

Evaluación de una prueba de biología molecular para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea en un hospital de alta complejidad

Adrián Peñata-Bedoya^{a,*}, Anlly Holguín-Velasquez^b, Santiago Atehortúa-Muñoz^c, Paula Vergara-Aguilar^d, Tatiana Castaño-Sepúlveda^a, Julián Bustamante-Mira^a, Sigifredo Ospina-Ospina^{a,c}

Resumen

Objetivo: evaluar la utilidad de Anyplex™II_MTB/MDR/XDR para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea, además del impacto en la conducta terapéutica en pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar atendidos en una institución de alta complejidad de Medellín, 2014–2015.

Material y método: estudio descriptivo de corte transversal retrospectivo, de pacientes en cuyo proceso de atención se les realizó: baciloscopia, cultivo Ogawa-Kudoh, prueba molecular Anyplex™II_MTB/MDR/XDR y registro adecuado de historia clínica. Se realizaron medidas estadísticas descriptivas univariadas y de validez diagnóstica.

Resultados: se incluyeron 156 muestras de 154 pacientes, de los cuales el 65,6% fueron hombres. El diagnóstico de ingreso más frecuente fue el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (46,1%). La sensibilidad y especificidad global fue del 96,36% (IC 95%: 90,51 – 100) y 90,51% (IC 95%: 83,62 – 96,38) respectivamente. Se detectó algún tipo de resistencia en el 12,6%. El 57% de los resultados fueron tomados en cuenta por el médico tratante para definir conductas terapéuticas.

Discusión: se obtuvo una sensibilidad mayor respecto a otros estudios previos. Entre las limitaciones a destacar están: el diseño retrospectivo y la no disponibilidad de medios de cultivo líquido (MIGIT).

Conclusiones: Anyplex™II_MTB/MDR/XDR fue útil en la identificación del complejo *M. tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos en muestra directa. El resultado de la prueba influyó en la toma de conductas terapéuticas en más de la mitad de los pacientes con resultados positivos. La implementación de nuevas ayudas diagnósticas, deben estar en concordancia con las necesidades en la atención del paciente.

Palabras clave: tuberculosis, reacción en cadena de la polimerasa, tuberculosis pulmonar; TB-MDR

Assessment of a molecular biology test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and first and second line anti tuberculosis drug susceptibility in a tertiary referral hospital

Abstract

Objective: To evaluate the utility of Anyplex™II_MTB/MDR/XDR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and drug susceptibility testing to first and second line, and the impact on the therapeutic approach, in patients with suspected pulmonary tuberculosis at a reference hospital. Medellín, 2014-2015.

Material and Methods: this is a retrospective, descriptive, observational study in patients that during its hospitalization were studied by: ZN-smear, Ogawa-Kudoh culture, Anyplex™II_MTB/MDR/XDR assay and had an adequate record of medical history. Univariate descriptive statistics was performed and accuracy of the test was analyzed.

Results: 156 samples of 154 patients were included, 65.6% were men. The most frequent diagnosis of admission was the Human Immunodeficiency Virus (46.1%). Sensitivity and specificity was 96.36% (95% CI 90.51 to 100) and 90.51% (95% CI 83.62 to 96.38) respectively. Some type of resistance was found in 12.6% of cases. 57% of the results were taken into account to make treatment decisions.

Discussion: The sensitivity was higher than regarding in previous studies were obtained, comparing with cultures available at institution. Among limitations, this study was retrospective and the unavailability liquid culture medium (MIGIT).

Conclusions: Anyplex™II_MTB/MDR/XDR was useful in the identification of mycobacteria and drug susceptibility in direct sample. The result influenced therapeutic decisions in more than half of patients with positive result. The implementation of new diagnostic aids must be in accordance with the needs in patient care.

Key word: tuberculosis, polymerase chain reaction, pulmonary tuberculosis, MDR-TB

a Biología Molecular e Inmunogenética de trasplantes. Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

b Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

c Servicio de Microbiología. Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

d Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

* Autor para correspondencia.

Unidad de Biología Molecular e Inmunogenética de Trasplantes, Hospital Universitario de San Vicente Fundación.

Correo electrónico: carlosadrianpb@gmail.com

Calle 64 No 51D -154 Medellín, Colombia - Teléfono: (574) 444 1333 ext. 2567-3106

Recibido: 05/10/2016; Aceptado: 29/11/2016

Cómo citar este artículo: A. Peñata-Bedoya, et al. Evaluación de una prueba de biología molecular para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea en un hospital de alta complejidad. Infectio 2017; 21(4): 202-206

Introducción

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa con una alta morbilidad y mortalidad, y según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial está infectada lo que representa un problema de salud pública. Para el 2014, se estimó que 9,6 millones de personas en el mundo adquirieron Tb¹, mientras en Colombia, para el 2013 se notificaron 10.849 casos².

La tuberculosis multidrogorresistente (MDR-TB), definida como la resistencia a medicamentos de primera línea (rifampicina-isoniazida)³, y la tuberculosis ampliamente resistente (XDR-TB), entendida como MDR-TB asociada a resistencia a medicamentos de segunda línea (cualquier fluoroquinolona y al menos un medicamento inyectable de los siguientes: amikacina, kanamicina, capreomicina), se han convertido en obstáculos para el control de la infección. En el 2014, la OMS estimó 480.000 casos de MDR-TB¹. En Colombia, en el mismo periodo, se reportaron 103 casos MDR-TB y dos XDR-TB⁴. Por tal motivo, la OMS impulsa el acceso universal al diagnóstico y tratamiento⁵.

El proceso diagnóstico de la Tb, requiere de una evaluación clínica y ayudas diagnósticas complementarias⁶, además debería incluir pruebas de sensibilidad a medicamentos. Entre las técnicas de valoración a medicamentos se encuentra las proporciones múltiples, metodología catalogada como método de referencia, con un tiempo de respuesta aproximado de 28 días⁷. Otras más rápidas como BACTEC™460TB⁸ y BACTEC™MGIT⁹, evalúan el crecimiento bacteriano en presencia de antibiótico, con resultados entre 3 y 10 días. También están disponibles las técnicas de Biología Molecular (BM) basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con resultados en un día y con el aval de la OMS¹⁰, entre éstas, Xpert® MTB/RIF, que detecta de forma simultánea *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y sensibilidad a rifampicina¹¹; Genotype MDRplus (Hain-Lifescience-Nehren-Germany)¹² que evalúa sensibilidad a medicamentos de primera línea y, requiere otro kit para detección a segunda.

Con el fin de optimizar el diagnóstico de la Tb y conocer los patrones de sensibilidad, se deben evaluar métodos emergentes como Anyplex™II_MTB/MDR/XDR, el cual consiste en una metodología por BM en tiempo real y PCR múltiple, para la identificación del complejo MTB y detección de las mutaciones más frecuentes en los genes que confieren resistencia a medicamentos de primera línea (rifampicina e isoniazida) como también a fluoroquinolonas y drogas inyectables: amikacina, kanamicina, y capreomicina, con resultados en un día¹³. Esta técnica identifica 18 mutaciones que causan resistencia a rifampicina en el gen *rpoB*, 7 mutaciones que causan resistencia a isoniazida en los genes *katG* e *inhA*, 7 mutaciones que causan resistencia a fluoroquinolonas en el gen *gyrA* y 6 mutaciones que causan resistencia a drogas inyectables en el gen *rrs* y en la región promotora *eis*.

De manera complementaria, el desempeño de una prueba, debería contar con aproximaciones como: utilidad, pertinencia y conductas terapéuticas a partir de resultados de laboratorio. Así, una prueba diagnóstica debe ser considerada como parte en la toma de decisiones clínicas, ya que hay una relación directa de éstas con: la eficacia, el mejoramiento del proceso diagnóstico, la estrategia terapéutica y asistencial¹⁴.

Este estudio evalúa la utilidad de Anyplex™II_MTB/MDR/XDR para la detección de MTB y sensibilidad simultánea a medicamentos de primera y segunda línea, a partir de muestra directa, además de una aproximación del impacto en la toma de decisiones terapéuticas en pacientes atendidos en un hospital de alta complejidad.

Material y método

Estudio descriptivo retrospectivo de corte trasversal (noviembre 2014 a junio 2015), con muestreo a conveniencia de pacientes con sospecha de Tb pulmonar, atendidos en el Hospital Universitario de San Vicente Fundación (HUSVF). Las muestras pulmonares (esputo y lavado broncoalveolar) debían tener disponible: baciloscopia, cultivo, prueba molecular y pruebas fenotípicas para fármacos anti tuberculosos cuando aplicó, además del correcto diligenciamiento de las historias clínicas electrónicas.

Pruebas convencionales y fenotípicas a medicamentos

La baciloscopia fue realizada por el método de Ziehl-Neelsen tradicional, el cultivo en Ogawa-Kudoh con Hidróxido de Sodio al 4%¹⁵, siguiendo los protocolos institucionales. A los cultivos positivos, se les realizó la prueba de proporciones múltiples para medicamentos de primera línea⁷ en el Laboratorio Departamental de Salud Pública, y para fármacos a segunda línea, con tecnología BACTEC-MGIT-960⁹ en el Instituto Nacional de Salud.

Anyplex™II_MTB/MDR/XDR

Los pasos de pretratamiento de las muestras, extracción de material genético y preparación de mezcla maestra para PCR múltiple, se realizaron de forma manual acorde a las instrucciones del fabricante. Los pasos de amplificación y generación de curvas melting, fueron realizados en el instrumento CFX-96™ (Bio-Rad), tres controles fueron incluidos en cada corrido: dos positivos (wild type resistant) y uno negativo. Los análisis e interpretación de datos se realizaron en el software Seegene Viewer 2.0

Datos clínicos

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes, para extraer variables sociodemográficas, clínicas y microbiológicas. Se consideró que el resultado de Anyplex™II_MTB/MDR/XDR tuvo impacto, si fue registrado como base para tomar una conducta terapéutica en el paciente hasta dos días poste-

riores a su generación, en las siguientes categorías: Inicio de tratamiento, no implementación de tratamiento, mantener tratamiento inicial y cambio de tratamiento.

Análisis de información

La tabulación de los datos se realizó en Excel 2010®, y en SPSS-21.0® se calcularon descriptivos (tablas-gráficos), incluyendo el cálculo de la desviación estándar (DS). Epidat 4.1 de la Organización Panamericana de la Salud, fue utilizado para estadísticos de validez: sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice kappa; el método de referencia fue Ogawa-Kudoh.

El estudio fue aprobado por el comité de Investigación y de Ética del HUSVF. Según resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, este estudio se considera sin riesgo, por ser de fuente secundaria.

Resultados

156 muestras consecutivas de 154 pacientes, fueron incluidas (tabla 1). Los porcentajes de positividad fueron: Cultivo Ogawa-Kudoh, 35,8% (n=56), coloración Ziehl-Neelsen, 31,4% (n=49), Anyplex™II_MTB/MDR/XDR, 40,3% (n=63); el 33,9% fueron positivas tanto por cultivo como por prueba molecular (53). Un aislamiento correspondió a una micobacteria atípica, no incluido para análisis posteriores.

El índice Kappa entre Anyplex™II_MTB/MDR/XDR y Ogawa-Kudoh, fue de 0,84 (IC 95%: 0,75–0,93 y $p < 0,01$). Para los aislamientos positivos por cultivo y prueba molecular (n=53), las pruebas fenotípicas presentaron una concordancia del 100% (Tabla 3).

En el 57% (n=89) de los pacientes, el resultado de la prueba molecular fue registrado en la historia clínica como pauta para decisiones terapéuticas, de la siguiente manera: 51,6% (n=46) no implementación de tratamiento, 26,9% (n=24) mantener manejo terapéutico instaurado inicialmente, 19,1% (n=17) útil para iniciar de tratamiento, y 2,2% (n=2) para cambio de manejo antituberculoso, por reporte de alguna resistencia.

Tabla 1. Características sociodemográficas y clínicas en la población de estudio.

Características generales	Total n= 154	
	n	%
Sexo		
Hombres	101	65,6
Edad		
X (DE)	43,5	15,8
Me (Riq)	43	26
Ocupación		
Desempleado	38	24,6
Ventas y oficios varios	24	15,5
Diagnóstico de ingreso		
VIH	55	35,7

El tiempo para obtener el resultado: Anyplex™II_MTB/ MDR/XDR fue de 3 días (DS±2,15), pues por programación del hospital la prueba se realiza tres veces por semana; para los cultivos positivos, de 27 días (DS±5,2), con el reporte de medicamentos a primera línea hasta 50 días (DS±10), y un acumulado total de 70 días (DS± 7,7) para fármacos de segunda línea.

Discusión

La prueba molecular Anyplex™II_MTB/MDR/XDR de reciente disponibilidad en el país y con escasa literatura sobre su rendimiento en Latinoamérica, ofrece ventajas sobre otras metodologías de BM en tuberculosis, por la posibilidad que ofrece de identificar en tiempo real genes de resistencia a varios medicamentos antituberculosos en un solo montaje. El presente estudio responde a la necesidad de documentar el desempeño de ésta, comparada con métodos tradicionales (coloración Ziehl-Neelsen y cultivo Ogawa-Kudoh), todavía de uso rutinario en varias instituciones en el país, que refleja una limitación en el diagnóstico microbiológico, ya que en Colombia para el 2013, solo el 75% de los casos de Tb notificados, fueron confirmados por el laboratorio², evidenciando la necesidad de contar con técnicas que sean de mejor desempeño. Otro aporte del presente estudio, es la documentar la aproximación de la conducta terapéutica posterior al resultado de una prueba molecular, como factor importante en la implementación y seguimiento de nuevas ayudas diagnósticas.

La prueba Anyplex™II_MTB/ MDR/XDR, fue positiva en el 40,3%, que comparada con otros estudios que han reportado rendimientos del 13,6%¹⁶ y de 20,9%¹⁷, presentó un desempeño superior en nuestra población. Mientras que las pruebas convencionales como la coloración de Ziehl-Neelsen y el cultivo Ogawa-Kudoh, presentaron un rendimiento diagnóstico del 31,4% (n=49) y 35% (n=56) respectivamente. Una posible explicación al mejor desempeño de la prueba molecular, puede estar en relación con el tipo de población que consulta en la institución, que por el nivel de complejidad atiende un número importante de pacientes con coinfección con VIH (35,7% de los pacientes ingresados al estudio), trasplantados y con otro tipo de comorbilidades, que son factores de riesgo para progresión de Tb latente a Tb activa¹⁸, o casos de difícil manejo como son pacientes con problemas de adherencia al tratamiento antituberculoso, sospecha de fracaso o recaídas que requieren valoración especializada y pruebas rápidas de sensibilidad a fármacos, por lo que el 26,5% (n=13) de las baciloscopias positivas, correspondieron a pacientes con Tb previa.

La sensibilidad general fue del 96,3% (IC 95%: 90,51– 100), en contraste a estudios previos que reportaron 82,9% (IC 95%: 72,5–90,6)¹⁶, 87,5% (IC95%: 80– 94,9)¹⁹, y 86% (IC 95%: 68–96)¹⁷ (Figura 1); mientras que con baciloscopia negativa, se han reportado sensibilidades del 69,2% y 81,3%^{17,19}, similares al presente trabajo del 77%, útil para la toma de decisiones terapéuticas mientras está disponible el resultado por cultivo (tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento de Anyplex™II MTB/ MDR/XDR según Baciloscopia y tipo de muestra.

	Cultivo positivo		Cultivo negativo		Total	S (IC 95%) / E (IC 95%)	VPP (IC 95%) / VPN (IC 95%)
	Anyplex +	Anyplex -	Anyplex +	Anyplex -			
General	53	2	10	90	155	96,36 (90,51 – 100) / 90,51 (83,62 – 96,38)	84,13 (75,13– 94,87) / 97,98 (94,70 – 100)
Baciloscopia							
Positiva	45	0	4	0	49	*	*
Negativa	8	2	6	90	106	80,00 (50,21 – 100) / 93,75 (88,39 – 99,11)	57,14 (27,6 – 86,64) / 97,83 (94,30 – 100)
Muestras							
Espudo	21	0	4	19	44	100 (97,6 – 100) / 82,61 (64,94 – 100)	84 (67,63 – 100) / 100 (97,37 – 100)
LBA	32	2	6	71	111	94,12 (84,74 – 100) / 92,21 (85,57 – 98,84)	84,21 (71,30 – 97,12) / 97,26 (92,83 – 100)

S= sensibilidad; E = especificidad

VPP = valor predictivo positivo; VPN = valor predictivo negativo

* = S, E, VPP y VPN no calculable

Respecto a los falsos negativos (dos casos), se ha descrito como causas, la presencia de inhibidores y errores técnicos (20), así como problemas en la calidad de la muestra, en especial el LBA, que por dilución, puede interferir en el límite de detección de la prueba.

Es importante tener en cuenta que se requiere una infraestructura y prácticas de laboratorio adecuadas de BM, que garanticen condiciones pre-analíticas óptimas, con el fin de evitar contaminaciones y falsos positivos.

Los nueve casos con cultivo negativo y Anyplex™II_MTB/MDR/XDR positivo, se deben interpretar en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos del paciente, pues al tomar el cultivo como prueba de referencia, se clasificarían estos resultados como falsos positivos de la prueba molecular, que se pueden explicar en parte por falta de viabilidad bacteriana, inadecuado manejo de la muestra o restos de material genético de la micobacteria en los pacientes con antecedentes de Tb antigua. El centro de control de enfermedades (CDC) recomienda ante sospecha clínica media-alta de Tb, si la baciloscopia es negativa y prueba molecular positiva, considerar diagnóstico presuntivo²¹.

Frente a la monoresistencia, a nivel nacional, se ha reportado 3,42% a isoniazida y 0,41% a rifampicina²², y con leve aumento en los casos tratados previamente, en el presente estudio se presentaron dos casos. No se presentaron casos de XDR-TB, pero se detectó dos muestras del mismo paciente con MDR-TB más resistencia a inyectables; el factor de riesgo principal para desarrollar resistencia, es la exposición inadecuada a medicamentos antituberculosos²³, elemento presente en este caso.

En el 43% (67 casos) de los pacientes, el resultado de Anyplex™II_MTB/MDR/XDR no fue registrado en la historia del paciente para definir alguna conducta terapéutica. Ésta situación debe llevar a una reflexión frente al principal uso de las ayudas diagnósticas, que es reducir el nivel de incertidumbre en la toma de conductas terapéuticas, ya que

Tabla 3. Caracterización a medicamentos antituberculosos por detección de genes de resistencia Anyplex™II MTB/ MDR/XDR. HUSVF, 2015

Perfil sensibilidad	n = 63	%
Susceptibilidad total*	55	87,3
Algún tipo de resistencia	8	12,6
Monoresistencia a H	1	1,58
Monoresistencia a Rif	1	1,58
TB-MDR (H + Rif)	4	6,34
TB-MDR más un inyectable	2	3,17
TB-XDR	0	0

* 10 aislamientos presentaron cultivo negativo

H: Isoniacida; Rif: Rifampicina

TB MDR: tuberculosis multirresistente

TB XDR: tuberculosis extremadamente resistente

Inyectables: Amikacina, Kanamicina y Capreomicina

únicamente deberían solicitarse cuando el resultado vaya a influir en el manejo del paciente. La utilización indiscriminada de pruebas diagnósticas aumentan costos en el sistema, conduciendo a un detrimento en la calidad de la oferta futura²⁴.

Como limitaciones podemos mencionar tres aspectos, primero, aunque la concordancia a los fármacos antituberculosos fue del 100% en los cultivos positivos, evaluar el real desempeño de sensibilidad a medicamentos, requeriría un número mayor de aislamientos con algún tipo de resistencia; segundo, el método de referencia, no fue el óptimo, debido a que para el tiempo del presente estudio no se contaba con medios con medios líquidos de cultivo como BACTEC™MGIT, ni con la tinción de auramina-rodamina para las baciloscopias, ya que estas metodologías tienen mayor sensibilidad; y por último, el diseño retrospectivo, el cual implica posibles sesgos de calidad en la información.

Por otro lado, con la presente prueba molecular, se hace necesario la evaluación en muestras no respiratorias, debido a que informes previos de otros países²⁵ y en Colombia²⁶, la forma ex-

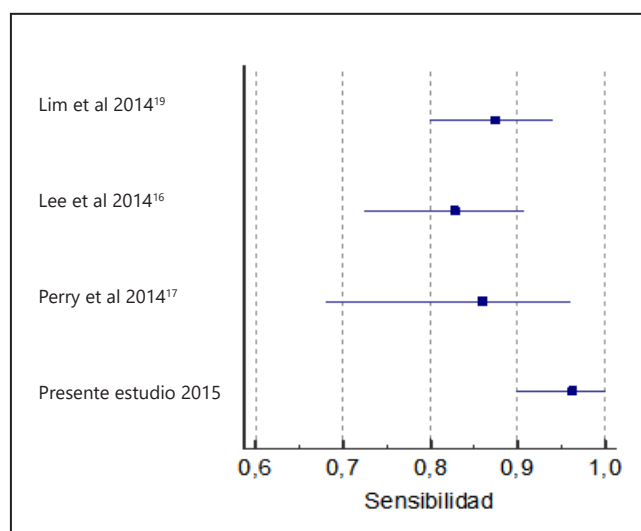


Figura 1. Gráfica Forest plot de la sensibilidad estimada para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* comparado con otros estudios.

trapulmonar muestra cifras importantes; también se debe realizar otras aproximaciones como por ejemplo de costo-beneficio y costo-efectividad, los cuales complementen el desempeño integral de la técnica evaluada en el presente estudio.

En conclusión, las pruebas moleculares no reemplazan las convencionales, sin embargo, se potencian cuando se combinan con datos clínicos y epidemiológicos. Anyplex™II_TB/MDR/XDR, ofrece la posibilidad de un tamizaje rápido y confiable de Tb y su perfil de sensibilidad a fármacos comparable con las pruebas fenotípicas de primera y segunda línea, a partir de muestra directa y con un mejor desempeño en aquellas con baciloscopia positiva.

La implementación de nuevas ayudas diagnósticas, deben estar en concordancia con las necesidades en la atención del paciente, para que tengan un adecuado impacto en las acciones terapéuticas, con el fin de tener un abordaje integral en el proceso asistencial.

Agradecimientos

A la unidad de Investigaciones del HUSVF por el soporte logístico y administrativo.

Fuente de financiación

Este estudio fue financiado por el Hospital Universitario de San Vicente Fundación

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que puedan estar influyendo en los resultados o conclusiones expresadas en el presente estudio

Bibliografía

1. World Health Organization. Twentieth global report on tuberculosis. Report number WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva: World Health Organization; 2015. [consultado 1 Jun 2016]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s22199en/s22199en.pdf>
2. Instituto Nacional de Salud. Informe final tuberculosis, Colombia, 2014 [consultado 12 Jul 2015]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202014.pdf>
3. Garzón MC, Angée DY, Llerena C, Orjuela DL, Victoria JE. Vigilancia de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. *Biomédica*. 2008;28(3):319-26. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.71>
4. Llerena C, Medina R. Descripción de mutaciones que confieren resistencia a rifampicina e isoniazida de *Mycobacterium tuberculosis* detectadas mediante GenoType® MTBDRplus V.2 en Colombia. *Biomédica* 2017; 37(1):28-33.
5. World Health Organization. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015: Geneva: World Health Organization; 2011. [Consultado 15 jul 2016] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44557/1/9789241501330_eng.pdf
6. Raviglione MC, O'Brien R. *Mycobacterial diseases*. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 1340-59.
7. Canetti G, Rist N, Grosset J. [Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation]. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)*. 1963 Mar;27:217-72.
8. Mishra B, Rockey SM, Gupta S, Srinivasa H, Muralidharan S. Multi-drug-resistant tuberculosis: the experience of an urban tertiary care hospital in South India using automated BACTEC 460 TB. *Trop Doct*. 2012 Jan;42(1):35-7. <http://dx.doi.org/10.1258/td.2011.110247>
9. Said HM, Kock MM, Ismail NA, Baba K, Omar SV, Osman AG, et al. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. *BMC Infect Dis*. 2012 Dec 22;12(1):369. <http://dx.doi.org/doi:10.1186/1471-2334-12-369>
10. World Health Organization. Report of the Tenth Meeting WHO Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAGTB), 27-29 September 2010. Geneva, World Health Organization; 2010.
11. Blakemore R, Nabeta P, Davidow AL, Vadvai V, Tahirli R, Munsamy V, et al. A multisite assessment of the quantitative capabilities of the Xpert MTB/RIF assay. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Nov 1;184(9):1076-84. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201103-0536OC>
12. Barnard M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Bosman M, Coetzee G, Warren RM. The diagnostic performance of the GenoType MTBDRplus version 2 line probe assay is equivalent to that of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3712-6. <http://dx.doi.org/doi:10.1128/JCM.01958-12>
13. Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Vaquero M, Casal M. New Anyplex™ II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in *M. tuberculosis* cultures. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 2015 Dec;19(12):1542-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01958-12>
14. Irwig L, Tosteson AN, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC, et al. Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests. *Ann Intern Med*. 1994 Apr 15;120(8):667-76. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-120-8-199404150-00008>
15. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2 cultivo. OPS; 2008.
16. Lee JH, Kim BH, Lee M-K. Performance Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM and MDR-TB Detection Kit for Detection of *Mycobacteria* and for Anti-Tuberculosis Drug Susceptibility Test. *Ann Clin Microbiol*. 2014;17(4):115. <https://dx.doi.org/10.5145/ACM.2014.17.4.115>
17. Perry MD, White PL, Ruddy M. Potential for use of the Seegene Anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a regional reference laboratory. *J Clin Microbiol*. 2014 May;52(5):1708-10. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.03585-13>
18. Rojas CM, Villegas SL, Piñeros HM, Chamorro EM, Durán CE, Hernández EL, et al. [Clinical, epidemiological and microbiological characteristics of a

- cohort of pulmonary tuberculosis patients in Cali, Colombia]. *Bioméd Rev Inst Nac Salud*. 2010 Dec;30(4):482–91.
19. Lim J, Kim J, Kim JW, Ihm C, Sohn Y-H, Cho H-J, et al. Multicenter evaluation of Seegene Anyplex TB PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Microbiol Biotechnol*. 2014 Jul;24(7):1004–7. <https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1403.03071>
 20. Agudelo C, Builes L, Hernandez M, Robledo J. Nuevos Metodos para el diagnostico del tuberculosis. *Iatreia*. 2008;(21):321–332.
 21. U.S.Centers for Disease Control and Prevention. Testing for TB infection. [consultado Aug 13]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/tb/topic/testing/default.htm>
 22. Instituto Nacional de Salud. Informe final de tuberculosis farmacorresistente en Colombia 2013 [consultado 16 May 2016]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/46637/1/2759186.2014.pdf>
 23. Instituto Nacional de Salud. Lineamientos para el manejo programatico de pacientes con Tuberculosis Farmacorresistente [Consultado 7 oct 2014]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/micobacterias/Lineamientos%20manejo%20de%20Tuberculosis%20Farmacorresistente.pdf>
 24. Torres D, Sierra Arango F, Beltrán Galvis OA. Cuando la evidencia evalúa pruebas diagnósticas... ¿Qué debemos saber, qué debemos hacer? *Rev Colomb Gastroenterol*. 2004 Dec;19(4):281–5.
 25. Bonilla M del RT, Rosete GC, Sandoval HNM, García JLM, Lozano ML, Leyva CP, et al. Epidemiología molecular de infecciones por micobacterias en pacientes del Hospital Regional 1° de Octubre. *Rev Espec Méd-Quirúrgicas*. 2014;19(1):80–7.
 26. Pacheco M, Awad C, Arias G, Ojeda P, Garay M, Lara A, et al. Extrapulmonary tuberculosis A perspective from a third-level hospital. *Rev Colomb Neumol*. 2013;25(1):16–26.