

## Biomarcadores en tuberculosis

DANIEL RAMOS S.\* y JUAN CARLOS RODRÍGUEZ D.\*\*

### Biomarkers in tuberculosis

*The classical laboratory diagnostic methods for tuberculosis have a low sensitivity or take a long time to know their results. New methods are underway. Biomarkers are a good option to improve our diagnostic approach to this disease. They have good performance, low cost and accessibility. They identify a patient's inflammatory or metabolic response to Mycobacterium Tuberculosis or identifies molecules that are typical of the pathogen. In this paper we sum up the biomarkers with a good diagnostic performance described in well design investigations. Early diagnosis with these new techniques should contribute to the elimination of the disease.*

**Key words:** Biomarkers, tuberculosis, diagnosis.

### Resumen

*Los métodos diagnósticos clásicos para la tuberculosis son de baja sensibilidad o son muy lentos en la obtención de resultados (baciloscopia, cultivo de Koch). De ahí nace la necesidad de nuevos métodos diagnósticos para esta enfermedad. Los biomarcadores surgen como una opción a esta problemática, con un buen rendimiento diagnóstico, costo y accesibilidad. Ellos permiten identificar la respuesta inflamatoria y/o metabólica del huésped, extrapolando la presencia de Mycobacterium tuberculosis; o identifican moléculas propias del patógeno. En la presente revisión se describen biomarcadores que presentan un buen rendimiento diagnóstico basados en metodologías de investigación de alto nivel (estudio de cohortes, prospectivos, muestreo consecutivo o aleatorizado, comparación de rendimiento diagnóstico frente a cultivo). Es necesario el desarrollo de estas nuevas técnicas con el fin de realizar el diagnóstico precoz de la enfermedad y lograr así su tan ansiada eliminación.*

**Palabras clave:** Biomarcadores, tuberculosis, diagnóstico.

### Introducción

Los métodos diagnósticos clásicos para la tuberculosis tienen una baja sensibilidad o son muy lentos. Así, la baciloscopia positiva, que requiere de 5 mil a 10 mil bacilos por mililitro de muestra<sup>1</sup>, presenta una baja sensibilidad (50-80%)<sup>2</sup>. El aislamiento del *M. tuberculosis* mediante cultivo en medio de Lowenstein, que es el *gold standard*, requiere sólo de 10 bacilos por mililitro, pero es muy lento, ya que demora entre treinta y sesenta días<sup>3</sup>. El cultivo en medios líquidos es más rápido, pero de igual forma requiere de varios días de procesamiento. De ahí surge la

necesidad de disponer de nuevas técnicas rápidas y accesibles para el diagnóstico de tuberculosis. Recientemente han surgido técnicas de biología molecular, *Xpert MTB-RIF* y *Xpert Ultra MTB-RIF*, que mejoran sustancialmente el rendimiento diagnóstico, pero son costosas y no siempre el acceso a ellas es fácil. El *Xpert MTB-RIF* es una prueba automatizada de reacción de polimerasa en cadena, que permite en menos de dos horas extraer, amplificar y detectar el material genético micobacteriano. Esta prueba logra detectar al *Mycobacterium tuberculosis* con sólo 131 bacilos por mililitro de muestra y tiene una especificidad < 99%. Además, identifica el gen *rpoB*, que co-

\* Becado Enfermedades Respiratorias, Instituto Nacional del Tórax.

\*\* Médico Servicio Medicina Respiratoria, Instituto Nacional del Tórax.

difica para la resistencia a Rifampicina<sup>4</sup>, lo cual es muy importante, considerando que el 90% de los pacientes con resistencia a Rifampicina lo son también a Isoniazida<sup>5</sup>. El *Xpert Ultra MTB-RIF*, que es la técnica que disponemos actualmente, mejora la sensibilidad de la prueba anterior, logrando identificar la micobacteria con 16 bacilos por mililitro de muestra, incorporando la amplificación de los genes IS6110 e IS1081<sup>6</sup>.

En la actualidad, como una forma de mejorar el rendimiento diagnóstico, para así lograr un mejor control de la enfermedad, se están estudiando una serie de biomarcadores. Estos se definen como características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos<sup>7</sup>.

Recientemente MacLean et al.<sup>8</sup>, realizaron una revisión sistemática actualizada (2010-2017) de las publicaciones referentes a biomarcadores para la detección de tuberculosis activa. Identificaron aquellos estudios con el mejor nivel de metodología (estudio de cohortes, prospectivos, muestreo consecutivo o aleatorizado, comparación de rendimiento diagnóstico frente a cultivo). Considerando que es importante la difusión de estos resultados, a continuación, presentamos una revisión resumida de los métodos diagnósticos evaluados.

## Respuesta del huésped

### *Anticuerpos contra antígeno micobacteriano A60*

- Ben-Selma et al.<sup>9</sup> evaluaron la utilidad clínica de la detección de inmunoglobulina A, G y M en sangre en contra del antígeno micobacteriano A60 para el diagnóstico y discriminación de tuberculosis activa de otro tipo de enfermedad pulmonar. La sensibilidad reportada fue desde un 31,3% (IgA) hasta un 94% (IgG) en tuberculosis pulmonar y para tuberculosis extrapulmonar desde un 21% (IgA) hasta un 84% (IgG). La especificidad de la prueba fue de un 92% para IgG hasta un 84% para IgA en el grupo de enfermedad pulmonar no tuberculosa. La combinación de IgG con IgA y/o IgM no mejoró la sensibilidad. El uso de la IgG anti antígeno A60 permite hacer un diagnóstico rápido y discriminar entre tuberculosis activa y otro tipo de enfermedad pulmonar. Esta prueba podría aumentar el rendimiento diagnóstico, especialmente en aquellos casos donde la baciloscopia es negativa, con la ventaja de lo simple de su metodología.

### *Panel de detección de múltiples anticuerpos*

Algunos investigadores han evaluado la respuesta inmune a múltiples antígenos micobacterianos con la intención de mejorar el rendimiento de la prueba diagnóstica. Las experiencias clínicas reportadas se resumen a continuación.

- Shete et al.<sup>10</sup> evaluaron la respuesta de anticuerpos a múltiples antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudiaron 8 anticuerpos anti antígenos específicos de la micobacteria (Ag85B, Ag85A, Ag85C, Rv0934-P38, Rv3881, BfrB, Rv3873 y Rv2878c), que permitían diferenciar a pacientes con tuberculosis activa *versus* aquellos sin esta enfermedad. Este panel tiene una sensibilidad de 90,6% y una especificidad de 88,6%.
- Rekha et al.<sup>11</sup> validaron el panel de anticuerpos ALS, que identifica los anticuerpos frente a 7 antígenos micobacterianos (BCG, LAM, TB15.3, TB51A, CFP10-ESAT6-A, CFP, CW). La sensibilidad obtenida fue de un 91% y la especificidad de un 88%.

### *Detección de citoquinas/quimioquinas, proteínas y actividad metabólica*

La detección de mediadores inflamatorios y metabólicos han permitido extrapolar la presencia del agente micobacteriano en nuestro organismo, y estas son algunas de las experiencias:

- *Panel de 8 biomarcadores en saliva*: Jacobs et al.<sup>12</sup> evaluaron una serie de biomarcadores del huésped, determinando el panel constituido por granzima A, factor 15 (GDF15), amiloide sérico A (SAA), IL-21, CXCL5, IL-12(p40), IL-13 y PAI-1, como un método diagnóstico útil de enfermedad tuberculosa activa. Esta metodología tiene un 100% de sensibilidad y un 95% de especificidad en ausencia de coinfección con VIH.
- *Panel de 7 biomarcadores en suero*: Chegou et al.<sup>13</sup> evaluaron el rendimiento diagnóstico de un panel compuesto por 7 biomarcadores en suero (proteína C reactiva, transtiretina, IFN- $\gamma$  (interferón gama), factor H del complemento, apolipoproteína A1, proteína inducible 10 y amiloide sérico A). Esta metodología reportó una sensibilidad de 93,8%, y una especificidad de 73,3%, un valor predictivo positivo de 60,6% y un valor predictivo negativo de 96,4%, independiente de la condición de VIH.
- *Panel de 6 biomarcadores en plasma*: Jacobs et al.<sup>14</sup> evaluaron la utilidad de 6 biomarcadores (molécula de adhesión celular neural, amiloide sérico P, ferritina, factor H del complemento y proteína 1 de matriz extracelular). Reportaron una sensibilidad de 100% y una es-

pecificidad de 89,3%, independiente del estado serológico de VIH; presentando un rendimiento diagnóstico de 100% en la ausencia de VIH. Además, 11 de las proteínas incorporadas en el estudio presentaron modificaciones de sus niveles en la evolución de la enfermedad, las cuales podrían utilizarse en la monitorización de la respuesta a la terapia.

- *Proteína quimiotáctica de monocito 1 en sangre*: Liang et al.<sup>15</sup> exploraron la utilidad diagnóstica de la proteína quimiotáctica de monocito 1 en sangre para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar activa. Esta metodología mostró una sensibilidad de 90,3%, y una especificidad de 97%, con un valor predictivo positivo de 96,8%, y un valor predictivo negativo de 90,8%.
- *Líquido pleural*:
- Kalantri et al.<sup>16</sup> evaluaron el rendimiento del interferón gama, la reacción de polimerasa en cadena (PCR) en tiempo real, la adenosina deaminasa y la inmunoglobulina A en líquido pleural para el diagnóstico de pleuresía tuberculosa. El interferón gama mostró la mayor sensibilidad para el diagnóstico de pleuresía tuberculosa con un 98%, seguida por la adenosina deaminasa con un 92%. La determinación de PCR tuvo una sensibilidad de un 80%. La combinación de determinación de PCR e interferón gama presentó la mejor sensibilidad con un 100%. La suma de la detección de la respuesta inflamatoria local a la detección bacilar por biología molecular aumenta notablemente el rendimiento diagnóstico en caso de pleuresía tuberculosa, esto se explica probablemente por la condición paucibacilar de este tipo de infección pleural.
- Sutherland et al.<sup>17</sup> realizaron el análisis de múltiples citoquinas en pleura demostrando la utilidad preliminar del interferón gama, el factor de necrosis tumoral alfa y la proteína 10 inducida por interferón gama (IP 10) en líquido pleural. El rendimiento diagnóstico del análisis conjunto de estos tres biomarcadores entrega una sensibilidad de un 92% y una especificidad de un 91%.

#### **Detección de ácido ribonucleico del huésped (ARN)**

- ARN en sangre: Laux da Costa et al.<sup>18</sup> evaluaron la expresión génica del huésped mediante PCR en tiempo real para distinguir tuberculosis de otro tipo de enfermedad pulmonar. Estudiaron la expresión mediante ARN de los genes de granzima A (GZMA), proteína de unión a guanilato 5 (GBP5) y receptor Fc

gama A1 (CD64). La combinación de los niveles de expresión de estos tres genes permitió distinguir tuberculosis de otra enfermedad pulmonar, con una sensibilidad de 93% y una especificidad de 95%.

#### **Detección del patógeno**

- *Detección de Lipoarabinomanano (LAM) en orina en pacientes VIH sin terapia anti-retroviral*: El lipoarabinomanano es un lipopolisacárido presente en la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis*. Esta molécula puede ser detectada en orina mediante la técnica de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA). Lawn et al.<sup>19</sup> evaluaron el rendimiento diagnóstico de esta técnica en pacientes VIH sin terapia antiretroviral. La mayor sensibilidad fue en pacientes con recuento de linfocitos CD4 bajo 50 células con un 66,7%. La especificidad en todos los estratos de linfocitos CD4 fue sobre el 98%. Cuando se combinó la baciloscopia en esputo con LAM en orina en pacientes con linfocitos CD4 bajo 50 células, la sensibilidad fue de un 72,2%. Esta metodología se caracteriza por su bajo costo.
- *Detección de LAM en orina en pacientes VIH negativos*: Broger et al.<sup>20</sup> evaluaron el rendimiento diagnóstico de tres kits de LAM en orina (AlerelLAM, FujiLAM y EclLAM) para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. La mayor sensibilidad fue en FujiLAM y EclLAM, con un 53,2% y un 66,7%, respectivamente; y el valor predictivo positivo fue de 95,2% y 93,7%. Su negatividad no descarta la enfermedad, dado lo bajo de sus valores predictivos negativos (83,2% y 87,4%).
- *Detección completa de Mycobacterium Tuberculosis*: Mourão et al.<sup>21</sup> mediante la técnica de cromatografía de extracción de gas/espectrometría de masa identificaron 5 biomarcadores lipídicos en esputo; estos son derivados del ácido hexacosanoico y ácido octacosanoico, los cuales tienen una relación masa/carga (m/z) específica. La sensibilidad y especificidad fue de 80% y de 98%, en comparación al cultivo. La metodología es compleja de implementar; sin embargo, es fácil de operar dada la automatización de sus procesos.
- *Detección de ácido micólico*: El ácido micólico es una molécula que se encuentra en las paredes celulares de micobacterias y de microorganismos ácido-resistentes. Szewczyk et al.<sup>22</sup> mediante la técnica de ionización por elec-

**Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de diversos biomarcadores utilizados en el diagnóstico de tuberculosis según muestra y tipo de tuberculosis** <sup>2, 8-20</sup>

Biomarcador	Muestra	Tipo tuberculosis	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgG anti-antígeno micobacteriano A60	Plasma	Pulmonar	94	92
IgG anti-antígeno micobacteriano A60	Plasma	Extrapulmonar	84	92
Panel 8 anticuerpos	Plasma	Pulmonar	90,6	88,6
Panel 7 anticuerpos	Plasma	Pulmonar	91	88
Panel 8 biomarcadores*	Saliva	Pulmonar	100	95
Panel 7 biomarcadores	Suero	Pulmonar	93,8	73,3
Panel 6 biomarcadores	Plasma	Pulmonar	100	89,3
Proteína quimiotáctica de monocito 1	Sangre total	Pulmonar	90,3	97
Interferón $\gamma$	Líquido pleural	Pleural	98	96
Adenosina deaminasa	Líquido pleural	Pleural	92	92
PCR en tiempo real	Líquido pleural	Pleural	80	98
Interferón $\gamma$ + TNF $\alpha$ + IP10	Líquido pleural	Pleural	92	91
ARN GZMA/GBP5/CD64	Sangre total	Pulmonar	93	95
LAM	Orina	Pulmonar	66,7	98
FujiLAM	Orina	Pulmonar	53,2	95,2
EclLAM	Orina	Pulmonar	66,7	93,7
Detección completa <i>M. tuberculosis</i>	Espuito	Pulmonar	80	98
Detección de ácido micólico (Inmediata)	Espuito	Pulmonar	69	N/E
Detección de ácido micólico (10 <sup>o</sup> día cultivo)	Espuito	Pulmonar	94	N/E
Cultivo en medio de Lowenstein ( <i>gold standard</i> )	Espuito	Pulmonar	50-80	> 99

IgG: Inmunoglobulina G; PCR: reacción de polimerasa en cadena; IP 10: proteína 10 inducida por interferón  $\gamma$ ; LAM: Lipoarabinomanano; GZMA: granzima A; GBP5: proteína de unión a guanilato 5; CD64: receptor Fc gama A1; \*Sensibilidad y especificidad en ausencia de VIH, N/E: No especificado.

*troscopy* identificaron el perfil de conformación de ácido micólico de diferentes micobacterias. Esta técnica se utilizó en muestras de esputo para el diagnóstico rápido de tuberculosis. La sensibilidad en muestra de esputo directa fue de un 69%; sin embargo, la sensibilidad aumentó significativamente al realizarlo al décimo día de incubación del cultivo (Tabla 1).

## Discusión

A pesar de décadas de investigación de candidatos de biomarcadores para el diagnóstico de tuberculosis activa, aún no existe una técnica sencilla, rápida, accesible y de bajo costo. Las metodologías diagnósticas sin ADN y con un buen rendimiento son una prioridad para dar respuestas a estas problemáticas, tal como se presentaron en nuestra revisión.

Actualmente se dispone de la base de datos FIND<sup>23</sup> (*The global alliance for diagnostics*), que conecta países y comunidades con agentes de investigación y clínicos para impulsar la innovación en métodos diagnósticos, teniendo la finalidad de integrar este espíritu colaborativo en sistemas de salud sostenibles y resilientes. Esta base de datos simplificará el intercambio de datos y conocimientos, coordinará el esfuerzo y asignación de recursos para permitir la verificación y validación de candidatos de biomarcadores, para última instancia traducir estas herramientas en elementos clínicamente útiles.

Los estudios de nuevos biomarcadores a menudo tienen un diseño metodológico pobre, y sus hallazgos con poca frecuencia se confirman en estudios independientes. Se necesitan metodologías de validación rigurosas, con el fin de garantizar el rendimiento diagnóstico de esta herramienta diagnóstica.

Estas innovaciones diagnósticas en tuberculosis son fundamentales para alcanzar los objetivos de la “estrategia para el fin de la tuberculosis”.

## Conclusión

Se espera que los biomarcadores constituyan una alternativa diagnóstica para la tuberculosis. Estos podrían ser una solución a las problemáticas de rendimiento diagnóstico, costo y accesibilidad. A estos biomarcadores se les debe exigir una rigurosa metodología de investigación y validación, con el fin de garantizar su utilidad clínica y así ser una herramienta que permita el control y eliminación de esta enfermedad.

## Bibliografía

- 1.- PEÑA C, CÉSPED M, WOLFF M, ÁLVAREZ F, GARAY C, MEDINA M, et al. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar mediante fibrobroncoscopia en pacientes con VIH. *Rev. chil. enferm. respir.* 2014; 30 (1): 46-53.
- 2.- ARIAS F, HERRERA T. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. *Rev. chil. enferm. respir.* 2016; 32 (4): 254-9.
- 3.- DORRONSORO I, TORROBA L. Microbiología de la tuberculosis. *Anales Sis San Navarra.* 2007; 30 (2): 67-85.
- 4.- VALLEJO P, RODRIGUEZ JC, SEARLE A, FARGA V. Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. *Rev. chil. enferm. respir.* 2015; 31 (2): 127-31.
- 5.- PEÑA C, HERRERA T, RUIZ N, ARIAS F. Manejo clínico y programático de la tuberculosis con resistencia a fármacos. *Rev. chil. enferm. respir.* 2018; 34 (2): 122-8.
- 6.- 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.* 2018; 18 (1): 76-84. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30691-6. Erratum in: *Lancet Infect Dis.* 2018 Feb 21; PMID: 29198911; PMCID: PMC6168783.
- 7.- STRIMBU K, TAVEL JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010; 5 (6): 463-6. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.
- 8.- MACLEAN E, BROGER T, YERLIKAYA S, FERNÁNDEZ-CARBALLO BL, PAI M, DENKINGER CM. A systematic review of biomarkers to detect active tuberculosis. *Nat Microbiol.* 2019; 4 (5): 748-58. doi: 10.1038/s41564-019-0380-2. Erratum in: *Nat Microbiol.* 2019 Apr 11; PMID: 30804546.
- 9.- BEN-SELMA W, HARIZI H, MARZOUK M, BEN KAHLA I, BEN LAZREG F, FERJENI A, et al. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM, and IgA antibodies to mycobacterial A60 antigen in active tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 68 (1): 55-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.006.
- 10.- SHETE PB, RAVINDRAN R, CHANG E, WORODRIA W, CHAISSON LH, ANDAMA A, et al. Evaluation of antibody responses to panels of *M. tuberculosis* antigens as a screening tool for active tuberculosis in Uganda. *PLoS One.* 2017; 12 (8): e0180122. doi: 10.1371/journal.pone.0180122.
- 11.- REKHA RS, KAMAL SM, ANDERSEN P, RAHIM Z, HOQ MI, ARA G, et al. Validation of the ALS assay in adult patients with culture confirmed pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2011; 6 (1): e16425. doi: 10.1371/journal.pone.0016425.
- 12.- JACOBS R, MAASDORP E, MALHERBE S, LOXTON AG, STANLEY K, VAN DER SPUY G, et al. Diagnostic Potential of Novel Salivary Host Biomarkers as Candidates for the Immunological Diagnosis of Tuberculosis Disease and Monitoring of Tuberculosis Treatment Response. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160546. doi: 10.1371/journal.pone.0160546.
- 13.- CHEGOU NN, SUTHERLAND JS, MALHERBE S, CRAMPIN AC, CORSTJENS PL, GELUK A, et al. Diagnostic performance of a seven-marker serum protein biosignature for the diagnosis of active TB disease in African primary healthcare clinic attendees with signs and symptoms suggestive of TB. *Thorax.* 2016; 71 (9): 785-94. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207999.
- 14.- JACOBS R, MALHERBE S, LOXTON AG, STANLEY K, VAN DER SPUY G, WALZL G, et al. Identification of novel host biomarkers in plasma as candidates for the immunodiagnosis of tuberculosis disease and monitoring of tuberculosis treatment response. *Oncotarget.* 2016; 7 (36): 57581-92. doi: 10.18632/oncotarget.11420.
- 15.- LIANG Y, WANG Y, LI H, YANG Y, LIU J, YU T, et al. Evaluation of a whole-blood chemiluminescent immunoassay of IFN- $\gamma$ , IP-10, and MCP-1 for diagnosis of active pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients. *APMIS.* 2016; 124 (10): 856-64. doi: 10.1111/apm.12583.
- 16.- KALANTRI Y, HEMVANI N, CHITNIS DS. Evaluation of real-time polymerase chain reaction, interferon-gamma, adenosine deaminase, and immunoglobulin A for the efficient diagnosis of pleural tuberculosis. *Int J Infect Dis.* 2011; 15 (4): e226-31. doi: 10.1016/j.ijid.2010.11.011.
- 17.- SUTHERLAND JS, GARBA D, FOMBAH AE, MENDY-GOMEZ A, MENDY FS, ANTONIO M, et al. Highly accurate diagnosis of pleural tuberculosis by immunological analysis of the pleural effusion. *PLoS One.* 2012; 7 (1): e30324. doi: 10.1371/journal.pone.0030324.
- 18.- LAUX DA COSTA L, DELCROIX M, DALLA COSTA ER, PRESTES IV, MILANO M, FRANCIS SS, et

- al. A real-time PCR signature to discriminate between tuberculosis and other pulmonary diseases. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015; 95 (4): 421-5. doi: 10.1016/j.tube.2015.04.008.
- 19.- LAWN SD, KERKHOFF AD, VOGT M, WOOD R. Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12 (3): 201-9. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70251-1.
- 20.- BROGER T, NICOL MP, SIGAL GB, GOTUZZO E, ZIMMER AJ, SURTIE S, et al. Diagnostic accuracy of 3 urine lipoarabinomannan tuberculosis assays in HIV-negative outpatients. *J Clin Invest*. 2020; 130 (11): 5756-64. doi: 10.1172/JCI140461. PMID: 32692731; PMCID: PMC7598043.
- 21.- MOURÃO MP, KUIJPER S, DANG NA, WALTERS E, JANSSEN HG, KOLK AH. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum: A validation study using solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016; 1012-3: 50-4. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.12.023.
- 22.- SZEWCZYK R, KOWALSKI K, JANISZEWSKA-DROBINSKA B, DRUSZCZYŃSKA M. Rapid method for *Mycobacterium tuberculosis* identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76 (3): 298-305. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.025.
- 23.- FIND (diagnosis for all). Recuperado el 19 May 2021, desde <https://www.finddx.org/>

---

Correspondencia a:  
Dr. Juan Carlos Rodríguez D.  
Instituto Nacional del Tórax.  
José M. Infante 717. Comuna de Providencia, Santiago,  
Chile.  
Email: [jcerodriguez@gmail.com](mailto:jcerodriguez@gmail.com)