

Evolución del Diagnóstico Microbiológico de Tuberculosis:

una revisión a través de la trayectoria de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB

Evolution of Microbiological Diagnosis of Tuberculosis: A Review Through the History of the Bacteriology and Mycobacteria Unit of the Corporation for Biological Research (CIB)

Jaime Robledo MD, PhD*

* Grupo de Investigación Unidad de Bacteriología y Micobacterias CIB-UPB, Medellín, Colombia. Investigador Emérito, Ministerio de Ciencias, Colombia.

Cómo citar: Robledo, Jaime. (2024). Evolución del Diagnóstico Microbiológico de Tuberculosis: una revisión a través de la trayectoria de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB [*Evolution of Microbiological Diagnosis of Tuberculosis: A Review Through the History of the Bacteriology and Mycobacteria Unit of the Corporation for Biological Research (CIB)*]. Anales de la Academia de Medicina de Medellín (An Acad Med Medellín) 20(2):55-67.

<https://doi.org/10.56684/ammd/2024.2.07>

Resumen

La tuberculosis continua como una de las enfermedades transmisibles con más morbilidad y mortalidad. La meta propuesta por las Naciones Unidas en sus Objetivos de Desarrollo Sostenible de terminar la pandemia de varias de las enfermedades infecciosas, incluyendo la tuberculosis, para el 2030, probablemente no se cumpla. En la cadena de atención de un paciente con tuberculosis, el diagnóstico es el eslabón más débil, puesto que no se diagnostican todos los pacientes que se deben diagnosticar para poder recibir un tratamiento. Ha sido por lo tanto una necesidad el diseño, desarrollo y evaluación de nuevos métodos diagnósticos con el fin de mejorar el diagnóstico y disminuir la brecha que existe en la atención del paciente con tuberculosis. Desde el inicio de los métodos diagnósticos para tuberculosis con la publicación de Koch, este diagnóstico ha evolucionado desde la microscopía, pasando por diversos tipos de cultivos, hasta los métodos de biología molecular que marcaron un hito en el diagnóstico la enfermedad. Mas reciente la aplicación de la secuenciación genómica de nueva generación ha permitido mejorar no solo el diagnóstico sino la detección de la resistencia a medicamentos. En esta revisión se presenta la evolución del

diagnóstico de la tuberculosis desde la trayectoria de investigación y publicaciones de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB, un grupo de investigación que ha tenido como uno de sus objetivos de investigación contribuir a mejorar el diagnóstico de la enfermedad.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico de tuberculosis, evolución del diagnóstico.

Abstract

Tuberculosis remains one of the most transmissible diseases with significant morbidity and mortality. The United Nations' Sustainable Development Goals aim to end the pandemic of several infectious diseases, including tuberculosis, by 2030, but this target is unlikely to be met. In the care chain of a tuberculosis patient, diagnosis is the weakest link, as not all patients who need to be diagnosed receive a diagnosis and, consequently, treatment. Therefore, it has been essential to design, develop, and evaluate new diagnostic methods to improve diagnosis and reduce the gap in tuberculosis patient care. Since the inception of tuberculosis diagnostic methods with Koch's publication, these methods have evolved from microscopy through various types of cultures to molecular biology methods, which marked a milestone in disease diagnosis. More recently, the application of next-generation genomic sequencing has improved not only diagnosis but also the detection of drug resistance. This review presents the evolution of tuberculosis diagnosis through the research and publications of the Bacteriology and Mycobacteria Unit of the CIB, a research group that has aimed to contribute to the improvement of disease diagnosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis diagnosis, evolution of diagnosis.

La situación actual de la tuberculosis

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2022 se estimaron 10.6 millones de casos nuevos, lo que supone 133 casos por cada 100.000

habitantes. Esta incidencia representó un incremento 1.9% mayor a la reportada en el 2020 y 2021. El número de muertes, 1.13 millones en pacientes sin VIH y 167.000 en pacientes co-infectados VIH-TB, estuvo cerca de las cifras reportadas para el 2019 (1). Las cifras de incidencia y mortalidad están muy por debajo de las metas planteadas por la OMS en su estrategia Fin de la Tuberculosis, las cuales establecieron una reducción en el número de casos del 50% y 75% en las muertes en el período 2015-2025 (2).

El retroceso en el control de la enfermedad observado para el 2022, en parte es explicado por la pandemia de Covid-19, en donde se afectaron todos los servicios de salud disminuyendo en el caso de tuberculosis, la búsqueda, diagnóstico y tratamiento de muchos casos (1). De hecho, en el 2021 de un estimado de 10.6 millones de casos de tuberculosis solamente se reportaron como diagnosticados 6.4 millones (3).

Colombia para el 2022 y en el contexto de las Américas se ubica como un país de incidencia media con un estimado de casos de 25000 y una incidencia de 47 por 100.000 habitantes, de estos fueron notificados el 78.7% de los casos. Desde 2019, los datos del país evidencian una brecha creciente en el diagnóstico (diferencia entre los datos estimados y los notificados), lo que significa que entre un 15% y 20 % de los casos no se diagnostican y tratan (Fuente: Registro de TB sensible y resistente, SIVIGILA, 2023).

Es evidente que no se diagnostican todos los casos de tuberculosis y mientras esta situación subsista estaremos lejos de cumplir la eliminación de la tuberculosis para el año 2030 como lo establece en uno de sus apartes la declaración de las Naciones Unidas para los Objetivos de Desarrollo Sostenible (4).

La importancia del diagnóstico en el control de la tuberculosis

El diagnóstico es un eslabón crucial en la cascada de atención del paciente con tuberculosis y es el eslabón más débil en las acciones necesarias

para controlar la tuberculosis, de acuerdo con esto y expresado en una publicación reciente “Si no podemos identificar pacientes con tuberculosis, no podemos tratarlos y si no los tratamos no podremos controlar la tuberculosis” (5).

Mejorar el diagnóstico desde el punto de vista de desempeño de los métodos, pero también de su rapidez para generar un resultado y su accesibilidad, ha sido un propósito impulsado por la Organización Mundial de la Salud desde hace varias décadas.

El diagnóstico microbiológico basado en la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo del paciente, fue un elemento crucial de la estrategia DOTS (directly observed short course therapy) recomendada por la OMS, la cual incluye la detección pasiva de casos mediante la microscopía y la terapia de corta duración con una observación directa de su administración acompañadas de la medición de los desenlaces del tratamiento y la garantía de suministro de medicamentos (6). La implementación de esta estrategia significó el rápido control de la tuberculosis en la mayoría de los países desarrollados en la segunda década del siglo XX (7). Estrategias posteriores como “Stop TB” y “End of TB” han contribuido a disminuir progresivamente la incidencia de la enfermedad, aunque probablemente sin lograr las metas establecidas por esta última para el 2030, de eliminar la enfermedad, menos de 1 caso por millón de habitantes (8).

La detección de casos mediante el diagnóstico microbiológico es esencial para identificar el paciente e iniciar un tratamiento, como para definir qué tipo de tratamiento recibe. Esto último es importante en pacientes con tuberculosis resistente a algún medicamento, como en las formas de tuberculosis multirresistente (MDR-TB) y extensamente resistente (XDR-TB).

Evolución en el tiempo de métodos microbiológicos para el diagnóstico de tuberculosis

La microscopía el origen del diagnóstico microbiológico de la tuberculosis

Robert Koch identificó en 1882 el bacilo causante de la tuberculosis, además mejoró el método de teñirlo para hacerlo evidente por microscopía y diseñó un medio de cultivo para aislarlo en el laboratorio (9).

El poder identificar los bacilos ácido alcohol-resistentes en las secreciones respiratorias de los pacientes tiene aproximadamente 142 años de haber sido desarrollado y todavía sigue vigente como método diagnóstico inicial simple, rápido en proporcionar resultados y de bajo costo. Sin embargo, tiene su mejor utilidad para identificar pacientes con tuberculosis pulmonar bacilífera, los cuales son los casos más infecciosos pues su límite de detección es 5000 a 10000 bacilos por mL de esputo; su sensibilidad en pacientes con formas paucibacilares como niños, pacientes que conviven con VIH y pacientes con enfermedad extrapulmonar es reducida (10) y su especificidad se disminuye de acuerdo a la prevalencia de enfermedad por micobacterias no tuberculosas; su bajo costo que permite su uso en sitios con pocos recursos, se asocia a desventajas como la reducida sensibilidad en los casos mencionados, además necesita un sistema de control de calidad que garantice su buen desempeño y es dependiente de la experticia del microscopista y de la buena calidad de las muestras (11).

Poco ha evolucionado la microscopía desde la época de Koch, con excepción de mejoras en el microscopio y las técnicas de tinción. Una mejora relativamente reciente y que se convirtió en estándar actual, es la coloración de los extendidos con auramina-rodamina, dos colorantes fluorescentes que tiñen los bacilos y los vuelve más evidentes con lo que se observan con menor magnificación y por lo tanto se examina el extendido en menor tiempo, además mejora la sensibilidad de la microscopía hasta en un 10% y permite reducir costos de mantenimiento con el uso de lámparas tipo LED, menos costosas que las de vapor de mercurio tradicionalmente usadas (12).

Aunque la microscopía ha sido y es la base del diagnóstico en muchos lugares debido a su bajo costo, en su más reciente publicación de su manual

operacional en tuberculosis, la OMS recomienda a los programas nacionales de control de la tuberculosis hacer la transición de reemplazo del uso de la microscopía por otras metodologías basadas en métodos moleculares que tienen un mejor desempeño y precisión (13).

Medios de cultivo en el diagnóstico microbiológico de tuberculosis

A hoy el cultivo es el método estándar para la confirmación bacteriológica de tuberculosis utilizando medios líquidos (13). El medio de cultivo inicial desarrollado por Robert Koch fue esencial en la demostración del bacilo tuberculoso como el agente etiológico de enfermedad. Poco después de las demostraciones de Koch, Dorset desarrolló un medio de cultivo cuya base era el huevo (14) y posteriormente Lowenstein desarrollo un medio a base de huevo con verde de malaquita como inhibidor de contaminantes, con la ventaja de ser de fácil fabricación y poco costoso (15). En 1947 Dubos y Middlebrook (16), publicaron dos medios de cultivo denominados 7H10 y 7H11 y diseñados con base en agar suplementado con OADC (a. oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), la posterior adición de una mezcla de antibióticos que inhibían el crecimiento de microorganismos contaminantes facilitó su uso (17). Estos medios de cultivo además de ser definidos en sus componentes tienen la ventaja sobre el Lowenstein-Jensen (LJ), que permiten detectar el crecimiento más temprano y observar mejor la morfología de las colonias; sin embargo, tienen como desventaja el que tienen componentes como la albúmina que los hacen más costosos y necesitan incubación en atmósfera de CO₂ (18).

El agar de capa delgada (ACD): En el laboratorio de bacteriología y micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas se comenzaron a evaluar medios de cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) con el objetivo de disminuir el tiempo de reporte de resultados, una de las principales desventajas del medio de cultivo como método diagnóstico. En un primer estudio se utilizaron 761 muestras clínicas de pacientes

con sospecha de tuberculosis y se cultivaron en paralelo en LJ y 7H11 con el fin de determinar si la observación microscópica en un medio translucido como es el 7H11 servido en una caja de Petri con una delgada capa de agar (agar de capa delgada -ACD-) permitía reportar crecimiento de *M. tuberculosis* más rápido al observar el crecimiento de microcolonias por medio de un microscopio. En el ACD se detectó crecimiento del 60% de las muestras positivas en los primeros 10 días con ninguna detección en el LJ, a las dos semanas, el 80% de las muestras positivas se detectó en ACD y el 10% en LJ. Estos hallazgos demostraron que la observación microscópica de microcolonias características de *M. tuberculosis* en ACD, permiten reportar resultados más rápidos en muestras clínicas cultivadas (19) (figura 1).

Figura 1: microcolonias de *M. tuberculosis* crecimiento a los 8 días de incubación en agar de capa delgada y observado a través de microscopio con objetivo de 10X. ACD: agar control de crecimiento; ACD+PNB: agar más ácido paranitrobenzoico; ACD+INH: agar más concentración crítica de isoniazida; ACD+RIF: agar más concentración crítica de rifampicina (microfotografía del Grupo de Bacteriología y Micobacterias CIB-UPB)

Posteriormente se publicó la evaluación de 1801 muestras clínicas sembradas en ambos medios de cultivo, confirmando los hallazgos iniciales de un resultado más rápido obtenido por ACD, con un promedio de 11 días comparado con el LJ que fue de 26.5 días (20). Con base en estos hallazgos se desarrolló un proyecto multicéntrico con laboratorios de diagnóstico de tuberculosis de varios países de Latinoamérica que hacían parte de la Red Latinoamericana de Tuberculosis, RELACTB. Los resultados obtenidos fueron similares con respecto a la rapidez en obtener positividad en ACD, 11.5 días para el cultivo de ACD y 30.5 días para el LJ (Robledo et al, 2006).

Estas publicaciones demostraron la utilidad del cultivo en ACD para el reporte de resultados más temprano, además de la facilidad para observar microcolonias características de *M. tuberculosis* que permiten diferenciarlas de microcolonias de

especies de micobacterias no tuberculosas; sin embargo, también demostraron algunas de sus limitaciones, como una menor sensibilidad frente al estándar LJ, una mayor frecuencia de contaminación y el requerir más tiempo del profesional para observar el medio de cultivo a través del microscopio. De acuerdo con esto, se recomendó utilizar la siembra de las muestras clínicas en ambos medios de cultivo para aprovechar la rapidez en obtener resultados de ACD con una mayor sensibilidad del estándar LJ y mejorar la sensibilidad de detección de cultivos positivos al utilizar concomitantemente los dos medios de cultivo (Mejía et al., 1999; Mejía et al., 2004; Robledo et al., 2006).

El obtener un diagnóstico más rápido por cultivos era posible utilizando el agar de capa delgada, pero de acuerdo con el aumento de resistencia a medicamentos antituberculosos comenzó a ser una necesidad obtener también resultados oportunos de sensibilidad a los medicamentos de primera línea, rifampicina (RF) e isoniacida (IN), para establecer un tratamiento adecuado y rápido. Con este propósito se desarrolló y se evaluó un medio de cultivo basado en la experiencia previa con ACD que al mismo tiempo permitiera definir la sensibilidad a RF/IN. El medio desarrollado utiliza una caja de Petri dividida en cuadrantes, en un cuadrante está el medio de ACD (Middlebrook 7H11), otro cuadrante con el mismo medio y un inhibidor específico de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (ácido paranitrobenzoico), el tercer y cuarto cuadrante con una concentración crítica de IN y de RF respectivamente. Al sembrar la muestra del paciente después de descontaminarla, si el cultivo es positivo, define si es *M. tuberculosis* o si es una especie de micobacteria no tuberculosa de acuerdo al no crecimiento o crecimiento en el cuadrante con el inhibidor e igualmente el crecimiento o no crecimiento en los cuadrantes con RF e IN determinan la sensibilidad o resistencia a estos antibióticos (23). Los resultados fueron comparables con métodos estándar de susceptibilidad a medicamentos antituberculosos y se obtuvieron entre 11 y 11,5 días después de cultivadas las muestras clínicas, lo cual representa un resultado 10 días más rápido que los métodos estándar de referencia (23). En conclusión, el ACD con determinación de susceptibilidad

a medicamentos de primera línea representó un avance importante en la disminución de tiempo para reportar resultados y generar un tratamiento temprano y efectivo para la tuberculosis.

Además de generar un diagnóstico más oportuno, el diagnóstico de tuberculosis necesita ser costo-efectivo para considerar su implementación en un sistema de salud. El ACD con pruebas de susceptibilidad a RF e IN, demostró ser más costo-efectivo que los métodos estándar de pruebas de susceptibilidad basados en cultivo LJ combinado con alta sensibilidad y especificidad para detectar la resistencia a estos dos antibióticos que son la base del tratamiento para tuberculosis (24).

Los medios de cultivo líquidos, el estándar en el cultivo y diagnóstico de tuberculosis: El medio de cultivo líquido es recomendado por la OMS como el estándar para el diagnóstico de tuberculosis y las pruebas de susceptibilidad a antibióticos (13). En 1997 aparecieron las primeras publicaciones evaluando el desempeño de un sistema comercial en medio líquido, el tubo indicador de crecimiento, denominado MGIT sigla de "mycobacterial growth indicator tube" (Becton Dickinson B-D Bactec MGIT). Este sistema de cultivo utiliza un indicador fluorescente cuando ocurre crecimiento de micobacterias combinado con un sistema automatizado de detección (25,26). En 2007 la OMS recomendó el uso del sistema MGIT como método de cultivo diagnóstico para tuberculosis por su detección rápida de crecimiento, buena sensibilidad y especificidad, facilidad para realizar pruebas de susceptibilidad a medicamentos y fácil implementación en países de ingresos medios y bajos (27).

En el 2001 se realizó la primera evaluación del sistema MGIT en la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas. En ese estudio se evaluó el sistema MGIT comparado con ACD y el medio de Ogawa-Kudoh como método de referencia. El sistema MGIT mostró resultados comparables con ACD y Ogawa-Kudoh desde el punto de vista de especificidad, pero con una mayor sensibilidad en muestras paucibacilares y comparable en oportunidad de resultados al ACD (28).

De acuerdo con estas experiencias y publicaciones, se configuró en el laboratorio diagnóstico de micobacterias de la CIB, una estrategia que permitía generar diagnósticos rápidos utilizando los métodos de microscopía y cultivo desarrollados y evaluados así: la muestra inicial del paciente si es de origen respiratorio se descontamina y luego se le realiza la microscopía utilizando la coloración de auramina-rodamina y se inocula en el medio líquido MGIT y si es una muestra de sitios normalmente estériles se inocula directamente en el medio líquido. Posteriormente, si los cultivos son positivos en el medio líquido se inoculan en ACD con RIF/INH, garantizando así un promedio de tiempo de 11 días para informar cultivos positivos y en dos semanas para susceptibilidad a RIF/INH. Los resultados obtenidos representaron un acercamiento significativo al diagnóstico oportuno de la enfermedad y la susceptibilidad a medicamentos claves en el tratamiento.

Las pruebas moleculares y el diagnóstico oportuno de la tuberculosis

En 1986 la publicación de Kary Mullis y colegas demostró que el ADN era posible amplificarlo in vitro con métodos enzimáticos, lo que ahora se conoce como la reacción de amplificación en cadena por polimerasa o PCR (29). Poco después comenzaron a aparecer publicaciones de la aplicación de este método en múltiples áreas de la biología incluyendo aplicaciones al diagnóstico de las enfermedades infecciosas. A principios de la década del 90, se publicaron los primeros estudios relacionadas con PCR y su aplicación en el diagnóstico de tuberculosis (30–32). En 1991 Del Portillo y colaboradores en Colombia reportaron un método de PCR que identificaba pocas cantidades de ADN de *M. tuberculosis* con iniciadores basados en la secuencia mtp40, con resultados en corto tiempo y utilizando varios tipos de muestras clínicas (33).

La primera experiencia de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB con técnicas de PCR para el diagnóstico de tuberculosis

se publicó en 1995. El método de PCR se realizó con iniciadores de la secuencia mtp40 de acuerdo con Del Portillo et al. El estudio utilizó muestras clínicas para determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR comparado con el cultivo convencional en LJ. La PCR demostró desempeño similar al diagnóstico convencional, pero con resultados más rápidos (34). Posteriormente el grupo participó en un estudio multicéntrico que incluyó 6 laboratorios en Latinoamérica para evaluar la reproducibilidad de la PCR para detectar e identificar *M. tuberculosis* en muestras normalizadas con una cantidad predeterminada del microorganismo. Los resultados mostraron amplias diferencias en sensibilidad y especificidad, concluyendo que los métodos de PCR “in house” necesitaban más estandarización para poder utilizarlos como un método de diagnóstico único para tuberculosis (35).

Las pruebas moleculares para el diagnóstico de tuberculosis a pesar de sus ventajas todavía necesitaron facilitar su implementación en el laboratorio diagnóstico al mejorar aspectos como la estandarización de reactivos y procesamiento de muestras, disminuir la contaminación cruzada y la facilidad de uso en diagnóstico de rutina.

En 2010 comenzaron a ser publicadas las primeras evaluaciones de una prueba molecular comercial que garantizaba la estandarización del procedimiento, al utilizar un cartucho cerrado en el cual ocurre toda la reacción de amplificación después de colocado en un equipo (Cepheid, Sunnyvale, CA). Este método denominado Gene Xpert® cambió el paradigma del diagnóstico de tuberculosis pues permite detectar ADN del complejo *M. tuberculosis* con una capacidad de detectar hasta 131 bacilos por mL y la resistencia a rifampicina identificando las mutaciones más comunes asociadas a esta, en un tiempo de dos horas (36,37). El uso de esta tecnología demostró la utilidad de usar las pruebas moleculares mejorando el desempeño y la rapidez en generar resultados comparada con los métodos tradicionales y resolviendo los problemas de los métodos “in house” anteriormente usados. En consecuencia, en 2011 la OMS publicó una política para el uso de esta tecnología para el

diagnóstico de tuberculosis, basada en la evaluación de 6673 pacientes incluidos prospectivamente y recomendando el uso de Xpert MTB/Rif como diagnóstico inicial para tuberculosis en pacientes con sospecha de tuberculosis multirresistente (MDR-TB resistente a rifampicina e isoniazida) y con coinfección

con VIH, y su uso como método diagnóstico después de una baciloscopia negativa en pacientes con sospecha de la enfermedad (38).

En 2013 el laboratorio diagnóstico de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB incorporó el sistema GeneXpert MTB/Rif en su estrategia para mejorar el proceso diagnóstico en rapidez para reportar resultados al incorporar la prueba molecular, adicionando el cultivo en medio líquido para aumentar la sensibilidad, el ACD para definir la sensibilidad a isoniazida además de la rifampicina y teniendo el cultivo positivo, poder realizar pruebas de susceptibilidad a medicamentos antituberculosos adicionales como los de segunda línea.

La experiencia de incluir el GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico se publicó en 2022 con el análisis de 1574 muestras clínicas y comparando su desempeño y su costo efectividad con los cultivos (39). Los resultados mostraron sensibilidad, especificidad y concordancia del Xpert similares al cultivo como comparador. Sin embargo, al calcular la razón de costo-efectividad incremental (RICE), esta tecnología demostró ser más efectiva y menos costosa que el cultivo (RICE Xpert \$1.017.94; RICE cultivo \$1.039.383). No obstante, adicionar el cultivo mejora la sensibilidad del proceso, permite detectar e identificar micobacterias no tuberculosas y realizar pruebas de susceptibilidad a medicamentos antituberculosos adicionales incluyendo la isoniazida (40). Actualmente esta versión de GeneXpert MTB/RIF se ha reemplazado por Xpert® MTB/RIF Ultra el cual mejora la sensibilidad de la versión anterior (113 unidades formadoras de colonias-UFC/mL) al detectar 15 UFC/mL, haciéndola más sensible para el diagnóstico de tuberculosis paucibacilar y comparable con la sensibilidad del cultivo (41,42).

El diagnóstico de la resistencia a medicamentos antituberculosos

Tuberculosis resistente a medicamentos permanece como una crisis de salud pública a nivel global, aproximadamente 450.000 individuos fueron afectados en el 2021, solamente 2 de cada 5 pacientes tuvieron acceso a tratamiento y 191 000 muertes ocurrieron en el mismo período por esta causa (3). El tratamiento para la tuberculosis MDR-TB y XDR-TB (resistente a fluoroquinolonas y a bedaquilina y o linezolid, además de resistente a Rif e INH (43)), plantea desafíos importantes para los pacientes y los sistemas de salud tales como: (i) el tiempo de tratamiento es más prolongado que en las formas susceptibles a medicamentos; (ii) los medicamentos son más costosos siendo más difícil asegurar la disponibilidad para un tratamiento completo; (iii) tienen mayores efectos secundarios y el tratamiento es menos efectivo, lo que incide directamente en la adherencia al tratamiento por los pacientes, con impacto en la morbilidad y mortalidad de la enfermedad y finalmente en los costos y recursos necesarios para el sostenimiento de los programas de salud (44).

Las pruebas de susceptibilidad a medicamentos son indispensables para detectar resistencias y para establecer un tratamiento adecuado y se recomiendan para todo paciente con un diagnóstico inicial de tuberculosis (45). En particular la OMS recomienda en sus estándares la utilización de pruebas rápidas para la detección de *M. tuberculosis* y de resistencia a medicamentos y así garantizar un resultado y tratamiento oportunos, la mayoría de ellas basadas en métodos moleculares (45).

El uso de estas pruebas por el laboratorio diagnóstico de la Unidad de Bacteriología y micobacterias de la CIB comenzó poco después de estar disponibles en el país. En 2015 se evaluó una prueba basada en la detección de mutaciones que confieren resistencia a RIF e INH (GenoType MTBDRplus 1.0® (Hain Lifescience, Nehren, Germany) comparada con la secuenciación de los genes de resistencia en los mismos aislamientos. Los resultados mostraron que esta prueba fue comparable con la secuenciación para detectar las mutaciones en el

gen *katG* asociadas a alta resistencia, así como las mutaciones en el gen *inhA* asociadas a niveles bajos de resistencia (46). La posterior identificación de mutaciones en genes relacionadas con resistencia a INH y etionamida usando secuenciación, permitió definir la frecuencia de resistencia cruzada entre estos dos antibióticos en aislamientos MDR-TB e identificar mutaciones no reportadas y asociadas a la resistencia (47). Poco después se evaluó una prueba de la misma compañía que detecta la resistencia a medicamentos de segunda línea Hain GenoType MTBDRsl. En esta evaluación se demostró que existían algunas mutaciones sinónimas y no sinónimas asociadas a falsa resistencia a quinolonas cuando se utilizaba esta prueba (48).

Varios proyectos permitieron entender aspectos moleculares y genéticos de la resistencia a medicamentos antituberculosos. Particularmente la resistencia a quinolonas y la forma como el antibiótico interactúa con su sitio blanco (49) y la secuenciación y posterior publicación de varios genomas de *M. tuberculosis* con resistencia extendida (TB-XDR) (50,51).

En 2018 se participó en un estudio con un grupo internacional en el análisis amplio de asociación de genomas (GWAS genome wide association studies) en aislamientos de *M. tuberculosis* MDR-TB y XDR-TB de 30 países. Los hallazgos confirmaron la asociación de mutaciones con niveles de resistencia ya descritas, pero también nuevas mutaciones asociadas a resistencia, además de la participación de otros mecanismos en la resistencia como inserciones, deleciones y bombas de expulsión (52). El GWAS como análisis bioinformático ha demostrado ser una herramienta muy útil para valorar los datos genómicos de mutaciones asociados a datos fenotípicos de resistencia a medicamentos, no solamente en *M. tuberculosis* pero también en otras bacterias como lo demuestra una revisión sistemática publicada recientemente (53).

La generación de datos de resistencia a medicamentos a partir de secuenciación de genomas, pero corroborada y comparada con datos de pruebas de susceptibilidad en cultivo como la concentración inhibitoria mínima, permite entender mejor cuál

es la relación entre los datos fenotípicos de susceptibilidad y el aporte de las diversas mutaciones con la resistencia a los diferentes medicamentos. Con los datos de secuenciación de genomas de *M. tuberculosis* obtenidos por el grupo de investigación, se participó en colaboraciones internacionales para determinar las limitaciones de los datos de resistencia generados a partir de análisis genotípicos y fenotípicos de acuerdo con los diferentes tipos de errores analíticos (Koser CU, Robledo J, Shublaze N, Schon T, Dolinger DL, Salfinger M, 2021). La colaboración con grupos internacionales como el “Antimycobacterial Susceptibility Testing Group” permitió publicar la actualización de los estándares para definir susceptibilidad o resistencia para medicamentos antituberculosos (55) y participar aportando datos en el catálogo de mutaciones complejas asociadas a resistencia a medicamentos en *M. tuberculosis* publicado por la OMS (56,57). Este catálogo por primera vez presenta un estándar global para la interpretación de la resistencia a medicamentos basada en pruebas moleculares y es una guía para el desarrollo de nuevas pruebas moleculares para detección de resistencia incluyendo las basadas en secuenciación genómica.

El futuro en el diagnóstico de tuberculosis: pruebas al lado del paciente (“point of care test”, POC)

La necesidad de nuevas pruebas diagnósticas para tuberculosis es todavía una necesidad y un reto, considerando que en 2022 el 30% de los pacientes no fueron diagnosticados (1). Las pruebas tipo POC son necesarias en la tamización inicial de los pacientes, deben ser más accesibles, tener un bajo costo y proporcionar resultados más rápidos permitiendo un diagnóstico y una decisión de tratamiento en el primer contacto con el paciente (5).

En la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB se han realizado estudios dirigidos al desarrollo de pruebas POC en colaboración con otros grupos de investigación. Dos de ellos basados en novedosos métodos de detección de antígenos. El primero

de ellos en colaboración con la Universidad EIA, se desarrolló un sensor piezo-eléctrico que utiliza cristales de cuarzo que cambian su oscilación emitiendo una señal al ocurrir la unión del anticuerpo fijado a un antígeno presente en muestras respiratorias; el prototipo está en desarrollo pendiente de posteriores evaluaciones (Jaramillo et al., 2014; Marín PA, et al, 2015).

El segundo estudio realizado en colaboración con un consorcio de grupos de investigación del país y de España, desarrolló y evaluó un prototipo de nanobiosensor basado en resonancia plasmónica sin necesidad de utilizar marcadores para la detección del antígeno HspX de *M. tuberculosis*. Se utilizaron muestras clínicas con niveles predefinidos de detección muy bajos a altos de pacientes con tuberculosis y no detectables en muestras de individuos sin la enfermedad. El antígeno fue detectado directamente en las muestras con recuentos muy bajos de bacilos y no fue detectado en muestras de pacientes sin tuberculosis (60).

El panorama de nuevas pruebas diagnósticas para tuberculosis es prometedor y muestra muchas pruebas en diversas fases de desarrollo para el tamizaje, el diagnóstico, monitoreo del tratamiento y la progresión de la enfermedad (61). Pruebas basadas en la detección del bacilo o sus componentes, una vez cumplan los requisitos de evaluación por la OMS, probablemente cumplan en el futuro las necesidades para el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad debe realizar transiciones a futuro que le permitan subsanar las falencias actuales, entre ellas reemplazar la microscopía por pruebas moleculares, desarrollar

pruebas tipo POC y de detección de ácidos nucleicos y acercar los servicios de salud a las comunidades e individuos con búsqueda activa de casos (5).

Los avances en la tecnología aplicada al diagnóstico de tuberculosis son notables en las últimas 3 décadas, el reto actual para los servicios de salud es hacer que esta tecnología esté disponible para todos los pacientes que la necesiten, de esta manera no deberían existir pacientes sin diagnóstico y se habrá dado un paso importante para que esta enfermedad deje de tener el costo social, de morbilidad y mortalidad que actualmente ostenta.

Agradecimientos

A Angela Restrepo PhD, que fue mi mentora en investigación cuando fui estudiante de Medicina y posteriormente mi referente cuando fui investigador en la CIB.

A Hugo Trujillo MD, que me albergó en su grupo de investigación de infecciosas en mis inicios en la CIB y me invito a participar en sus proyectos de investigación clínica e infectología pediátrica.

A todos los profesionales bacteriólogas, microbiólogos y médicos que pertenecieron y pertenecen a la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB, y que han participado activamente en los proyectos de investigación referenciados en esta revisión.

A los estudiantes de postgrado y pregrado que han hecho parte del grupo de investigación y que han aportado de una u otra manera a la actividad del grupo de investigación. ■

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2023. [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>
2. World health Organization. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. [Internet]. 2013. Disponible en: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB134/B134_12-en.pdf
3. World health Organization. World Health Tuberculosis Report 2022. Gene; 2022. [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>
4. Objetivos de desarrollo sostenible. Organización de las Naciones Unidas. [Internet]. 2015. Disponible

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

Doi: <https://doi.org/10.56684/ammd/2024.2>

- en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>
- Pai M, Dewan PK, Swaminathan S. Transforming tuberculosis diagnosis. *Nat Microbiol.* 2023;8(5):756–9.
 - What is DOTS ? A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS. World Health Organization. *Prev Control.* 1999;1–39.
 - Styblo K. Epidemiology of tuberculosis [Internet]. 1991 RNTA, editor. 1991. Disponible en: https://openlibrary.org/books/OL13930259M/Epidemiology_of_tuberculosis
 - Matteelli A, Rendon A, Tiberi S, Al-Abri S, Voniatis C, Carvalho ACC, et al. Tuberculosis elimination: Where are we now? *Eur Respir Rev* [Internet]. 2018;27(148):1–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0035-2018>
 - Koch R. Die € Aetiologie der Tuberkulose. 1882; 15: *Berliner Klin Wochenschrift.* 1882;15:221–230.
 - Migliori GB, Caminero Luna J, Kurhasani X, van den Boom M, Visca D, D'Ambrosio L, et al. History of prevention, diagnosis, treatment and rehabilitation of pulmonary sequelae of tuberculosis. *Press Medicale* [Internet]. 2022;51(3):104112. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104112>
 - Gill CM, Dolan L, Piggott LM, McLaughlin AM. New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe* [Internet]. 2022;18(1):1–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1183/20734735.0149-2021>
 - Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2006 [cited 2024 Mar 27];6(9):570–81. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16931408/>
 - WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection. World Health Organization Geneva; 2024. 3 ed. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030589>
 - Dorset M. Egg medium for cultivation of tubercle bacilli. *Science.* 1903;(17):374.
 - Lowestein E. Die methodik der reinkultur von tubercle bacillen aus dem blate. *Dtsch Med Wochenschr.* 1930;56:1010.
 - Dubos RJ, middlebrook G. Media for tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc.* 1947 Oct 1;56(4):334–45.
 - Mitchison DA, Allen BW, Carrol L, Dickinson JM, Aber VR. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. *J Med Microbiol.* 1972;5(2):165–75.
 - Kent, P. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. US Department of Health and Human Services, public health service, centers for disease control. Kubica G, editor. 1985.
 - Mejía GI, Castrillon L, Trujillo H, Robledo JA. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(2).
 - Mejía GI, Guzmán A, Agudelo CA, Trujillo H, Robledo J. Five year experience with thin layer agar medium for rapid diagnosis of tuberculosis. *Biomedica.* 2004;24 Supp 1.
 - Robledo JA, Mejía GI, Morcillo N, Chacón L, Camacho M, Luna J, Zurita J, Bodon A, Velasco M, Palomino JC, Martin APF. Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10(6):613–9.
 - Mejía GI, Guzmán A, Agudelo CA, Trujillo H, Robledo J. Cinco años de experiencia con el agar de capa delgada para el diagnóstico rápido de tuberculosis. *Biomédica.* 2004;24(0):52.
 - Robledo J, Mejía GI, Paniagua L, Martin A, Guzmán A. Rapid detection of rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis by the direct thin-layer agar method. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;
 - Hernández-Sarmiento JM, Martínez-Negrete MA, Castrillón-Velilla DM, Mejía-Espinosa SA, Mejía-Mesa GI, Zapata-Fernández EM, et al. Thin layer agar represents a cost-effective alternative for the rapid diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis. *Rev Salud Publica.* 2014;16(1).
 - Tortoli E, Mandler F, Tronci M, Penati V, Sbaraglia G, Costa D, et al. Multicenter evaluation of

- mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with the BACTEC radiometric method, BBL biphasic growth medium and Lowenstein-Jensen medium. *Clin Microbiol Infect.* 1997;3(4):468–73.
26. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1997 [cited 2024 Apr 12];35(2):364. Disponible en: [/pmc/articles/PMC229581/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1441111/)
 27. World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low-and middle-income countries. Summary report of the expert group meeting on the use of liquid culture media. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Geneva; 2007.
 28. Vélez CI, Mejía GI, Posada P, Guzmán A, López LM, Zuluaga LM, et al. Evaluación de medios de cultivo alternativos para El diagnóstico de la Tuberculosis Pulmonar. *Infect* 2001; 5(4) 235-240. 2001;5(4):235–40.
 29. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G EH. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. PMID: . *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51:263–73.
 30. Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, Aditi B, Seth P S. Identification of Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction. *Lancet.* 1990;335:423.
 31. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH CJ. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis. . PMID: 2109022. *J Infect Dis.* 1990;161(5):977–81.
 32. Hermans PW, Schuitema AR, Van Soolingen D, Verstynen CP, Bik EM, Thole JE, Kolk AH van EJ. Specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex strains by polymerase chain reaction. . PMID: 2116445; PMCID: PMC267906. *J Clin Microbiol.* 1990;28(6):1204–13.
 33. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment of Mycobacterium tuberculosis and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1991 [cited 2024 Apr 15];29(10):2163–8. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.29.10.2163-2168.1991>
 34. Sierra MP, Robledo J, Murillo LA, Trujillo H, Mejía GI CL. .. 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 Antioquia* año XX192-206, 1995. 1995;192–206.
 35. Suffys P, Palomino JC, Cardoso Leao S, Espitia C, Cataldi A, Alito A, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(2).
 36. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):229–37.
 37. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F E Al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.* 2010;363:1005–1015.
 38. WHO. Policy Statement: Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System [Internet]. Policy Statement: Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System. World Health Organization; 2011 [Internet]. (Citado 2019 May 27). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26158191>
 39. Cadavid C, Realpe T, Mejía GI, Zapata E, Hernández M, Robledo J. Contribución del uso de XPERT MTB/RIF y su costo-efectividad en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y la resistencia a rifampicina: una comparación con métodos diagnósticos no moleculares. *Infectio.* 2021. p. 121–7.
 40. Rouzaud F, Robledo J. Cutting costs on mono-resistant tuberculosis diagnosis could eventually end up being more expensive. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(4).
 41. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis

- and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018 [cited 2019 May 17];18(1):76–84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29198911>
42. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of Mycobacterium tuberculosis and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. *MBio* [Internet]. 2017;8(4):e00812-17. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28851844> %0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5574709
 43. World Health Organization. WHO. Meeting Report of the WHO Expert Consultation on Drug-Resistant Tuberculosis Treatment Outcome Definitions. [Internet]. Geneva; 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240022195> (2021)
 44. The Economist Intelligence Unit. It's Time to End Drug-Resistant Tuberculosis The case for action [Internet]. 2019. Disponible en: [//efaidnbnmnnibpcajpcglcfindmkaj/https://www.eiu.com/graphics/marketing/pdf/its-time-to-end-drug-resistant-tuberculosis-full-report.pdf](https://efaidnbnmnnibpcajpcglcfindmkaj/https://www.eiu.com/graphics/marketing/pdf/its-time-to-end-drug-resistant-tuberculosis-full-report.pdf)
 45. World Health Organization. WHO standard: universal access to rapid tuberculosis diagnostics. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Geneva; 2023.
 46. Rueda J, Realpe T, Mejía G, Zapata E, Robledo J. GenoType® MTBDRplus 1.0 para detección de resistencia cruzada entre isoniazida y etionamida en aislamientos de Mycobacterium tuberculosis multifármaco-resistente [Internet]. Vol. 35, *Biomédica*. 2015 (citado 2015 Jul 6). Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2813>
 47. Rueda J, Realpe T, Mejía G, Zapata E, Roza JC, Ferro BE, et al. Genotypic analysis of genes associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12).
 48. Ajileye A, Alvarez N, Merker M, Walker TM, Akter S, Brown K, et al. Some synonymous and nonsynonymous gyrA mutations in Mycobacterium tuberculosis lead to systematic false-positive fluoroquinolone resistance results with the Hain GenoType MTBDRsl assays. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;
 49. Alvarez N, Zapata E, Mejía G, Realpe T, Araque P, Peláez C, et al. The structural modeling of the interaction between levofloxacin and the mycobacterium tuberculosis gyrase catalytic site sheds light on the mechanisms of fluoroquinolones resistant tuberculosis in colombian clinical isolates. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 50. Alvarez N, Haft D, Hurtado UA, Robledo J, Rouzaud F. Whole-genome sequencing of two Latin American-Mediterranean extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Medellín, Colombia. *Genome Announc*. 2016;4(2).
 51. Alvarez N, Haft D, Hurtado UA, Robledo J, Rouzaud F. Whole-genome sequencing of a Haarlem extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolate from Medellín, Colombia. *Genome Announc*. 2016;4(3).
 52. Coll F, Phelan J, Hill-Cawthorne GA, Nair MB, Mallard K, Ali S, et al. Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Nat Genet*. 2018;50(2):307–16.
 53. Mosquera-Rendón J, Moreno-Herrera CX, Robledo J, Hurtado-Páez U. Genome-Wide Association Studies (GWAS) Approaches for the Detection of Genetic Variants Associated with Antibiotic Resistance: A Systematic Review. *Microorganisms* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Apr 24];11(12). Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38138010/>
 54. Koser CU, Robledo J, Shublaze N, Schon T, Dolinger DL SM. Guidance Is needed to mitigate the consequences of analytic errors during antimicrobial susceptibility testing for TB. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 2021;25(10):791–4. Disponible en: <http://guidanceis.tumblr.com/post/53568818562>
 55. Georghiou SB, Rodwell TC, Korobitsyn A, Abbadi SH, Ajbani K, Alffenaar JW, et al. Updating the approaches to define susceptibility and resistance to anti-tuberculosis agents: implications for diagnosis and treatment. *Eur Respir J*. 2022;59(4).

56. World Health Organization. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. Geneva; 2021.
57. Walker TM, Miotto P, Köser CU, Fowler PW, Knaggs J, Iqbal Z, Hunt M, Chindelevitch L, Farhat M, Cirillo DM, Comas I, Posey J, Omar SV, Peto TE, Suresh A, Uplekar S, Laurent S, Colman RE, Nathanson CM, Zignol M, Walker AS; CRyPTIC Consortium; Seq&Treat Con RT. The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: A genotypic analysis. . *Lancet Microbe*. 2022;3(4):e265–73.
58. Marín PA, Botero LE, Robledo JA, Murillo AM, Torres RA, . Montagut YJ, Pabón E JM. Purificación del antígeno 38 kda de mycobacterium tuberculosis y su potencial uso en diagnóstico mediante inmunosensores piezoeléctricos. *Acta Biológica Colomb*. 2015;20(1):129–39.
59. Jaramillo M, Marín PA, Torres RA, Pabón E, Montagut YJ, Robledo J, et al. Advances in the development of a piezoelectric immunosensor for the detection of a tuberculosis biomarker. In: 2014 IEEE 9th IberoAmerican Congress on Sensors, IBERSENSOR 2014 - Conference Proceedings. 2014.
60. Peláez EC, Estevez MC, Mongui A, Menéndez MC, Toro C, Herrera-Sandoval OL, Robledo J, García MJ, Portillo PD LL. Detection and Quantification of HspX Antigen in Sputum Samples Using Plasmonic Biosensing: Toward a Real Point-of-Care (POC) for Tuberculosis Diagnosis. *ACS Infect Dis*. 2020;6(5):1110–20.
61. Treatment Action Group. Pipeline Report » 2023. 2023.[Internet]. Disponible en: <https://www.treatmentactiongroup.org/resources/pipeline-report/2023-pipeline-report/>