

Características operativas de las Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y la Amplificación isotérmica mediada por Asas en la detección de tuberculosis pulmonar. Una revisión sistemática

Operative characteristics of real time polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification in the detection of pulmonary tuberculosis: A systematic review

Gabriel Jaime Serna Quintana¹, Beatriz Helena Aristizabal Bernal²

RESUMEN

Objetivo: exponer las características operativas de las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y la Amplificación isotérmica mediada por Asas (LAMP) para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Metodología: revisión sistemática de la literatura científica publicada durante los años 2005 a 2009, de la prueba LAMP comparada con la qPCR para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

Resultados: los hallazgos muestran sensibilidades de la prueba LAMP que fluctúan entre 94.1% – 100%, comparado con un 85.2% a 86.3% para la prueba qPCR, y unas especificidades entre 94.2 – 100% para LAMP frente a 88.6% – 100% de la qPCR.

Conclusiones: estos hallazgos demuestran la importancia de evaluar dicha metodología en nuestra región para mejorar el diagnóstico de esta enfermedad.

Palabras clave: Revisión. *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis pulmonar. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Diagnóstico.

ABSTRACT

Objective: to describe the operating characteristics of the real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) and Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis caused by the members of *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Methods: systematic review of the scientific literature published during the years 2005 to 2009, of LAMP test compared to qPCR for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.

¹ Bacteriólogo y laboratorista clínico, Laboratorio clínico Prolab S.A.S. Estudiante de Maestría en Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia. Investigador del Centro de Epidemiología y Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas (Edimej). Medellín Colombia.

² MSc y PhD en biología molecular. Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe. Investigadora del Centro de Epidemiología y Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas (Edimej)

Correspondencia: Gabriel Jaime Serna Quintana. Correo electrónico: coordinaciontecnica@prolab.com.co

Fecha de recibido: 15 de septiembre de 2010

Fecha de aceptación: 28 de marzo de 2011

Results: the findings showed sensibilities among 94.1% to 100% for LAMP tests, compared to 85.2% to 86.3% for qPCR test, and specificities between 94.2% - 100 % for LAMP as opposed to 88.6% – 100% for qPCR test.

Conclusions: these findings demonstrate the relevance of evaluating the above mentioned tests in our region to improve the diagnosis of this disease.

Keywords: review; *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis, pulmonary; nucleic acid amplification techniques; diagnosis.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, la tuberculosis (TB) es considerada como un problema de salud pública. Anualmente, se presentan aproximadamente 9 millones de casos nuevos de personas con TB y 2 millones de muertes por esta entidad¹. Esta situación se ha facilitado, entre otras razones, por el aumento en la prevalencia de pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), que también está relacionada con el aumento de las formas extrapulmonares de la enfermedad^{2,3}. Uno de los puntos clave para el control de la infección y el tratamiento exitoso de los pacientes radica en una detección rápida del patógeno y en la identificación de micobacterias clínicamente importantes, tales como las del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (del cual hacen parte *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti* y *M. microti*)^{4,5}.

La prueba de referencia para el diagnóstico de esta enfermedad es el cultivo en medio sólido (Ogawa Kudoh o Löwenstein-Jensen). Este método puede requerir hasta 8 semanas para el crecimiento de la micobacteria, con una sensibilidad que varía enormemente según lo publicado en la literatura. Dicha sensibilidad depende de la muestra empleada y del tratamiento inicial que se le dé para ser cultivada^{3,6-11}. Sin embargo, durante los últimos años, múltiples pruebas de diagnóstico molecular y pruebas “hechas en casa” (denominadas en inglés como “in house”, las cuales son métodos desarrollados en laboratorios de investigación, pero que no poseen licencias o aprobaciones para distribución comercial), han sido reportadas en la literatura científica para la detección y tipificación de los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Estas pruebas ofrecen enormes

ventajas en términos de tiempo y especificidad; sin embargo, no se ha generalizado su uso en el ambiente clínico debido a dificultades en algunos aspectos como la recolección de la muestra, la purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la selección de los pacientes⁷.

Entre las pruebas comerciales aprobadas por la “Food and Drug Administration” (FDA) están la prueba *cobas amplikor*® para *M. tuberculosis* de Roche Diagnostics, *amplified MTD*® (*Mycobacterium Tuberculosis Direct*) Test, de Gen – Probe, *LCX*® Test de Abbott y el *BD – Probe*® Test, de Becton Dickinson. Todas estas pruebas muestran desempeños adecuados en el ámbito clínico cuando son aplicadas en muestras de pacientes con coloración de Ziehl Neelsen positiva (ya sea una o cuatro cruces). La única prueba aprobada por la FDA para su aplicación en especímenes con resultados negativos por dicha coloración es la AMTD (E-AMTD) de segunda generación de Gen – Probe^{2,4,7-9,12,13}.

A pesar de la variedad de pruebas moleculares disponibles, y debido a que el factor tiempo es crítico en la obtención de resultados para diagnosticar esta enfermedad con miras al establecimiento de un tratamiento temprano, las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR por su sigla en inglés “Real-time quantitative PCR”) son las más empleadas para la investigación de *M. tuberculosis*^{12,14-16} en los centros que cuentan con los recursos técnicos y económicos para llevar a cabo dichas pruebas. Por otro lado, gracias a los adelantos en el área de la biología molecular, en los últimos años se ha desarrollado la prueba de amplificación isotérmica mediada por Asas (LAMP, por su sigla en inglés “Loop Mediated Isothermal Amplification”), la cual disminuye los

tiempos de obtención de resultados a la vez que requiere de una muy baja infraestructura locativa y tecnológica para su realización. Estas características podrían permitir en un futuro el uso masivo de las pruebas LAMP en instituciones en las que no se cuenta con alta disponibilidad tecnológica y económica^{17,18}.

La revisión sistemática es una metodología conformada por una búsqueda exhaustiva, enfocada en una temática específica y con una técnica definida, de las cuales, a partir de un grupo de publicaciones escogidas con unas características de calidad homogéneas, pueden dar mayor claridad sobre el tema clínico estudiado^{19,20}.

Con base en el concepto anteriormente expuesto, este trabajo pretende hacer una revisión sistemática para exponer las características operativas de las pruebas de qPCR y LAMP en el diagnóstico de TB pulmonar ocasionada por los miembros del complejo *M. tuberculosis*, con miras a establecer la utilidad de la aplicación de las pruebas LAMP en el diagnóstico inicial de la tuberculosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia de búsqueda

Para la búsqueda de artículos se emplearon las bases de datos PubMed, SpringerLink, ScienceDirect, Cochrane y Scielo y se limitó a los artículos publicados entre los años 2005 a 2009 en idiomas inglés y español. Se emplearon los términos de búsqueda: "Tuberculosis", "Molecular Testing", "Polymerase Chain Reaction", "Molecular Diagnostic Techniques", "Real Time PCR" y "Loop Mediated Isothermal Amplification", para las bases de datos en habla inglesa; para el caso de las bases de datos en idioma español, se usaron los siguientes términos: "Tuberculosis", "Pruebas Moleculares", "Reacción en Cadena de la Polimerasa", "Técnicas de Diagnóstico Molecular", "Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles", "Amplificación Isotérmica Mediada por Asas", "Amplificación Isotérmica" y "LAMP".

Como operador booleano se empleó el término AND.

Para este estudio se definen como características operativas, los valores de especificidad, sensibilidad, valores predictivos positivos y negativos con sus respectivos intervalos de confianza al 95%, ya que esta información refleja de forma objetiva la idoneidad de una prueba para ser aplicada en el ámbito clínico²¹.

Selección de estudios

Como TB pulmonar se entiende aquella patología que se desarrolla en los pulmones y, por lo tanto, para su diagnóstico, se emplean muestras originadas en dicho sistema tales como: esputo espontáneo o inducido, lavados broncoalveolares y cepillados bronquiales. Las muestras de tejidos o biopsias de esta área anatómica no fueron consideradas en este estudio, pues es necesario hacer maniobras mucho más invasivas que las requeridas para las muestras incluidas y por lo tanto, el diagnóstico a partir de estos tejidos es poco frecuente porque implica un mayor riesgo para los pacientes. Por esta razón su recolección no es factible en centros de baja complejidad. Los criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos se describen en la tabla 1.

No se incluyeron las publicaciones en las que las técnicas evaluadas (LAMP o PCR) no fueron comparadas contra la prueba de referencia (cultivo en medio sólido). Además, se excluyeron las revisiones de tema en los que no se reportaban datos propios generados por el grupo investigador, estudios donde se evaluaban las técnicas a partir de cepas de referencia o de cepas provenientes de muestras de pacientes (ceparios), o aquellos obtenidos a partir de medios de cultivo sólidos o líquidos.

La selección de los artículos se llevó a cabo por dos revisores independientes con el objeto de disminuir los sesgos de selección, tal y como lo sugieren otros artículos publicados previamente^{9,20,22}.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Estudios de diagnóstico de TB pulmonar empleando al menos una de las pruebas de interés.	Estudios que no evaluaban las pruebas diagnósticas de interés o no publicaban datos suficientes para calcular los estimadores.
Publicaciones entre los años 2005 – 2009.	Ausencia de comparación contra la prueba de referencia.
Publicaciones en idioma inglés o español.	Ausencia de datos estadísticos.
Uso de muestras pulmonares (esputo espontáneo o inducido, lavados broncoalveolares y cepillados bronquiales).	Muestras de tejidos o biopsias (incluso las de origen pulmonar).
	Estudios en los cuales evaluaron las pruebas de laboratorio a partir de cepas obtenidas de cultivos o ceparios.

Recolección de datos

Seleccionados los estudios que cumplían con los criterios de inclusión, se obtuvieron los datos más relevantes para la revisión. Dos evaluadores independientes extrajeron la información correspondiente a autor, año y país de la publicación, técnica evaluada en el estudio, tipo de muestras respiratorias empleadas, sensibilidad y especificidad. Las características operativas de los estudios publicados se corroboraron con el software en-línea “*VassarStats: Website for Statistical Computation*”, del Vassar College de Nueva York, Estados Unidos (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). Los desacuerdos que se presentaron durante la revisión independiente de los dos evaluadores se solucionaron mediante acuerdo entre éstos.

RESULTADOS

Evaluación de la calidad de los estudios

En la búsqueda inicial se identificaron 1 850 referencias que contenían por lo menos uno de los parámetros mencionados en la estrategia diseñada. Luego de revisar todos los títulos de los artículos identificados se eliminaron 1 640 referencias. Posteriormente, se revisaron los

resúmenes de los 210 artículos que quedaron. De éstos, se hizo la revisión del artículo a 25 estudios que cumplieron con los criterios de inclusión (figura 1 - pág. 46).

En la tabla 2 (pág. 47) se describen las principales características de los estudios seleccionados^{6,23-28}.

En la figura 2, se muestran los diversos aspectos evaluados para evidenciar la calidad metodológica de los artículos incluidos y que están descritos para hacer revisiones sistemáticas^{8,21,29}. En términos generales, los estudios tienen una calidad metodológica adecuada y homogénea ya que todos emplean la prueba de referencia para comparar los resultados obtenidos e incluyen controles positivos y negativos en los ensayos realizados para constatar la amplificación adecuada de las secuencias blanco y la ausencia de inhibidores. En todos los casos se describió la metodología empleada. Así mismo, se emplearon técnicas adicionales a la prueba de referencia para corroborar los resultados encontrados, estimaron la sensibilidad y especificidad y registraron las conclusiones con base en sus resultados. El 85.7% (6/7) de los estudios emplearon cepas de referencia como prueba complementaria para la evaluación de la especificidad, y el 28.6% (2/7) evaluaron la homología entre las secuencias

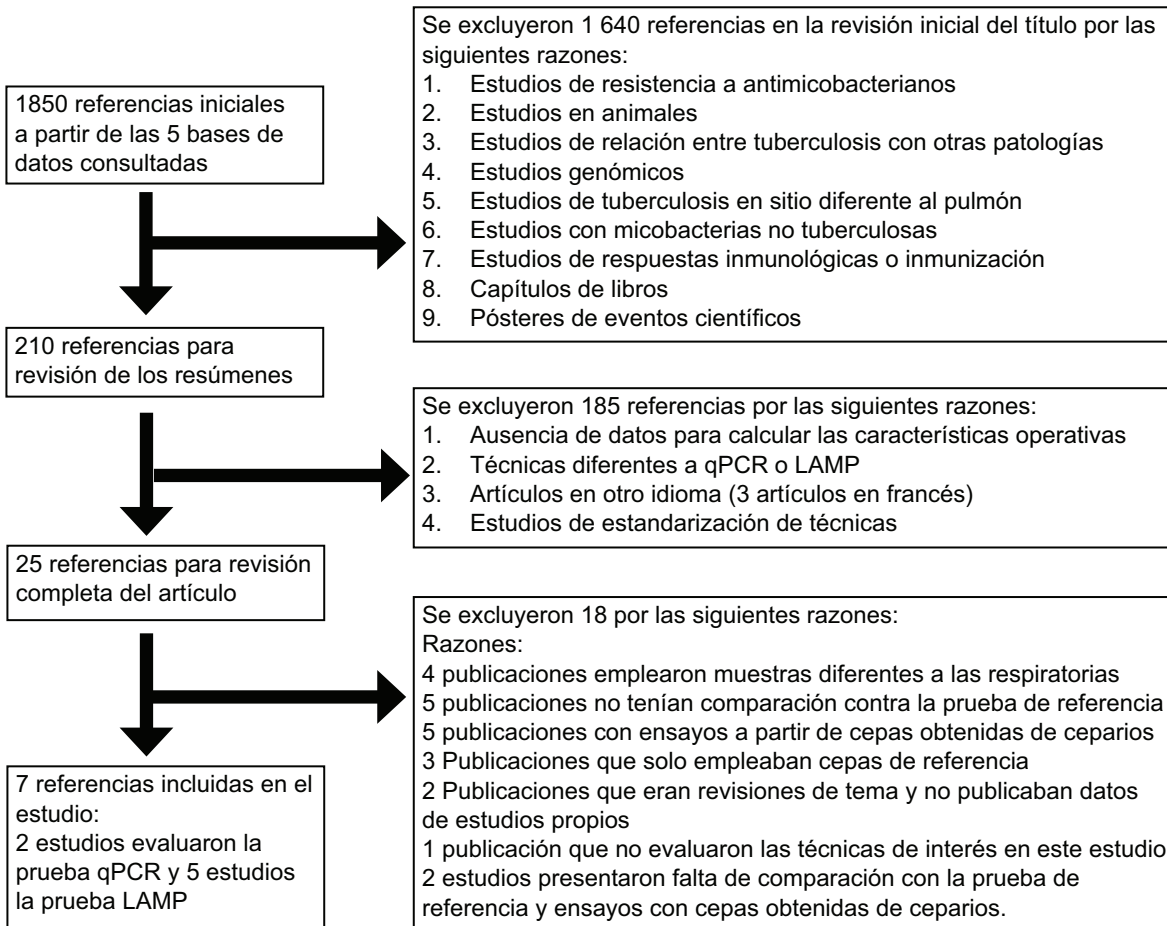


Figura 1. Diagrama de flujo de la selección de publicaciones.



Figura 2. Características metodológicas de los estudios incluidos.

Tabla 2. Principales características de los estudios seleccionados.

Autor	Año	País de origen	Prueba evaluada	Tipo de muestras	Número de muestras	Sensibilidad	Especificidad
Aryan ²³	2009	Irán	LAMP	Esputo	15	100	100
Pandey ⁶	2008	Nepal	LAMP	Esputo	200	100	94.2
Lee ²⁵	2009	Taiwán	LAMP	Esputo	150	94.1	94
Boehme ²⁷	2007	Perú, Japón y Tanzania	LAMP	Esputo	725	97.7	99
Zhu ²⁸	2009	China	LAMP	Esputo y líquido pleural	13	100	100
Pounder ²⁴	2006	Estados Unidos	qPCR	Muestras respiratorias en general	172	86.3	100
Mdivani ²⁶	2009	Georgia	qPCR	Esputo	65	85.2	88.6

* En este estudio sólo se incluyeron pacientes con cultivo positivo y no es factible calcular la especificidad.

obtenidas con la descritas en las bases de datos ya publicadas.

Descripción de los estudios

De las siete publicaciones seleccionadas para la revisión, dos evaluaron la prueba de qPCR y cinco evaluaron la prueba LAMP, ambas para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en muestras respiratorias. El número total de

muestras evaluadas por la metodología qPCR fue de 237 y para LAMP de 1103. En promedio, el número de muestras de pacientes en los estudios fue de 191 por estudio, con un mínimo de 13 muestras y un máximo de 725. En uno de los estudios que evaluaron la prueba LAMP²³ no incluyeron pacientes con cultivo negativo por lo cual no fue factible calcular los valores predictivos positivo y negativo. Todas las publicaciones presentaron los valores obtenidos

Tabla 3. Valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) de las pruebas LAMP y qPCR evaluadas en los estudios incluidos.

Estudio	VPP	IC 95%	VPN	IC 95%
Aryan ²³			--*	
Pandey ⁶	94.1	87.1 – 97.6	100	95.3 – 100
Lee ²⁵	82.1	65.9 – 91.9	98.2	93 – 99.7
Boehme ²⁷	97.7	93.9 – 99.3	95.1	92.7 – 96.7
Zhu ²⁸	100	59.8 – 100	100	46.3 – 100
Pounder ²⁴	100	89.9 – 100	94.5	88.6 – 97.58
Mdivani ²⁶	85.8	78.3 – 91.2	88.1	81.7 – 92.5

* En este estudio sólo se incluyeron pacientes con cultivo positivo y no es factible calcular los valores predictivos.

para sensibilidad y especificidad. En algunos casos se presentaron además los resultados para los valores predictivos positivos y negativos con sus intervalos de confianza (Pounder *et al.*²⁴ y Pandey *et al.*⁶); sin embargo, como todas las publicaciones reportaron el número de muestras evaluadas y sus resultados frente a la prueba de referencia se pudieron confirmar las características operativas de las pruebas.

Precisión global de las pruebas evaluadas

Entendiendo como precisión global de las pruebas el conjunto de resultados de sensibilidad y especificidad, en los estudios que evaluaron las pruebas de qPCR se observa una sensibilidad entre 85.2% – 86.3% y una especificidad entre 88.6% – 100%. Para el

caso de la prueba LAMP, la sensibilidad varía entre 94.1% – 100% y la especificidad entre 94% – 100%. En la figura 3 se presentan los resultados de sensibilidad y especificidad (con su respectivo intervalo de confianza). En la figura puede observarse asimetría entre los diferentes puntos correspondientes a cada estudio.

DISCUSIÓN

Debido al carácter de enfermedad emergente y de los múltiples casos de resistencia a los tratamientos que reporta la literatura científica alrededor del mundo^{5,30-36}, el establecimiento de una prueba diagnóstica lo suficientemente sensible y específica para la obtención de un diagnóstico rápido se convierte en una

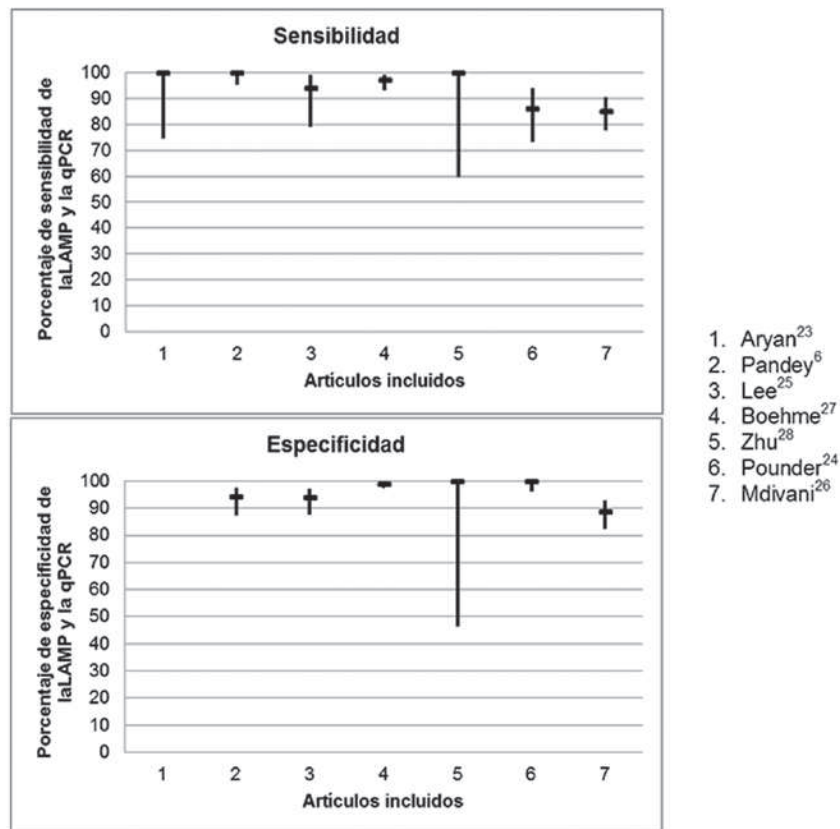


Figura 3. Forest plot para sensibilidad y especificidad con su respectivo intervalo de confianza al 95% de las pruebas LAMP y qPCR evaluadas en los estudios incluidos.

necesidad apremiante para el campo médico. En este estudio se halló una sensibilidad promedio del 85.75% (con un IC 95% que osciló entre 73.12 a 93.84 según los estudios) para la prueba qPCR, y del 98.36% (con un IC 95% que osciló entre 59.77 a 100, de acuerdo con los estudios) para LAMP; y una especificidad promedio de 94.30% y 97.44% para qPCR y LAMP, respectivamente. Se observó además, superioridad en los resultados para valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN) de la prueba LAMP (93.47% y 98.31%, respectivamente) en comparación con la qPCR (92.91% y 91.29%, respectivamente).

Todas las características operativas de la prueba LAMP demuestran su superioridad frente a la qPCR. Con base en estos argumentos es posible sustentar la evaluación de la prueba LAMP para el diagnóstico de la tuberculosis, la cual con sus características de montaje y costos puede convertirse en una herramienta idónea para el diagnóstico y detección de la patología en cuestión en nuestra región.

La qPCR combina la amplificación cíclica de DNA con fluorescencia, lo que permite que no se realicen maniobras adicionales post amplificación, como sucede con la PCR tradicional. A partir de muestras de cultivo, esta técnica tiene una especificidad del 100% y un límite de detección de 10 copias de genoma¹¹. Su rendimiento clínico fue comprobado en diversos estudios^{12,37-43} y dentro del grupo de las pruebas moleculares, es la que tiene mejores características operativas; sin embargo, adolece de algunas desventajas que evitan su generalización en el ámbito clínico, tales como, la necesidad de equipos especializados, áreas físicas diferenciadas para el desarrollo de las pruebas, profesionales que conocen el área de la biología molecular, protocolos de extracción de ácidos nucleicos dispendiosos y con porcentajes de eficiencia muy variables^{12,13,44-52}. Por esto se siguen reportando en la literatura nuevas modificaciones para las técnicas con el objetivo de facilitar su implementación mediante la eliminación o disminución en el impacto de sus desventajas^{4,14,27,53-55}.

Debido al descubrimiento de nuevas enzimas y mecanismos moleculares, en el año 2000 se describió por primera vez la estandarización de la técnica LAMP¹⁷. Esta metodología ofrece múltiples ventajas para su aplicación en el área diagnóstica, tales como: la eficiencia de amplificación de material genético es mayor frente a las demás metodologías moleculares; la realización de todas sus reacciones a la misma temperatura y la posibilidad de evaluar los resultados de forma macroscópica en el mismo tubo de reacción sin la necesidad de procedimientos adicionales; obvian la necesidad de equipos especiales y de espacios separados. Además, por su simplicidad en el proceso, no requiere de personal con experiencia en técnicas moleculares para su montaje. Estas ventajas han llevado a que en los últimos años se haya ensayado su aplicación para el diagnóstico de múltiples patologías⁵⁶⁻⁶⁷.

Para el caso puntual de tuberculosis, el empleo de esta técnica, cuya superioridad frente a la qPCR se demuestra según la estadística registrada, se perfila como una poderosa herramienta que puede mejorar la oportunidad en el diagnóstico gracias a la rapidez de sus resultados, permite su implementación en zonas de bajas condiciones locativas, las cuales generalmente son aquellas donde un gran número de casos se dejan de diagnosticar por falta de ofrecimiento de la prueba o por pérdida de los pacientes debido a la demora en los resultados. Aunque no fue el interés de este estudio revisar las metodologías de preparación de las muestras, es importante resaltar que, en la mayoría de ellos, la preparación era simple y rápida ya que solamente se usaba el método de extracción por calor (en inglés "*boiling method*"), lo cual confiere más facilidad para su desarrollo con requerimientos mínimos y, por lo tanto, incide en la disminución de los costos necesarios para su implementación.

Esta revisión sistemática tiene varias fortalezas. El empleo de bases de datos de alto impacto, consulta y cobertura que fueron empleadas para la búsqueda, nos permitieron la obtención

de un alto número de estudios en el ámbito mundial. La inclusión de 2 revisores brindó mayor objetividad para la inclusión y exclusión de estudios de forma independiente con base en las características de cada publicación analizada, además de la verificación por parte de éstos, de todas las características operativas expuestas en cada uno de los estudios.

Existen también varias limitaciones tales como la inclusión solamente de publicaciones en idioma inglés y español, lo cual puede contribuir a sesgos de publicación porque puede haber publicaciones relevantes en idiomas diferentes a los incluidos en esta revisión. La falta de análisis económico puede considerarse como otro limitante por la variabilidad de costos registrada en las publicaciones y que, por lo tanto, no pueden ser aplicados en el contexto local.

Los hallazgos expuestos deben ser interpretados con las limitantes de cada estudio en cuanto a número de pacientes, localización geográfica y variabilidad estadística se refiere; sin embargo, sirven como base para el establecimiento de propuestas tendientes a la evaluación de la prueba en el ámbito regional que puedan llevar a dilucidar los factores no cubiertos en esta publicación.

En conclusión y basados en los hallazgos expuestos, esta prueba diagnóstica cuenta con los elementos necesarios para impactar en el diagnóstico preciso de la enfermedad, lo que, indirectamente, podría incidir en la disminución de la transmisión de la enfermedad, puesto que permite la oportunidad en la obtención de resultados y las características operativas que le brindan confiabilidad de dichos resultados. Además, se abre la posibilidad de instaurar pruebas moleculares en centros de atención básicos, en los que, para las pruebas moleculares existentes en este momento, no es posible su aplicación por los altos costos locativos y profesionales que exigen, caso contrario de las pruebas LAMP. Las características operativas muestran resultados adecuados y, por esta razón, es necesario establecer estudios que evalúen el aspecto económico en zonas de altos

índices de la patología y con bajos recursos, para corroborar desde el punto de vista económico el rendimiento de la técnica, la cual, acompañada de sus virtudes diagnósticas, puede servir de argumento para su uso generalizado e incluso para su cobertura por parte de los sistemas de salud nacionales en los que se haga necesario el diagnóstico.

Además, resulta apropiado explorar el rendimiento de la prueba para diagnósticos de formas extrapulmonares de la enfermedad, tales como la meningitis tuberculosa, donde la oportunidad en la obtención de resultados es aún más crítica pues esta prueba podría incidir en la disminución de las tasas de mortalidad por dichas formas.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. WHO. Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing: WHO report 2007. Geneva: WHO; 2007.
2. Pai M, Flores L, Pai N, Hubbard A, Riley L, Colford JJ. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2003 Oct;3(10):633-43.
3. Palomino J. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J*. 2005 Aug;26(2):339-50.
4. Williams K, Ling C, Jenkins C, Gillespie S, McHugh T. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. *J Med Microbiol*. 2007 May;56(Pt 5):598-602.
5. Tobler N, Pfunder M, Herzog K, Frey J, Altwegg M. Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-microarray. *J Microbiol Methods*. 2006 Jul;66(1):116-24.
6. Pandey B, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y, *et al*. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum

- samples of Nepalese patients. *J Med Microbiol.* 2008 Apr;57(Pt 4):439-43.
7. Burggraf S, Reischl U, Malik N, Bollwein M, Naumann L, Olgemöller B. Comparison of an internally controlled, large-volume LightCycler assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples with the COBAS AMPLICOR assay. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr;43(4):1564-9.
 8. Ling D, Flores L, Riley L, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One.* 2008;3(2):e1536.
 9. Drouillon V, Lagrange P, Herrmann J. Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis by automated extraction and real-time PCR on non-decontaminated pulmonary specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Apr;26(4):291-3.
 10. Quan C, Lu C, Qiao J, Xiao B, Li X. Comparative evaluation of early diagnosis of tuberculous meningitis by different assays. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3160-6.
 11. Bhigjee A, Padayachee R, Paruk H, Hallwirth-Pillay K, Marais S, Connolly C. Diagnosis of tuberculous meningitis: clinical and laboratory parameters. *Int J Infect Dis.* 2007 Jul;11(4):348-54.
 12. Parashar D, Chauhan D, Sharma V, Katoch V. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res.* 2006 Oct;124(4):385-98.
 13. Leung K, Yip C, Cheung W, Lo A, Ko W, Kam K. Development of a simple and low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered mycobacteria in a high throughput laboratory. *J Appl Microbiol.* 2009 Nov;107(5):1433-9.
 14. Flores E, Rodríguez J, García-Pachón E, Soto J, Ruiz M, Escribano I, *et al.* Real-time PCR with internal amplification control for detecting tuberculosis: method design and validation. *APMIS.* 2009 Aug;117(8):592-7.
 15. Savelkoul P, Catsburg A, Mulder S, Oostendorp L, Schirm J, Wilke H, *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *J Microbiol Methods.* 2006 Jul;66(1):177-80.
 16. Ortu S, Molicotti P, Sechi L, Pirina P, Saba F, Vertuccio C, *et al.* Rapid detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Real Time PCR and Bactec 960 MIGT. *New Microbiol.* 2006 Jan;29(1):75-80.
 17. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun;28(12):E63.
 18. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2616-22.
 19. Pai M, McCulloch M, Enanoria W, Colford JJ. Systematic reviews of diagnostic test evaluations: What's behind the scenes? *ACP J Club.* 141(1):A11-3.
 20. Pai M, McCulloch M, Gorman J, Pai N, Enanoria W, Kennedy G, *et al.* Systematic reviews and meta-analyses: an illustrated, step-by-step guide. *Natl Med J India.* 17(2):86-95.
 21. Weinstein S, Obuchowski N, Lieber M. Clinical evaluation of diagnostic tests. *AJR Am J Roentgenol.* 2005 Jan;184(1):14-9.
 22. Steingart K, Henry M, Laal S, Hopewell P, Ramsay A, Menzies D, *et al.* A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Postgrad Med J.* 2007 Nov;83(985):705-12.
 23. Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P, Mousavi S, *et al.* A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol Res.* 2010 Mar 31;165(3):211-20.
 24. Pounder J, Aldous W, Woods G. Comparison of real-time polymerase chain reaction using the Smart Cycler and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *M. tuberculosis* complex in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006 Mar;54(3):217-22.
 25. Lee M, Chen Y, Peng C. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2009 Feb;76(2):174-80.
 26. Mdivani N, Li H, Akhalaia M, Gegia M, Goginashvili L, Kernodle D, *et al.* Monitoring therapeutic efficacy by real-time detection of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA in sputum. *Clin Chem.* 2009 Sep;55(9):1694-700.
 27. Boehme C, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M, *et al.* Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):1936-40.
 28. Zhu R, Zhang K, Zhao M, Liu Y, Xu Y, Ju C, *et al.* Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *J Microbiol Methods.* 2009 Sep;78(3):339-43.
 29. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, *et al.* Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Dec;4(12 Suppl):S20-32.
 30. Wallace R, Kammerer J, Iademarco M, Althomsons S, Winston C, Navin T. Increasing proportions of advanced pulmonary tuberculosis reported in the United States: are delays in diagnosis on the rise? *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Nov;180(10):1016-22.

31. Knechel N. Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit Care Nurse*. 2009 Apr;29(2):34-43; quiz 4.
32. Zhou Y, Khan K, Feng Z, Wu J. Projection of tuberculosis incidence with increasing immigration trends. *J Theor Biol*. 2008 Sep;254(2):215-28.
33. Dowdy D, Chaisson R. The persistence of tuberculosis in the age of DOTS: reassessing the effect of case detection. *Bull World Health Organ*. 2009 Apr;87(4):296-304.
34. Pesut D, Gledović Z, Grgurević A, Nagorni-Obradović L, Adzić T. Tuberculosis incidence in elderly in Serbia: key trends in socioeconomic transition. *Croat Med J*. 2008 Dec;49(6):807-12.
35. Abubakar I, Welfare R, Moore J, Watson J. Surveillance of air-travel-related tuberculosis incidents, England and Wales: 2007-2008. *Euro Surveill*. 2008 Jun 5;13(23). pii: 18896
36. Crofts J, Gelb D, Andrews N, Delpech V, Watson J, Abubakar I. Investigating tuberculosis trends in England. *Public Health*. 2008 Dec;122(12):1302-10.
37. Agudelo CA, Builes LN, Hernández M, Robledo J. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. *Iatreia*. 2008;21(3):321 - 32.
38. Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol*. 2009 Mar;47(3):569-76.
39. Salina T, Morozova T. [Real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis]. *Probl Tuberk Bolezn Legk*. 2008(6):12-4.
40. Fend F, Langer R, Hann von Weyhern C, Schulz S, Miethke T. [Molecular diagnosis of mycobacterial infections]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2007;91:135-9.
41. Kibiki G, Mulder B, van der Ven A, Sam N, Boeree M, van der Zanden A, *et al*. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. *Trop Med Int Health*. 2007 Oct;12(10):1210-7.
42. Barken K, Haagensen J, Tolker-Nielsen T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clin Chim Acta*. 2007 Sep;384(1-2):1-11.
43. Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *J Clin Microbiol*. 2006 Mar;44(3):1029-39.
44. Takahashi T, Tamura M, Asami Y, Kitamura E, Saito K, Suzuki T, *et al*. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: development and methodology. *J Clin Microbiol*. 2008 May;46(5):1708-15.
45. Arya M, Shergill I, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel H. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005 Mar;5(2):209-19.
46. Yonemaru M, Horiba M, Tada A, Nagai T. [Evaluation of COBAS TaqMan: a real-time PCR-based diagnostic kit for mycobacteria]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2009 Dec;47(12):1070-6.
47. Zhou Y, Li H, Li Q, Zheng H, Zhang R, Chen G, *et al*. Differentiation of sarcoidosis from tuberculosis using real-time PCR assay for the detection and quantification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2008 Dec;25(2):93-9.
48. Richardson E, Samson D, Banaei N. Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria by multiplex, real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2009 May;47(5):1497-502.
49. Foongladda S, Pholwat S, Eampokalap B, Kiratisin P, Sutthent R. Multi-probe real-time PCR identification of common *Mycobacterium* species in blood culture broth. *J Mol Diagn*. 2009 Jan;11(1):42-8.
50. Ishmael F, Stellato C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Oct;101(4):437-43.
51. Hue-Roye K, Vege S. Principles of PCR-based assays. *Immunohematology*. 2008;24(4):170-5.
52. Lim S, Kim B, Lee M, Kim K. Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of *Mycobacterium* species. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Jan;46(1):101-6.
53. Restrepo B, Gomez D, Shipley G, McCormick J, Fisher-Hoch S. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. *J Microbiol Methods*. 2006 Nov;67(2):220-9.
54. Baba K, Pathak S, Sviland L, Langeland N, Hoosen A, Asjo B, *et al*. Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. *Diagn Mol Pathol*. 2008 Jun;17(2):112-7.
55. Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Herránz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, Bouza E, *et al*. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol*. 2008;8:34.
56. Lucas S, da Luz Martins M, Flores O, Meyer W, Spencer-Martins I, Inácio J. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* varieties and *Cryptococcus gattii* using CAP59-based loop-mediated isothermal DNA amplification. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jun;16(6):711-4.
57. Watanabe D, Kuhara T, Ishida N, Takama H, Tamada Y, Matsumoto Y. Herpes zoster of the nipple: rapid DNA-based diagnosis by the loop-mediated

- isothermal amplification method. *Int J STD AIDS*. 2010 Jan;21(1):66-7.
58. Arita M, Ling H, Yan D, Nishimura Y, Yoshida H, Wakita T, *et al*. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases. *BMC Infect Dis*. 2009;9:208.
59. Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, Nakaguchi Y, Nishibuchi M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Feb;76(3):820-8
60. James H, Ebert K, McGonigle R, Reid S, Boonham N, Tomlinson J, *et al*. Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 2010 Mar;164(1-2):68-74.
61. Yin S, Shang Y, Zhou G, Tian H, Liu Y, Cai X, *et al*. Development and evaluation of rapid detection of classical swine fever virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Biotechnol*. 2010 Apr 15;146(4):147-50.
62. Srisuk C, Chaivisuthangkura P, Rukpratanporn S, Longyant S, Sridulyakul P, Sithigorngul P. Rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification targeted to the gene of outer membrane protein *ompW*. *Lett Appl Microbiol*. 2010 Jan;50(1):36-42.
63. Chen J, Lu F, Lim C, Kim J, Ahn H, Suh I, *et al*. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Trop*. 2010 Jan;113(1):61-5.
64. Okamura M, Ohba Y, Kikuchi S, Takehara K, Ikedo M, Kojima T, *et al*. Rapid, sensitive, and specific detection of the O4 group of *Salmonella enterica* by loop-mediated isothermal amplification. *Avian Dis*. 2009 Jun;53(2):216-21.
65. Li Q, Yue Z, Liu H, Liang C, Zheng X, Zhao Y, *et al*. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of lymphocystis disease virus. *J Virol Methods*. 2010 Feb;163(2):378-84.
66. Liu Y, Chuang C, Chen W. In situ reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (in situ RT-LAMP) for detection of Japanese encephalitis viral RNA in host cells. *J Clin Virol*. 2009 Sep;46(1):49-54.
67. Xu J, Rong R, Zhang H, Shi C, Zhu X, Xia C. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol*. 2010 Mar 1;40(3):327-31.