

# Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos

José Prisco Palma-Nicolás<sup>a</sup> y Virgilio Bocanegra-García<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. México DF. México.

<sup>b</sup>Departamento de Biología Molecular y Bioingeniería. UAM Reynosa Aztlán. UAT. Reynosa. Tamaulipas. México.

*Mycobacterium tuberculosis* es el microorganismo que por sí solo ha ocasionado el mayor número de muertes a escala mundial. Se estima que la tercera parte de la población mundial presenta tuberculosis latente, y cada año mueren alrededor de 2 millones de personas en todo el mundo. Además de la aplicación rigurosa del tratamiento acortado y estrictamente supervisado, es imperativo el desarrollo y aplicación de nuevas estrategias que permitan el diagnóstico oportuno de la enfermedad, particularmente de métodos de bajo coste que permitan abordar la problemática de la tuberculosis desde una perspectiva poblacional. En el presente trabajo se revisan los avances en las estrategias inmunológicas y moleculares para el diagnóstico y seguimiento epidemiológico de los pacientes tuberculosos.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*. *Mimótopos*. *MIRU-VNTR*. *Hsp65*. *IS6110*. *Diagnóstico*.

## Introducción

Las micobacterias (taxonómicamente referidas como género *Mycobacterium*) incluyen un grupo de poco más de 100 especies de microorganismos débilmente gram-positivos. Aunque la mayoría de estas especies son saprofitas, algunas son patógenas para el ser humano y otros animales. Todas las especies del género presentan una pared celular compleja, extraordinariamente rica en lípidos, que les confiere la propiedad de acidoresistencia. Mientras que las especies no patógenas son de crecimiento rápido, las patógenas se caracterizan por su lento crecimiento, con tiempos de generación que varían de 12 a 24 h.

Las especies que causan enfermedad natural en humanos o animales pertenecen a los denominados: *a*) complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum* y *M. microti*), y *b*) complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (*M. avium* subsp.

## Innovative Strategies to Diagnose and Monitor Tuberculosis Patients

*Mycobacterium tuberculosis* is the single most deadly microorganism worldwide. A third of the world population is thought to have latent tuberculosis and approximately 2 million people die of the disease each year. Short and closely supervised treatment regimens are needed, but it is also essential to develop new strategies to ensure prompt diagnosis of the disease. In particular, cheap methods are needed to tackle tuberculosis from a population perspective. The present article reviews the advances in immunology and molecular strategies for epidemiological diagnosis and monitoring of tuberculosis patients.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*. *Mimotopes*. *MIRU-VNTR*. *Hsp65*. *IS6110*. *Diagnosis*.

*avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *M. intracellulare*). Entre dichas especies, sin duda *M. tuberculosis* es el principal patógeno estricto que causa la tuberculosis en humanos, seguido de *M. bovis*, mientras que *M. avium* subsp. *avium* y *M. intracellulare* son causa de enfermedad pulmonar en personas inmunodeprimidas; se estima que hasta el 70% de los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia-sida (CD4+ ≤ 50/μl) presentan infección por alguno de estos oportunistas<sup>1</sup>.

La tuberculosis pulmonar es la forma más común de tuberculosis, así como la forma más importante en términos epidemiológicos. Se trata de una enfermedad pulmonar infectocontagiosa de naturaleza crónica, que afecta a seres humanos de todas las edades. Se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo de Koch y, según cifras oficiales de la Organización Mundial de Salud, hay aproximadamente 8 millones de nuevos casos de tuberculosis cada año y 2 millones de muertes por dicha enfermedad<sup>2</sup>. A pesar de la amplia disponibilidad de la vacuna antituberculosa (BCG), la incidencia ha ido en aumento. Además, se ha cuestionado la eficacia de dicha vacuna<sup>3,4</sup>, aunque está claro que las personas vacunadas tienen menor riesgo de desarrollar las formas extrapulmonares de la enfermedad, especialmente en el caso de la tuberculosis meníngea en los niños<sup>5,6</sup>.

El Dr. Palma-Nicolás cuenta con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para realizar sus estudios de doctorado en México (2002-2006). La UAM Reynosa Aztlán de la Universidad Autónoma de Tamaulipas brindó apoyo económico para la preparación del presente manuscrito.

Correspondencia: Dr. V. Bocanegra-García.  
Calle 16 y Lago de Chapala. Fracc. Aztlán. 88740 Reynosa. Tamaulipas. México.  
Correo electrónico: vbocanegra@uat.edu.mx

Recibido: 1-2-2006; aceptado para su publicación: 14-11-2006.

En México las cifras oficiales de la Secretaría de Salud indican que la tuberculosis ocupa el lugar 17 como causa de muerte en la población general en edad productiva, pero, al igual que en el resto del mundo, *M. tuberculosis* es el microorganismo que ocasiona el mayor número de defunciones por sí solo. Hasta la semana 28 del año 2006 se notificaron 7.257 casos nuevos de tuberculosis pulmonar y 76 casos nuevos de meningitis tuberculosa en México<sup>7</sup>; la Organización Mundial de la Salud informa de una prevalencia de 53 casos por cada 100.000 habitantes en las Américas en general<sup>2</sup>.

Tradicionalmente el diagnóstico de sospecha de la tuberculosis pulmonar se establece en individuos con tos crónica y evidencia radiológica de lesiones pulmonares, que con mayor frecuencia se presentan en la zona apical del pulmón derecho. Una vez agotados los criterios clínicos, el diagnóstico por pruebas de laboratorio continúa con la baciloscopia en esputo para demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes<sup>8</sup>, y para el diagnóstico definitivo se cultiva e identifica la especie infectante a partir de las secreciones bronquiales del paciente<sup>9</sup>. Sin embargo, a pesar de la variedad de estrategias disponibles en la actualidad, su valor diagnóstico es muy variable (tabla I). Aun sin considerar el tiempo necesario para llevar a cabo las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis requiere de 6 a 8 semanas, un tiempo considerablemente largo para retrasar la instauración del tratamiento con antifímicos (o antituberculosos). Por otro lado, la prescripción de los fármacos sin esperar a los resultados de sensibilidad in vitro, así como la falta de cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes, ha favorecido el surgimiento de resistencia a múltiples fármacos en cepas de *M. tuberculosis*. También es importante puntualmente que otros factores ajenos al diagnóstico de la infección, como el acceso a los servicios de salud, la atención médica oportuna, entre otros, también influyen negativamente en el control de la pandemia<sup>10</sup>.

Además de la rigurosa aplicación del tratamiento acortado y estrictamente supervisado, es imperativo el desarrollo y aplicación de nuevas estrategias que permitan el diagnóstico oportuno de la enfermedad, particularmente de métodos de bajo coste que permitan abordar la problemática de la tuberculosis desde una perspectiva poblacional. A continuación se presentan las estrategias en desarrollo que resultan más prometedoras para el diagnóstico y seguimiento epidemiológico de la tuberculosis: *a)* los métodos inmunológicos para la detección de anticuerpos circulantes en el paciente (diagnóstico serológico), y *b)* los métodos moleculares para la identificación y genotipificación de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

## Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos en estudio más comunes para el diagnóstico de la tuberculosis se basan en la detección de anticuerpos séricos formados contra antígenos de *Mycobacterium*, los cuales pueden ser proteínas, lípidos o hidratos de carbono, o bien en la identificación de antígenos específicos del bacilo en secreciones del paciente mediante el uso de anticuerpos monoclonales generados ex vivo.

### Pruebas basadas en la detección de anticuerpos

Los análisis basados en la detección de anticuerpos contra *M. tuberculosis* constituyen una alternativa muy importante a los métodos tradicionales para el diagnóstico de la tuberculosis activa, ya que detectan la respuesta inmunológica que se organiza ante la infección, y que no existe o se encuentra disminuida en los individuos infectados asintomáticos (con tuberculosis latente). Además, la clase de inmunoglobulina que se detecte (IgG o IgM) podría indicar si el proceso infeccioso se encuentra o no en curso. Otras ventajas de los métodos serológicos es que son sencillos de realizar, de bajo coste, no invasivos, etc. Sin embargo, una de las principales limitaciones del diagnóstico serológico es la carencia de antígenos altamente específicos y sensibles, como se describe a continuación.

En el enzimoimmunoanálisis (ELISA), o en una simplificación de éste (Dot-ELISA), se adsorben antígenos de *M. tuberculosis* en una fase sólida para llevar a cabo la captura de anticuerpos específicos contra la micobacteria a partir del suero de los pacientes. La captura del anticuerpo se pone de manifiesto mediante el empleo de un segundo anticuerpo conjugado con una enzima (frecuentemente peroxidasa), que al reaccionar con su sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) permite revelar la reacción antígeno-anticuerpo. Desafortunadamente, para la realización de esta prueba no es posible emplear un extracto total de las proteínas del bacilo, ya que en las poblaciones que son vacunadas sistemáticamente (como en México) se encuentra reactividad cruzada contra antígenos de la cepa vacunal (*M. bovis*-BCG) e incluso contra antígenos de las micobacterias saprofitas que son abundantes en el medio ambiente.

*Anticuerpos antiproteínas.* Una alternativa ha consistido en emplear antígenos purificados de *M. tuberculosis* para limitar la reactividad cruzada. Sin embargo, para la mayoría de los antígenos inmunodominantes, la respuesta humoral, aunque es muy intensa, resulta bastante heterogénea entre los pacientes tuberculosos<sup>14</sup>, de modo que no hay un antígeno que sea reconocido siste-

TABLA I  
Características de los principales métodos de apoyo diagnóstico en tuberculosis

Prueba	Tiempo requerido	Principales inconvenientes	Valor diagnóstico
Baciloscopia	3 días (3 muestras)	Sensibilidad baja y ninguna especificidad	No
Cultivo convencional	4-6 semanas	El tiempo que requiere	Sí
Reacción en cadena de la polimerasa	3-4 h	Coste elevado	Sí
Inmunodiagnóstico	4-6 h	No hay antígenos adecuados	No

TABLA II  
Principales antígenos proteicos en el diagnóstico

Antígeno	Sensibilidad	Especificidad	Aplicación	Estudio
ESAT-6	27%		TB latente	Silva et al <sup>16</sup>
CFP-10	25%	97%	TB BAAR-	Dillon et al <sup>17</sup>
16-kDa	57%		TB VIH+	Uma Devi et al <sup>18</sup>
30-kDa	61%	95%	TB pulmonar	Sada et al <sup>19</sup>
38-kDa	68%	96%	TB pulmonar	Espitia et al <sup>20</sup>
	63%	90%	TB VIH+	Ramalingam et al <sup>21</sup>
Mtb48	44,4%	93%	TB-VIH+	Lodes et al <sup>22</sup>
TB16.3	66%		TB BAAR-	Welding et al <sup>23</sup>
	88%		TB VIH+	Welding et al <sup>23</sup>
	98%		TB VIH-	Welding et al <sup>23</sup>
Mtb81	70%	99%	TB VIH+	Hendrickson et al <sup>24</sup>
U1 (21-kDa)	87,2%		TB VIH+	Mukherjee et al <sup>25</sup>

BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes; TB: tuberculosis; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

TABLA III  
Antígenos lipídicos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis (TB)

Antígeno	Sensibilidad	Especificidad	Aplicación	Estudio
DAT (diaciltrealosa)	81-88%	96-98%	TB pulmonar y extrapulmonar	Escamilla et al <sup>31</sup>
TAT (triaciltrealosa)	91-93%	96-98%	TB pulmonar	Escamilla et al <sup>31</sup>
DMT (dimicolato de trealosa)	66-74%	95-99%	TB pulmonar	López-Marín et al <sup>33</sup>
SL-1 (sulfolípidos)	81%	77%	TB pulmonar	Julián et al <sup>32</sup>

máticamente por todos ellos. Empleando uno de los antígenos más prometedores para el serodiagnóstico, la proteína de 38 kDa, se alcanza una sensibilidad de alrededor del 80% en pacientes con baciloscopias positivas, pero sólo de aproximadamente un 15% en el caso de pacientes con baciloscopias negativas<sup>15</sup>. Desde luego, uno de los grandes retos es disponer de una estrategia que permita diagnosticar rápidamente los casos de tuberculosis pulmonar con bacilos ácido-alcohol resistentes negativos, así como los casos de tuberculosis extrapulmonar, en los que la baciloscopia carece de utilidad. En la tabla II se recogen los principales antígenos proteicos utilizados para el diagnóstico<sup>16-25</sup>.

Para ampliar la sensibilidad y especificidad que se alcanzan con los antígenos puros se ha propuesto utilizar una mezcla de varios antígenos inmunodominantes a fin de cubrir toda la gama de respuestas que se dan entre los individuos de una población. En este sentido, mediante un panel de 9 antígenos (ESAT-6, 14-kDa, MPT63, 19-kDa, MPT64, MPT51, MTC28, 30-kDa, 38-kDa y KatG) se consiguió una sensibilidad del 90%<sup>14</sup>. Una de las ventajas de emplear antígenos proteicos para el inmunodiagnóstico es que éstos pueden producirse mediante la tecnología del ADN recombinante, lo que permite su expresión y purificación a gran escala, con el consiguiente abaratamiento de los costes de la prueba. Entre los antígenos recombinantes más innovadores que se han probado para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis destaca una poliproteína recombinante multiepitope (TbF6), expresada en *Escherichia coli* como proteína de fusión, que incluye regiones antigénicas de las proteínas Mtb8, 38-kDa, Mtb11 y Mtb48, y con la que se alcanzó una sensibilidad del 94%<sup>25,26</sup>.

Sin embargo, no solamente los antígenos proteicos son candidatos a ser considerados para el inmunodiagnóstico. La pared celular de *M. tuberculosis* es extraordinariamente rica en lípidos, glucolípidos y azúcares complejos para los que se ha demostrado que se organiza una respuesta inmunitaria humoral durante la infección<sup>27-28</sup>.

*Anticuerpos antilípidos.* Entre los lípidos y glucolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* destaca el grupo de los lípidos de trealosa –diaciltrealosa (DAT), triaciltrealosa (TAT), monomicolato de trealosa (MMT), dimicolato de trealosa (DMT) y los sulfolípidos (SL-1)–, para los que se ha demostrado, tanto en individuos tuberculosos como en modelos murinos de infección, que se producen anticuerpos específicos de las clases IgM, IgA e IgG<sup>29-32</sup>. Esto permite el diseño de métodos diagnósticos en los que se utilizan antígenos lipídicos purificados adsorbidos en una matriz sólida para la búsqueda de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes. Algunos de estos antígenos ya han demostrado su utilidad, como es el caso de la TAT, con la que se han alcanzado valores de sensibilidad y especificidad superiores a los obtenidos con antígenos proteicos (tabla III)<sup>31-38</sup>. Una ventaja adicional que representa la utilización de antígenos lipídicos es que la respuesta humoral no es tan heterogénea como con los antígenos proteicos.

*Anticuerpos antiazúcares.* El lipoarabinomanano (LAM) y sus precursores biosintéticos, los fosfatidilinositolmanósidos (PIM), también se encuentran abundantemente en la pared celular de *M. tuberculosis*, y asimismo se ha demostrado que durante la infección activa se producen anticuerpos de las clases IgM e IgG contra estos gluco-

conjugados<sup>34-35</sup>. Es de particular importancia destacar que, aunque el LAM se encuentra ampliamente distribuido en las diferentes especies del género *Mycobacterium*, la estructura fina de la molécula en su parte más externa es diferente en las especies patógenas y saprofitas<sup>36</sup>. Las especies patógenas de crecimiento lento (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, etc.) presentan glucosilación terminal con residuos de manosa (manLAM), mientras que en las especies saprofitas de crecimiento rápido (*M. fortuitum*, *M. smegmatis*, etc.) la fina estructura de la parte más externa está formada por residuos de arabinosa (araLAM) o no existe. Esto abre la posibilidad de que la respuesta humoral dirigida contra el LAM de las micobacterias patógenas pueda diferenciarse de la que se genera por el contacto con las especies saprofitas (no virulentas). Con el empleo del LAM se han alcanzado valores de sensibilidad del 85 al 93%<sup>37</sup>. Otro de los azúcares que se han probado como antígenos para el inmunodiagnóstico es el arabinomano, con el que se ha tenido muy poco éxito porque es estructuralmente muy similar entre las micobacterias, aunque se ha demostrado que se desencadena una respuesta humoral durante la infección (tabla IV)<sup>37,38</sup>. Desafortunadamente, el uso de lípidos y azúcares complejos como antígenos para el serodiagnóstico tiene el inconveniente de requerir el cultivo de *M. tuberculosis* y la purificación de dichos antígenos, algunos de los cuales se encuentran en muy escasa cantidad en la pared del bacilo.

#### Pruebas basadas en la detección de antígenos

Una estrategia más dentro de los métodos inmunológicos para el diagnóstico de la tuberculosis es la detección de antígenos específicos del patógeno en el suero y otras secreciones, particularmente en la orina, mediante el uso de anticuerpos monoclonales muy específicos. El antígeno más utilizado en los inmunoanálisis es de nue-

TABLA IV  
Azúcares complejos como antígenos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis (TB)

	Antígeno	
	LAM (lipoarabinomano)	AM (arabinomano)
Sensibilidad	85-93%	56%
Especificidad	89-100%	
Aplicación	TB pulmonar	TB pulmonar
Estudio	Chan et al <sup>37</sup>	Miller et al <sup>38</sup>

vo el LAM, seguido de algunas proteínas de secreción de la micobacteria. Como puede apreciarse en la tabla V<sup>39-43</sup>, los métodos inmunológicos de captura de antígeno ofrecen los valores de sensibilidad y especificidad más altos para el diagnóstico de la tuberculosis. Una ventaja muy importante de los métodos basados en la detección de antígeno es que pueden emplearse para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar.

#### Mimótopos peptídicos de antígenos no proteicos

Aunque los glucolípidos y azúcares complejos de la pared celular de *M. tuberculosis* constituyen excelentes alternativas como antígenos para el serodiagnóstico, presentan la limitación de que no pueden producirse de manera recombinante porque son productos genéticos secundarios; además, para muchos de ellos aún no se han caracterizado las rutas metabólicas que les dan origen. Sin embargo, desde hace mucho tiempo se ha demostrado que pequeños péptidos de 7 a 15 residuos aminoácidos pueden mimetizar la estructura tridimensional de algunos epítopes de hidratos de carbono complejos<sup>44-45</sup>. Lo anterior permite que tales péptidos, conocidos como mimótopos porque mimetizan epítopes, puedan reemplazar el uso de las moléculas complejas de lípidos y azúcares, imposibles de sintetizar químicamente o de manera recombinante. Actualmente se comercializan diversos sistemas que, a partir de una biblioteca combinatoria de péptidos expresados en fagos filamentosos (*phage display*), permiten el aislamiento de secuencias que puedan mimetizar conformacionalmente los determinantes antigénicos de moléculas complejas. Entre los mimótopos que se han generado para estructuras complejas de la pared celular de micobacterias destacan los producidos para determinantes antigénicos en el LAM y el glucolípido fenólico (PGL-1) de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, respectivamente<sup>46,47</sup>, citados en la tabla VI. La utilidad de dichos mimótopos para el serodiagnóstico está aún por explorar en cada uno de los casos.

#### Otras pruebas

Particularmente en los países donde la vacunación se aplica de manera sistemática, o donde la alta tasa de infección con micobacterias saprofitas ambientales complica el serodiagnóstico por el alto grado de reacción cruzada que se observa, ha comenzado a evaluarse la respuesta inmunitaria celular in vitro al derivado proteico purificado (PPD). En estos métodos las células mo-

TABLA V  
Antígenos micobacterianos identificados en fluidos biológicos

Antígeno	Sensibilidad	Especificidad	Aplicación	Muestra	Estudio
14-kDa	100%	100%	TB meníngea	LCR	Sumi et al <sup>39</sup>
43-kDa	96,7%	100%	TB pulmonar	Líquido pleural	Wadee et al <sup>40</sup>
	97,1%	100%	TB peritoneal	Líquido ascítico	Wadee et al <sup>40</sup>
	96%	100%	TB meníngea	LCR	Wadee et al <sup>40</sup>
LAM	74%	86,9%	TB pulmonar	Orina	Tessema et al <sup>41</sup>
LAM	67-88%	100%	TB pulmonar	Suero	Sada et al <sup>42</sup>
LAM	94%	100%	TB pulmonar	Esputo	Pereira et al <sup>43</sup>

LAM: lipoarabinomano; LCR: líquido cefalorraquídeo; TB: tuberculosis.

TABLA VI  
Mimótopos peptídicos de azúcares de micobacterias

	Antígeno	
	LAM (lipoarabinomano)	PGL-1 (glucolípidio fenólico)
Especie	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. leprae</i>
Mimótopo	QEPLMGTVPIRAGGGS	WTLGPYV
Estudio	Gevorkian et al <sup>47</sup>	Youn et al <sup>48</sup>

nonucleares del paciente con diagnóstico clínico de tuberculosis se estimulan con PPD, o con antígenos específicos (particularmente ESAT-6 y CFP-10), y se evalúa la proliferación celular, así como la producción de interferón gamma<sup>48-51</sup>. En esto se fundamenta el sistema QuantiFERON-TB Test (Cellestis Ltd., Carnegie, Victoria, Australia), recientemente aprobado por la Food and Drug Administration estadounidense para el diagnóstico de la tuberculosis. Una variante a la cuantificación de la producción de interferón gamma in vitro es la cuantificación directa de las células que lo producen mediante el análisis inmunoenzimático ELISPOT. Desafortunadamente la necesidad de cultivar in vitro las células de cada paciente encarece los costes del diagnóstico y limita su utilidad a escala poblacional.

### Métodos moleculares

Aunque los métodos inmunológicos, particularmente los serológicos, son bastante sencillos de realizar a escala poblacional, no dan información alguna acerca de la especie o cepa que causa la infección, por lo que para propósitos de vigilancia epidemiológica la genotipificación de los aislamientos clínicos mediante técnicas de biología molecular ha constituido siempre la herramienta de elección, y en fechas recientes dichas estrategias moleculares han comenzado a aplicarse para identificar micobacterias directamente en los fluidos biológicos de los pacientes con fines de diagnóstico. Sin embargo, en el caso de la identificación de *M. tuberculosis* no se cuenta con un gen único que permita hacer un diagnóstico fiable, y siempre es necesario llevar a cabo la amplificación de al menos 3 genes o regiones genómicas para poder tener un diagnóstico certero.

### Métodos que permiten la identificación de especies

Tradicionalmente la identificación de la especie a que corresponde un aislamiento clínico se realiza mediante una batería de pruebas bioquímicas y fisiológicas seriadas, por lo que se tarda mucho tiempo en llegar a la identificación precisa del agente aislado a partir de las secreciones del paciente. En los últimos años las tecnologías de hibridación de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la disponibilidad de los genomas completos de muchos de los microorganismos de interés médico han revolucionado la forma de encarar el diagnóstico microbiológico y la epidemiología de las enfermedades infecciosas.

*Las regiones de diferenciación.* Los métodos modernos de biología molecular, en particular los basados en la PCR, ofrecen la posibilidad de identificar de manera precisa a una gran diversidad de microorganismos, entre ellos las micobacterias, mediante el uso de iniciadores para PCR dirigidos contra secuencias genómicas específicas de género y especie. La secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*<sup>52</sup> y los primeros hallazgos de la genómica comparativa<sup>53-55</sup> han permitido identificar grandes pérdidas de material genético (deleciones) que caracterizan a las diferentes especies de micobacterias. Algunas de estas regiones de diferenciación están restringidas a las especies del complejo *M. tuberculosis* y permiten diferenciarlas de las micobacterias no patógenas (micobacterias no tuberculosas).

En el método descrito por Huard et al<sup>56</sup> en 2003 se emplean 6 pares de iniciadores para PCR dirigidos contra los loci Rv0577, Rv3349c, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8 y Rv3120, que generan amplicones de 400-1.200 pares de bases (tabla VII) que permiten la identificación de *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtipo I, *M. africanum* subtipo II, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. caprae*, *M. microti* y *M. canetti*. Además, la carencia de productos de amplificación para estas regiones genómicas permite catalogar a un aislamiento clínico como micobacteria no tuberculosa.

### PCR-RFLP (polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción) de hsp65

Para la diferenciación de las micobacterias que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis* se ha hecho uso de la variabilidad del gen *hsp65*, que codifica para una

TABLA VII  
Iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de micobacterias de relevancia clínica

Región diana	Iniciadores	Producto esperado (pares de bases)
Rv0577	5'-ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA-3' 5'-CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA-3'	786
Rv3349c	5'-GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT-3' 5'-AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA CCA TTG ACT-3'	943
Rv1510	5'-GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC-3' 5'-TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C-3'	1.033
Rv1970	5'-GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC-3' 5'-CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG-3'	1.116
Rv3877/8	5'-CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC-3' 5'-CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C-3'	999
Rv3120	5'-GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT-3' 5'-GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T-3'	404

proteína de choque térmico que se halla presente en todas las micobacterias<sup>57</sup>. En el método descrito originalmente por Telenti et al<sup>58</sup> en 1993, se amplifica por PCR una región de 439 pares de bases, que posteriormente es digerida con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, cuyos patrones de restricción para la secuencia amplificada de *hsp65* pueden identificarse visualmente, o bien puede emplearse un programa computacional para automatizar el análisis. El uso de otras enzimas de restricción como *Sau961*, *CfoI*<sup>59</sup>, o *AvaII*, *HphI*, *HpaII*<sup>60</sup> ha permitido la diferenciación de hasta 62 especies de micobacterias no tuberculosas del género *Mycobacterium*.

#### Métodos para la genotipificación de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*

Para la genotipificación de aislamientos clínicos se cuenta principalmente con métodos basados en la hibridación con sondas de ADN derivadas de elementos repetitivos que caracterizan al complejo *M. tuberculosis*. Las 2 técnicas más empleadas son la hibridación tipo *Southern blot* (RFLP-IS6110) y los espoligotipos, aunque recientemente el uso del número variable de repeticiones en tándem (VNTR) ha demostrado ser también de gran utilidad.

**RFLP-IS6110.** La genotipificación por RFLP se basa en que las diferentes cepas o aislamientos clínicos presentan variaciones discretas en su material genético que pueden ponerse en evidencia al digerir el ADN con enzimas de restricción de corte frecuente, lo que genera patrones de digestión que permiten diferenciarlas<sup>61</sup>. Las enzimas de restricción más frecuentemente empleadas (*BstEII* y *BcII*) generan múltiples bandas que dificultan el análisis, por lo que se ha generalizado el uso de sondas radiomarcadas derivadas de elementos repetitivos –secuencias de inserción–, que varían en cuanto al número de copias y su distribución en los genomas de las micobacterias. Esta técnica requiere partir de cepas aisladas por cultivo, extraer el ADN de las micobacterias, digerirlo con una enzima de restricción que corte el elemento de inserción (generalmente *PvuII* para cortar IS6110), resolver el ADN digerido en agarosa o poliacrilamida, transferirlo a membranas de nitrocelulosa e hibridizar con una sonda para IS6110 marcada radiactivamente, aunque en la actualidad puede emplearse el marcado no radiactivo, con biotina o digoxigenina. Debido a que *M. tuberculosis* contiene de 8 a 20 copias de IS6110 (depende de la cepa), con este método se detectan de 16-40 bandas, que permiten hacer la diferenciación y clasificación de los aislamientos clínicos<sup>62</sup>.

Otra de las secuencias de inserción que se utilizan para la diferenciación de cepas de micobacterias es la IS1081 (1.324 pares de bases), que se encuentra en las cepas del complejo *M. tuberculosis*, pero, debido a que tiene un bajo número de copias, tiene un uso limitado en estudios epidemiológicos; también presenta el inconveniente de no poder diferenciar a *M. bovis*-BCG de otros miembros del complejo *M. tuberculosis*<sup>63</sup>.

**Espoligotipos** (spoligotyping). En este método se aprovecha el alto grado de polimorfismo del locus DR de *M. tuberculosis*<sup>64</sup>. Dicho locus contiene repeticiones

directas de 36 pares de bases, separadas por secuencias no repetitivas de 34-41 pares de bases, y las cepas varían tanto en el número de repeticiones directas como en la presencia o ausencia de algunos de los espaciadores. En el método de espoligotipos las secuencias conservadas de las repeticiones directas se emplean como diana para la amplificación por PCR, y se aprovecha la alta variabilidad en las regiones espaciadoras para obtener diferentes patrones de hibridación de dicho producto amplificado contra oligonucleótidos espaciadores sintéticos que se fijan covalentemente a una membrana de nitrocelulosa. En el método descrito por Kamerbeek et al<sup>65</sup> en 1997 se emplea un conjunto de 43 espaciadores que, además de permitir la tipificación de cepas de *M. tuberculosis*, las diferencia de las de *M. bovis* y *M. bovis*-BCG.

En 2002 Van der Zanden et al<sup>66</sup> introdujeron 51 nuevos espaciadores que aumentan de forma considerable la capacidad de dicha estrategia para la genotipificación.

**Número variable de repeticiones en tándem (VNTR).** Al igual que los minisatélites descritos en genomas eucarióticos, en *M. tuberculosis* se han encontrado 41 regiones de 40-100 pares de bases de secuencias repetitivas dispuestas en tándem, llamadas MIRU (de *Mycobacterial interspersed repetitive units* –unidades repetitivas intergenicas dispersas de micobacterias–). De éstas, 12 loci son lo suficientemente polimórficos en cuanto a su número de copias en los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y ya han comenzado a aplicarse con éxito en estudios epidemiológicos<sup>67</sup>. Además, el uso de MIRU-VNTR para la genotipificación de aislamientos clínicos tiene la ventaja de poder automatizarse.

#### Conclusiones

Sin lugar a duda las estrategias moleculares constituyen una herramienta insuperable en el campo de la microbiología de la tuberculosis, ya que en cuestión de horas es posible determinar con precisión la especie a que pertenece un determinado aislamiento clínico. Más aún, mediante el análisis de los espoligotipos o de VNTR es posible llevar a cabo el seguimiento epidemiológico adecuado. Desafortunadamente, aunque las técnicas moleculares son lo bastante sensibles para detectar ADN a partir de sólo 2 micobacterias, su aplicación en el diagnóstico de la tuberculosis no ha tenido el éxito que se esperaba, principalmente debido a la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras clínicas. Sin embargo, el uso de la PCR, una vez que se ha aislado el agente etiológico mediante el cultivo de las muestras clínicas en los medios convencionales, reduce a sólo unas horas la identificación de la especie. Otro de los motivos por los que el cultivo difícilmente será superado es que no tiene rival para el estudio de la sensibilidad a los fármacos, aun cuando se han descrito diversos métodos moleculares para el análisis de genes micobacterianos asociados a la resistencia a fármacos<sup>68</sup>.

Por otro lado, las características que hacen que los métodos serológicos sean tan atractivos (sencillez, bajo coste, etc.), una vez superado el problema de la disponibilidad de antígenos específicos, permitirían sustituir la



baciloscopia como método de apoyo al diagnóstico y diseñar estudios de prevalencia de la tuberculosis a escala poblacional.

El valor predictivo de los diversos métodos no es una cuestión totalmente definida, sobre todo para los métodos que aún se encuentran en estudio. La baciloscopia, por ejemplo, tiene una sensibilidad muy baja (10%), por lo que un valor negativo no descarta la presencia del bacilo; sin embargo, un resultado positivo constituye una evidencia fidedigna de la presencia de *M. tuberculosis* en un paciente que presenta las características clínicas de la enfermedad. Por su parte, el cultivo tradicional tiene un valor predictivo más alto (95%) y, juntamente con las pruebas bioquímicas, constituye la técnica de referencia en la identificación del bacilo de Koch; sin embargo, como es bien conocido, el tiempo que se requiere para llegar a un diagnóstico preciso es extraordinariamente largo<sup>69</sup>. Por su parte, los innovadores métodos inmunológicos para la detección de anticuerpos presentan en general valores muy bajos de sensibilidad y especificidad, y aunque la captura de antígenos micobacterianos, particularmente la detección de glucolípidos, parece muy prometedora, hoy día no se lleva a cabo de forma sistemática, sobre todo por la falta de disponibilidad y/o comercialización de anticuerpos monoclonales específicos. Por último, entre los métodos moleculares en estudio, la PCR constituye la mejor opción para la identificación directa de *M. tuberculosis*, aunque sólo detecta la presencia de su material genético, sin posibilidad de informar acerca de la viabilidad del bacilo. Por lo anterior, aún no es posible disponer de una estrategia diagnóstica rápida que presente todas las ventajas requeridas para que su implementación a gran escala permita hacer frente al avance de la epidemia, por lo que sigue siendo necesario el criterio clínico junto a las pruebas de laboratorio y resulta preciso continuar en la búsqueda de nuevas estrategias.

### Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud a Erika Segura Salinas y Paulina Lezama Núñez, del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, por sus oportunas sugerencias y aportaciones al presente trabajo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Inderlied CB, Kemper CA, Bermúdez LE. The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev. 1993;6:266-310.
- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2006.362).
- Collette G, Bourhaba M, Moutschen M. Should the BCG vaccine still be recommended? Rev Med Liege. 2006;61:430-2.
- Vanderschueren S, Peetermans W, Bobbaers H. Is BCG vaccination against tuberculosis still indicated? Acta Clin Belg. 1994;49:138-47.
- Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. Lancet. 2006;367:1173-80.
- Puvacic S, Dizdarevic J, Santic Z, Mulaomerovic M. Protective effect of neonatal BCG vaccines against tuberculous meningitis. Bosn J Basic Med Sci. 2004;4:46-9.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud. Epidemiología. 2006;29:5-6.
- INDRE. Manual de técnicas de laboratorio para el examen baciloscópico. 1.ª ed. México: INDRE; 2003.

- Escobar Gutiérrez A, editor. Manual de procedimientos de laboratorio n.º 18 INDRE/SAGAR: tuberculosis. México, DF: Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Organización Panamericana de la Salud; 1996.
- García-Pachón E, Rodríguez JC. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. Arch Bronconeumol. 2005;41:618-24.
- Weir RE, Black GF, Nazareth B, Floyd S, Stenson S, Stanley C, Branson K, et al. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette-Guérin vaccination in southern England and northern Malawi. Clin Exp Immunol. 2006;146:390-9.
- Prasad R, Yadav G. Identification of a 75 kDa highly immunodominant antigen from *Mycobacterium smegmatis* and cross-reactivity with other species. Indian J Exp Biol. 2001;39:255-62.
- Oftung F, Borka E, Kvalheim G, Mustafa AS. Mycobacterial crossreactivity of *M. tuberculosis* reactive T cell clones from naturally converted PPD positive healthy subjects. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998;20:231-8.
- Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Jahdali HA, Menzies D, Gennaro ML. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. Infect Immun. 1998;66:3936-40.
- Wilkins EGL. The serodiagnosis of tuberculosis. En: Davies PDO, editor. Clinical tuberculosis. London: Chapman and Hall Medical; 1994. p. 367-80.
- Silva VMC, Kanaujia G, Gennaro ML, Menzies D. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2003;7:478-84.
- Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Bement T, Campos Neto A, Skeiky YAW, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, and immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis*-BCG. J Clin Microbiol. 2000;38:3285-90.
- Uma Devi KR, Ramalingam B, Raja A. Antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* and 16kDa antigens in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;46:205-9.
- Sada E, Ferguson L, Daniel TM. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000 dalton native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 1990;162:928-31.
- Espitia C, Cervera I, Gonzales R, Mancilla R. A 38 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serological evaluation. Clin Exp Immunol. 1989;77:373-7.
- Ramalingam B, Uma Devi KR, Raja A. Isotype-specific anti-38 and 27 kDa (mpt51) response in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. Scand J Infect Dis. 2003;35:234-9.
- Lodes MJ, Dillon DC, Mohamath R, Day CH, Benson DR, Reynolds LD, et al. Serological expression cloning and immunological evaluation of MTB48, a novel *Mycobacterium tuberculosis* antigen. J Clin Microbiol. 2001;39:2485-93.
- Welding K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty TM, Andersen P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. J Clin Microbiol. 2005;43:57-65.
- Hendrickson RC, Douglass JF, Reynolds LD, McNeill PD, Carter D, Reed SG, et al. Mass spectrometric identification of Mtb81, a novel serological marker for tuberculosis. J Clin Microbiol. 2000;38:2354-61.
- Mukherjee S, Daifalla N, Zhang Y, Douglass J, Brooks L, Vedvick T, et al. Potential serological use of a recombinant protein that is a replica of a *Mycobacterium tuberculosis* protein found in the urine of infected mice. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11:280-6.
- Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, Reynolds LD, Day CH, McNeill PD, et al. Use of multi-epitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9:883-91.
- Cardona PJ, Julián E, Vallés X, Gordillo S, Muñoz M, Luquin M, et al. Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. Scand J Immunol. 2002;55:639-45.
- Fujita Y, Doi T, Sato K, Yano I. Diverse humoral immune response and changes in IgG antibody levels against mycobacterial lipid antigens in active tuberculosis. Microbiol. 2005;151:2065-74.

29. Cruaud PH, Berlie C, Torgal-García J, Pappa F, David HL. Human IgG antibodies immunoreacting with specific sulfolipids from *Mycobacterium tuberculosis*. Zentbl Bakteriologie. 1989;271:481-5.
30. Savage C, Vincent P, Leclerc H. Serodiagnosis of tuberculosis. Evaluation of a sulpholipid antigen. Zentbl Bakteriologie. 1993;278:49-57.
31. Escamilla L, Mancilla R, Glender W, López-Marín LM. *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 1996;154:1864-7.
32. Julián E, Matas L, Pérez A, Alcaide J, Lanéelle MA, Luquin M. Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. J Clin Microbiol. 2002;40:3782-8.
33. López-Marín LM, Segura E, Hermida-Escobedo C, Lemassu A, Salinas-Carmona MC. 6,6-dimycoloyl trehalose from a rapidly growing *Mycobacterium*: an alternative antigen for tuberculosis serodiagnosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;36:47-54.
34. Sousa AO, Henry S, Marója FM, Lee FK, Brum L, Singh M, et al. IgG subclasses distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis. Clin Exp Immunol. 1998;111:48-55.
35. Tessema TA, Hamassur B, Bjune G, Svenson S, Bjorvatn B. Diagnostic evaluation of urinary lipoarabinomannan at an Ethiopian Tuberculosis Centre. Scand J Infect Dis. 2001;33:279-84.
36. Nigou J, Geuilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. Biochimie. 2003;85:153-66.
37. Chan ED, Reves R, Belisle JT, Brennan PJ, Hahn W. Diagnosis of tuberculosis by visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:1713-9.
38. Miller RA, Dissanayake S, Buchanan TM. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using arabinomannan from *Mycobacterium smegmatis*: a potentially useful screening test for the diagnosis of incubating leprosy. Am J Trop Med Hyg. 1983;32:555-64.
39. Sumi MG, Mathai A, Sarada C, Radhakrishnan VV. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a dot immunobinding assay to detect mycobacterial antigen in cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol. 1999;37:3925-7.
40. Wade AA, Boting L, Reddy SG. Antigen capture assay for detection of a 43-kilodalton *Mycobacterium tuberculosis* antigen. J Clin Microbiol. 1990;28:2786-91.
41. Tessema TA, Bjune G, Hamasur B, Svenson S, Syre H, Bjorvatn B. Circulating antibodies to lipoarabinomannan in relation to sputum microscopy, clinical features and urinary anti-lipoarabinomannan detection in pulmonary tuberculosis. Scand J Infect Dis. 2002;34:97-103.
42. Sada E, Aguilar D, Torres M, Herrera T. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. J Clin Microbiol. 1992;30:2415-8.
43. Pereira LM, Nguyen LN, Ho LM, Kuijper S, Jansen HM, Kolk AHJ. Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. J Clin Microbiol. 2000;38:2278-83.
44. Meloen RH, Puijk WC, Slootstra JW. Mimotopes: realization or fan unlikely concept. J Mol Recog. 2000;13:352-9.
45. Monzavi-Karbassi B, Cunto-Amesty G, Luo P, Kieber-Emmons T. Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. Trends Biotech. 2002;20:207-14.
46. Youn JH, Myung HJ, Liav A, Chatterjee D, Brennan PJ, Choi IH, et al. Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004;41:51-7.
47. Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma JP, Espitia C, Manoutcharian K, et al. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. Biochem J. 2005;387:411-7.
48. Schölvinck E, Wilkinson KA, Whelan AO, Martineau AR, Levin M, Wilkinson RJ. Gamma interferon-based immunodiagnosis of tuberculosis: comparison between whole-blood and enzyme-linked immunosorbent methods. J Clin Microbiol. 2004;42:829-931.
49. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. Clin Diag Lab Immunol. 2005;12:491-6.
50. Hill PC, Jackson-Sillah D, Fox A, Franken KL, Lugos MD, Jeffries DJ, et al. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection by ex vivo enzyme-linked immunosorbent assay in the Gambia. J Clin Microbiol. 2005;43:2070-4.
51. Goletti D, Vicenti D, Carrara S, Butera O, Bizzoni F, Bernardini G, et al. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diag Lab Immunol. 2005;12:1311-6.
52. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;393:537-44.
53. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. Gen Res. 2001;11:547-54.
54. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:3684-9.
55. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, et al. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:4865-70.
56. Huard RC, Oliveira-Lazzarini LC, Butler WR, Van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomics deletions. J Clin Microbiol. 2003;41:1637-50.
57. Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1987;169:1080-8.
58. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993;31:175-8.
59. Wong DA, Yip PCW, Cheung DTL, Kam KM. Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex species, and other commonly isolated mycobacteria. J Clin Microbiol. 2001;39:3768-71.
60. Hong K, Sun-Hyun K, Tae-Sun S, Mi-na K, Gill-Han B, Young-Gil P, et al. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 pb heat shock protein 65 (hsp65) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. J Microbiol Meth. 2005;62:199-209.
61. Collins DM, Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of *M. tuberculosis* and *M. bovis*-BCG. J Gen Microbiol. 1984;130:1019-21.
62. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Guicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardised methodology. J Clin Microbiol. 1993;31:406-9.
63. Van Soolingen D, Hermans PW, De Hass PE, Van Embden JD. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis*-BCG. J Clin Microbiol. 1992;30:1772-7.
64. Groenen PMA, Bunschoten AE, Van Soolingen D, Van Embden JDA. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: application for strain differentiation by a novel method. Mol Microbiol. 1993;105:1057-65.
65. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997;35:907-14.
66. Van der Zanden AGM, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. J Clin Microbiol. 2002;40:4628-39.
67. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Guicquel B, et al. High-resolution minisatellite based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:1901-6.
68. Palomino JC. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. Curr Opin Pulm Med. 2006;12:172-8.
69. Escobar Gutiérrez A, editor. Manual de procedimientos de laboratorio n.º 18 INDRE/SAGAR: Tuberculosis. México D. F.: Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Organización Panamericana de la Salud; 1996.