



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

Diagnóstico microbiológico actual de la tuberculosis

Current microbiological diagnosis of tuberculosis

Fernando Alcaide

Servicio de Microbiología, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España



La tuberculosis (TB) continúa siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes que asolan a la humanidad¹. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2015 hubo en el mundo 10,4 millones de casos nuevos de TB activa y 1,8 millones de personas fallecieron por esta enfermedad¹. Además se estimó que, en ese año, 480.000 personas desarrollaron una tuberculosis multirresistente (TB-MDR; resistencia al menos a la rifampicina e isoniazida) y alrededor de 100.000 personas más tuvieron una TB resistente a la rifampicina. Aunque la TB incide fundamentalmente en los países con escasos recursos económicos, los grandes movimientos migratorios están afectando a los países más ricos del planeta. El retraso diagnóstico, tanto el de enfermedad como el de TB resistente a múltiples fármacos, supone uno de los mayores obstáculos para su control a nivel mundial¹.

Desde un principio, el diagnóstico microbiológico de la TB se ha fundamentado en métodos convencionales como la microscopia, el cultivo y la subsiguiente identificación fenotípica. El método más rápido, sencillo y económico disponible es la baciloscopia, que se basa en la observación directa de bacilos ácido-alcohol resistentes mediante diversas tinciones (Ziehl-Neelsen o auramina)^{2,3}. Sin embargo su escasa sensibilidad global (22-80% de los cultivos positivos) ha restringido su capacidad diagnóstica, sobre todo en las áreas geográficas donde la incidencia de la TB es baja y en las formas extrapulmonares (paucibacilares) de esta^{3,4}. Además, aunque la baciloscopia se utiliza como un marcador de la capacidad de contagio del enfermo tuberculoso, hasta un 17% de la transmisión se ha observado que se debe a pacientes con baciloscopia negativa y cultivo positivo⁵. Por otro lado, a pesar de ser una prueba con una buena especificidad ($\geq 90\%$) en las áreas de mayor incidencia de aislamientos clínicos de micobacterias no tuberculosas (MNT), la baciloscopia tiene un valor predictivo positivo bajo ($\leq 70\%$)²⁻⁴. Por todo ello, en España la baciloscopia tiene una utilidad limitada, ya que actualmente se encuentra entre los países de baja incidencia tuberculosa (10,8 casos por 100.000 habitantes y año) y, en cambio, con un aumento creciente de infecciones por

MNT^{6,7}. A diferencia de la microscopia, el cultivo continúa siendo el método de referencia por su buena sensibilidad y permitir el diagnóstico de la mayoría de las 185 especies del género *Mycobacterium* descritas en la actualidad, así como acceder a estudios posteriores con el aislado micobacteriano (identificación, sensibilidad y tipificación epidemiológica)²⁻⁴. No obstante, el mayor inconveniente del cultivo es la lentitud de crecimiento del bacilo tuberculoso, que retrasa el diagnóstico de la enfermedad. Si bien el cultivo ha tenido un gran desarrollo en las dos últimas décadas, mediante nuevos medios y sistemas automatizados no radiométricos como el MB Bact ALERT[®] (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), MGIT 960[®] (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, MD, EE. UU.) y VersaTREK[®] (Trek Diagnostic System, Westlake, EE. UU.), aún se requieren varias semanas para alcanzar la confirmación microbiológica definitiva, y más aún con los procedimientos de identificación fenotípicos^{2,8}. Por ello, en los últimos años se han planteado diversas estrategias para lograr un diagnóstico rápido de la TB activa. Estas son muy variadas y se fundamentan en la mejora de las técnicas convencionales o la utilización de métodos genotípicos, proteómicos o incluso basados en micobacteriófagos. Por otro lado, es fundamental diferenciar el nivel de aplicación, ya sea a partir de un microorganismo crecido en un cultivo o bien directamente en muestras clínicas. En el primer apartado el diagnóstico es algo más tardío pero con una mayor variedad metodológica, así como una mejor sensibilidad global. Una de estas posibilidades, incorporada en los últimos años, es la detección inmunocromatográfica de la producción del antígeno MPT64 por parte del microorganismo. Se trata de una técnica sencilla y muy rápida, sin apenas manipulación, que se aplica en cultivos crecidos tanto líquidos como sólidos para la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*^{9,10}. Existen diversos productos comerciales (SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid Test[®] kit, Standard Diagnostics Inc., Yongin, Corea; Capilia TB[®], TAUNS Laboratories Inc., Numazu, Japón; BD MGIT TBC identification test[®], Becton Dickinson Diagnostics) que tienen una especificidad superior al 99,5% y una sensibilidad cercana al 98,5%, determinada porque algunas cepas del complejo (como se ha visto en algún *Mycobacterium bovis* BCG) no logran producir esta proteína debido a mutaciones, deleciones o inserciones en el gen que codifica el antígeno MPT64^{9,10}. La otra gran posibilidad técnica a partir de cultivos crecidos son los métodos moleculares. Ya en los años noventa del siglo

Véase contenido relacionado en DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.06.009>
Correo electrónico: falcaide@bellvitgehospital.cat

pasado se desarrollaron las sondas de ADN quimioluminiscentes que identifican, por hibridación con el ARN ribosómico micobacteriano y sin amplificación previa, el complejo *M. tuberculosis* y algunas otras especies relevantes de forma rápida y específica^{2,8}. Sin embargo, las sondas no están disponibles para todas las especies patógenas, requieren una orientación inicial para la elección de la sonda adecuada, no detectan los cultivos mixtos y en algunos casos hay pequeños problemas de especificidad, como los descritos en *M. tuberculosis* con *Mycobacterium terrae* y *Mycobacterium celatum*. Con todo, estas sondas han sido durante mucho tiempo un método de referencia en combinación con los sistemas de cultivo automatizados, logrando una sensibilidad y una especificidad superiores al 99% para el complejo *M. tuberculosis*^{2,8}. En la actualidad los métodos más utilizados se basan en la amplificación de secuencias de ADN específicas y un posterior análisis postamplificación que puede consistir fundamentalmente en: a) la secuenciación de los genes *hsp65*, *rpoB*, *gyrB* y/o 16S rDNA y que se suele reservar como método de referencia para la identificación de MNT cuando otros métodos rutinarios no han sido resolutivos, y b) la hibridación en fase sólida, de la que existen múltiples formatos comerciales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa y chips/arrays de ADN). De estos, los más ampliamente utilizados son los productos comerciales que se fundamentan en la amplificación de una zona genética concreta del espacio intergenético 16S-23S (INNO-LiPA[®], Innogenetics NV, Gante, Bélgica; Speed-Oligo[®], Vircell, Granada, España) y el 23S rDNA (GenoType[®], Hain Lifescience, Nehren, Alemania) y posterior hibridación del producto amplificado sobre las diferentes sondas inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa, que son de fácil lectura e interpretación. En múltiples estudios se ha observado que estos sistemas tienen una buena sensibilidad y especificidad a partir de cultivos tanto líquidos como sólidos, obteniéndose los resultados en una jornada laboral^{2,8,11}. Al hibridar con múltiples zonas simultáneamente, estos métodos permiten la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Además se han desarrollado una amplia variedad de tiras, existiendo la posibilidad de identificar las diferentes especies del complejo *M. tuberculosis*. Esto es de gran utilidad epidemiológica y, sobre todo, terapéutica, ya que no todas las especies de este complejo tienen la misma sensibilidad a los antibióticos, como en el caso de *Mycobacterium bovis*, que es resistente de forma natural a la pirazinamida. Por otro lado, son destacables los pacientes con cáncer de vejiga superficial, donde se realizan tratamientos endocavitarios mediante instilaciones con *M. bovis*-BCG para disminuir el número de recurrencias y mejorar el intervalo libre de enfermedad. En estos casos es necesario monitorizar la presencia de esta especie micobacteriana en la orina.

Dentro del diagnóstico de la tuberculosis a partir de un cultivo positivo, recientemente existe la opción de hacer un estudio proteómico mediante el MALDI-TOF MS. Si bien este sistema identifica el complejo *M. tuberculosis*, no es capaz aún de discernir entre las diferentes especies que lo componen y requiere un cultivo muy bien crecido, sobre todo cuando se trata de un medio líquido. Ello ha hecho que su interés se haya focalizado en la identificación de las MNT, aunque no se descarta que en un futuro muy próximo pueda llegar a ser un método rápido, sencillo y económico para el diagnóstico de la tuberculosis a partir de cultivos, incluso líquidos¹².

En general, el aspecto más relevante en el control de la enfermedad tuberculosa es la rapidez diagnóstica, para conseguir así romper la cadena de transmisión (mediante el aislamiento, tratamiento y estudio de contactos) y evitar múltiples pruebas diagnósticas infructuosas e incluso prolongadas estancias hospitalarias en determinados casos. Para ello es imprescindible trabajar *directamente en la muestra clínica* sin tener que esperar al cultivo. Una posibilidad es la aplicación de bacteriófagos con afinidad específica por las micobacterias. Aunque son técnicas sencillas, rápidas (48 h) y que requieren poco entrenamiento y equipamiento técnico, no

han demostrado una suficiente sensibilidad en la mayoría de los estudios realizados para su implementación en los laboratorios de microbiología clínica^{8,11}. En la actualidad la mejor alternativa para conseguir la detección e identificación del complejo *M. tuberculosis* directamente en la muestra clínica son los métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos (AAN). En las dos últimas décadas se han desarrollado muchas técnicas moleculares, siendo las comerciales las más aceptadas y recomendadas, sobre todo por cuestiones de estandarización y control de calidad. Además, se aconseja que estas pruebas se realicen siguiendo de forma estricta las instrucciones del fabricante, así como la extracción automatizada de los ácidos nucleicos para, entre otras cosas, prevenir las contaminaciones cruzadas. Todas estas técnicas se fundamentan en la amplificación de secuencias genéticas (ADN o ARN) específicas del complejo *M. tuberculosis* y su posterior detección por hibridación, lo cual no implica necesariamente la viabilidad de la micobacteria. A pesar de la gran cantidad de evaluaciones realizadas, ha sido difícil obtener en estos años una evidencia científica sólida y concluyente sobre el tema, debido a la gran heterogeneidad de los estudios y la ausencia de un buen método de referencia (*gold standard*) microbiológico, ya que sigue siendo el cultivo, cuya sensibilidad teórica es inferior a los métodos de AAN. No obstante, se sabe que estos métodos son muy rápidos, cada vez son más sencillos y tienen un valor predictivo positivo (VPP) mayor que la microscopia (>95%), y muy especialmente en las áreas geográficas donde hay un importante número de aislamientos de MNT¹³. Aunque existen una amplia variedad y calidad de técnicas, las recomendaciones actuales se circunscriben a muy pocos métodos comerciales. De hecho, los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) y la *Food and Drug Administration* (FDA) estadounidense recomendaron el AMTD[®] (Amplified *M. tuberculosis* Direct Test; Gen-Probe Inc., San Diego, CA, EE.UU.) y el Amplicor *M. tuberculosis* test[®] (Roche Diagnostic Sytem Inc., Basilea, Suiza) en 1995 y 1996, respectivamente, para el diagnóstico rápido de la tuberculosis^{11,13}. El AMTD[®] es un método isotérmico (42 °C) basado en la amplificación del 16S rRNA y una posterior transcripción inversa e hibridación, mientras que el Amplicor se fundamenta en una PCR convencional de un fragmento específico del 16S rRNA y posterior hibridación. A pesar de que han ido desarrollándose otros buenos métodos, como el BD Probe Tec ET Direct TB System[®] (Becton Dickinson Diagnostic), el TB-LAMP[®] (Eiken Chemical Company Ltd., Japón), el GenoQuick MTB[®] (Hain Lifescience), el Fluorotype MTB[®] (Hain Lifescience), el Abbott Real Time MTB[®] (Abbott, IL, EE.UU.) o el Anyplex plus MTB/NTM/DR-TB[®] (Seegene Inc., Seúl, Corea), entre otros, fue en 2010 cuando se presentó el GeneXpert MTB/RIF[®] (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE.UU., y FIND Diagnostics, Ginebra, Suiza), que se ha convertido en el método más utilizado y recomendado en la actualidad por diversos organismos internacionales¹⁴⁻¹⁶. Se trata de una *nested* semicuantitativa de PCR a tiempo real donde la extracción del ADN, la amplificación de una zona concreta del gen *rpoB* y la simultánea hibridación con sondas fluorogénicas se realizan de forma automatizada e integrada en un cartucho. Es una técnica rápida que en menos de 2 h y con escasa manipulación detecta la presencia del complejo *M. tuberculosis* y las mutaciones más frecuentes relacionadas con la resistencia a la rifampicina en este microorganismo (ver más adelante)^{14,16}. Desde la aparición de todos estos métodos de AAN para el diagnóstico de la TB, las indicaciones para su utilización han ido evolucionado y ampliándose. En la actualidad se recomienda utilizarlas (con baja calidad de evidencia) en, al menos, una muestra respiratoria (preferiblemente la primera) de pacientes con signos y síntomas de TB pulmonar pero sin diagnóstico definitivo, y cuando el resultado de la prueba pueda influir en el tratamiento y acciones necesarias para el control de la TB^{4,13-16}. Cuando la baciloscopia es positiva y la prueba de AAN es negativa, el diagnóstico de TB pulmonar es poco probable^{4,13}. Sin embargo, cuando la baciloscopia es

negativa y la sospecha clínica es alta o intermedia, una prueba de AAN positiva sugiere de forma presuntiva el diagnóstico de TB pulmonar en espera del cultivo^{4,13}. En el caso de la TB extrapulmonar se recomienda utilizar las técnicas de AAN (con muy baja calidad de evidencia), teniendo en cuenta que si estas son positivas existe una elevada probabilidad de padecer una TB extrapulmonar, ya que apenas existen falsos positivos⁴. Por otro lado, las indicaciones de estas técnicas se han hecho extensibles a la población pediátrica y para la detección de resistencia a la rifampicina y, por tanto, de la TB-MDR^{4,14,16}. En general, cuando estas pruebas moleculares son negativas no se puede descartar la enfermedad tuberculosa^{4,13}. Por ello, de forma clásica, en las diferentes guías y trabajos se ha remarcado que estas técnicas no deberían utilizarse rutinariamente cuando la sospecha clínica de TB es baja, ya que el VPP es inferior al 50%^{4,13}. Al tratarse de una metodología que no sustituye otras pruebas diagnósticas, sino que es complementaria (con un importante valor añadido) a la metodología habitual, el coste intrínseco de las técnicas de AAN ha sido un tema de gran debate y controversia. Sin embargo, en los últimos años se ha ido observando que la aplicación rutinaria en pacientes con sospecha de TB permite de forma global un ahorro potencial significativo. Ello ha sido bastante patente en áreas con una elevada incidencia de TB e incluso de TB-MDR¹⁷. En este sentido, el trabajo de Herráez et al.¹⁸ publicado en este número de *ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA* aborda un interesante estudio de coste-efectividad en el diagnóstico de la TB mediante el sistema GenXpert MTB/RIF[®]. En él se analiza el impacto económico y sanitario de tres estrategias de diagnóstico microbiológico de la TB, comparando el método habitual clásico del centro en donde se llevó a cabo, con dos situaciones alternativas en las que la baciloscopia fue negativa pero en una se seleccionaron los pacientes con una elevada sospecha clínica de padecer TB y en la otra se incluyó a todos los casos. Se observó que la introducción del GeneXpert era más coste-efectiva que el procedimiento convencional, siendo especialmente rentable la segunda alternativa de aplicación en todos los casos con una reducción del 70% de las estancias hospitalarias y del 75% en los días sin tratamiento específico, aparte de un ahorro económico teórico de 1,8 millones de euros anuales, siempre y cuando a los pacientes de TB se les realicen ingresos hospitalarios en la práctica clínica habitual, de 2 a 3 semanas según los casos. La importancia de este trabajo radica en que se ha realizado en un área de baja incidencia de TB, al igual que un estudio previo en nuestro país, donde se observó que la introducción del GeneXpert en pacientes con sospecha clínica de TB y baciloscopia negativa puede reducir costes derivados de la hospitalización y pruebas diagnósticas posteriores, así como el tiempo transcurrido hasta el inicio del tratamiento antituberculoso¹⁹. Igualmente en Alemania, con baja prevalencia de TB, en un estudio reciente se observó que la introducción rutinaria del GeneXpert, complementando o sustituyendo la baciloscopia, podía reducir significativamente los gastos derivados del diagnóstico de la TB²⁰.

Otras posibilidades de diagnóstico rápido de la TB pasaría por la utilización de biomarcadores junto al paciente (*point of care*). Este es un campo aún en desarrollo donde el marcador de activación de células T (TAM-TB), compuestos volátiles orgánicos o el lipoarabinomano (LAM) parecen ser los de mayor interés⁸. Este último ya se ha comercializado para la detección en orina del LAM (LF-LAM, Alere DetermineTM TB LAM Ag[®], Alere Inc., Waltham, MA., EE. UU.), aunque de momento su sensibilidad es algo baja para una implementación general.

Uno de los aspectos más relevantes y específicos en el diagnóstico rápido de esa enfermedad es la TB resistente a los antimicrobianos, y muy especialmente la TB-MDR por sus graves implicaciones clínicas y epidemiológicas. Los métodos moleculares se basan en la detección de las mutaciones en las dianas cromosómicas más frecuentemente relacionadas con la resistencia

fenotípica a múltiples fármacos^{11,21}. Actualmente existen diversos productos comerciales basados en una PCR e hibridación en tiras de nitrocelulosa, como el INNO-LiPA[®] (Innogenetics) y GenoType[®] (Hain Lifescience), que pueden detectar la multiresistencia a partir del cultivo y muestra clínica, con excelente sensibilidad y especificidad^{11,21}. Además, el sistema GenoType[®] (Hain Lifescience) ha desarrollado otras tiras para el estudio genotípico de la resistencia a otros fármacos, como inyectables de segunda línea, fluoroquinolonas y etambutol. Aunque no existe un consenso totalmente unánime, la OMS ha respaldado desde 2008 la utilización de estos sistemas comerciales moleculares en las muestras de esputo con baciloscopia positiva o aislamientos de cultivo en pacientes con un elevado riesgo de padecer una TB-MDR o TB-XDR²¹, si bien, estos métodos no sustituyen la realización de las pruebas de sensibilidad fenotípicas a los antituberculosos.

En resumen, las técnicas de biología molecular se han constituido en una metodología fundamental en el diagnóstico rápido de la TB activa pulmonar y extrapulmonar, y de los casos graves de multiresistencia, con un coste-efectividad excelente incluso en áreas geográficas con una baja prevalencia de la enfermedad.

Bibliografía

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2016. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [9a]. SEIMC, 2005. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>
- Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection and staining procedures. En: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, et al., editores. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2015. p. 536–69.
- Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis.* 2017;64:111–5.
- Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet.* 1999;353:444–9.
- Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: A NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* 2013;42:1604–13.
- Alcaide F, Peña MJ, Pérez-Risco D, Camparubi D, Gonzalez-Luquero L, Grijota-Camino MD, et al. Increasing isolation of rapidly growing mycobacteria in a low-incidence setting of environmental mycobacteria, 1994–2015. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-017-2949-0> [Epub ahead of print].
- Simner PJ, Stenger S, Richter E, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, Wengenack NL. *Mycobacterium*: Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. En: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, et al., editores. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2015. p. 570–94.
- Vadwai V, Sadani M, Sable R, Chavan A, Balan K, Naik A, et al. Immunochromatographic assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: What is the perfect time to test? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:282–7.
- Yin X, Zheng L, Lin L, Hu Y, Zheng F, Hu Y, et al. Commercial MPT64-based tests for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: A meta-analysis. *J Infect.* 2013;67:369–77.
- Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Suppl 1:34–40.
- Alcaide F, Palop-Borrás B, Domingo D, Tudó G. Application of mass spectrometry in mycobacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34 Suppl 2:31–5.
- CDC. Update Guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58:7–10.
- World Health Organization. Policy updated. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children 2013. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2013. WHO/HTM/TB/2013.16. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112472/1/9789241506335_eng.pdf?ua=1
- Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert[®] MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014. 1(CD009593).
- World Health Organization. The use of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis TB. Meeting Report. 2016. WHO/HTM/TB/2016.19. Disponible en: http://www.who.int/tb/laboratory/xpert_report.2016.pdf?ua=1

17. Vassall A, van Kampen S, Sohn H, Michael JS, John KR, den Boon S, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis with the Xpert MTB/RIF assay in high burden countries: A cost-effectiveness analysis. *PLoS Med.* 2011;8:e1001120.
18. Herráez O, Asensio-Egea MA, Huertas-Vaquero M, Carranza-González R, Castellanos-Monedero J, Franco-Huerta M, et al. Cost-effectiveness study of the microbiological diagnosis of tuberculosis using geneXpert MTB/RIF. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35:403–10.
19. Muñoz L, Moure R, Porta N, Gonzalez L, Guerra R, Alcaide F, et al. GeneXpert® for smear-negative pulmonary tuberculosis: Does it play a role in low-burden countries? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:325–6.
20. Diel R, Nienhaus A, Hillemann D, Richter E. Cost-benefit analysis of Xpert MTB/RIF for tuberculosis suspects in German hospitals. *Eur Respir J.* 2016;47:575–87.
21. World Health Organization. WHO Policy Statement. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). 2008. Disponible en: http://www.who.int/tb/laboratory/line_probe_assays/en/