susceptibility to primary and alternative antituberculous drugs. Memorias cuarto Congreso Colombiano de infectología, resumen 1.2, Infectio 1999; 3:18-20.
33. **N. Morcillo, S. Scipioni, M. Vignoles, A. Trovero.** Diagnóstico rápido y sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a antibióticos por el sistema MGIT. Revista Argentina de Microbiología 1998; 30: 155-162.
34. **Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F.** Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3(4): 344-348.
35. **Palomino JC, Portaels F.** Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18(5): 380-383.
36. **Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miorner H.** Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998;36:1214-1219.
37. **Palomino JC.** Novel rapid antimicrobial susceptibility tests for *Mycobacterium tuberculosis*. En: Multidrug-resistant tuberculosis. Bastian I, Portaels F, editors. Kluwer Academic Publishers. Boston 2000; pp: 145-162.