

# Detección de *Mycobacteria* en muestras de expectoración, mediante amplificación del marcador rADN16S por la reacción en cadena de la polimerasa

Roberto Zenteno,\* Laura González,\* Aremy Cuéllar,\*\* Aurora Parissi,\*\* Javier Fuentes\*\*\*

## RESUMEN

La dinámica de la tuberculosis en México y el mundo, está forzando a replantear los procedimientos actuales contra esta enfermedad, estableciendo un énfasis particular en el diagnóstico. En este sentido, el diagnóstico molecular por amplificación de genes de *Mycobacteria* por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), se ubica como una excelente herramienta, y está siendo empleada con éxito en países con alta y mediana prevalencia. El objetivo del presente trabajo es evaluar la utilidad del diagnóstico de tuberculosis mediante la técnica de RCP, amplificando el marcador rADN16S, a partir de muestras clínicas de pacientes con sospecha de tuberculosis. Los resultados muestran que de las 107 muestras clínicas analizadas, 36 fueron positivas a RCP y 37 a baciloscopia, la sensibilidad y especificidad del procedimiento fue del 80 y 90% respectivamente, y el valor predictivo positivo y negativo fue del 80 y 88%, el tiempo promedio para desarrollar el análisis fue 16 h. A pesar de que se trata de un estudio preliminar, nuestros resultados nos permiten proponer el uso de este rápido y confiable sistema de diagnóstico como una herramienta importante en contra de la tuberculosis (TB).

**Palabras clave:** Tuberculosis, diagnóstico, RCP.

## ABSTRACT

*Tuberculosis dynamic in Mexico and the world is forcing to readdress the procedures against this disease. In this sense the molecular diagnosis by the acid nucleic amplification from *Mycobacteria* by the polymerase chain reaction, is been pointing as a technique with certain success in countries with medium and high prevalence of the disease. So the main goal of this work is to evaluate utility of the diagnostic of tuberculosis by the PCR technique, amplifying the rDNA16s marker, from sputum samples from patients with suspicious of tuberculosis. The results show that from 107 clinical samples analyzed, 36 were positive to PCR and 37 were acid fast bacilli smear, the sensibility and specificity of the procedure were 80 and 90% respectively and the positive and negative predictive value was 80 and 88%, the average time for the development of the procedure was 16 hrs. Despite that this is a preliminary study, our results let us to claim the utility of this fast and confidence diagnostic procedure, as an important tool against TB.*

**Key words:** Tuberculosis, diagnostic, PCR.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, responsable de 8 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes cada año, por lo que se conside-

ra un serio problema de salud y es después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la malaria, la enfermedad infectocontagiosa con mayor impacto para la salud pública.<sup>1</sup> Su asociación con el VIH, la diabetes, la desnutrición y la aparición de cepas dro-

\* Laboratorio de Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana.

\*\* Laboratorio Estatal de Salud Pública, Servicios de Salud del Estado de Veracruz.

\*\*\* Programa Estatal de Mycobacteriosis, Servicios de Salud del Estado de Veracruz.

### Correspondencia:

Dr. Roberto Zenteno. Laboratorio de Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública/UV, Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, 91190 Xalapa Ver., México. Fax. (228) 8418935

E-mail: rzenteno@uv.mx

R. Zenteno recibió apoyo de PROMEP 103.5/02/2373 y POA-ISP-UV 2005-2006.

Recibido: 30-07-2007

Aceptado: 15-01-2008

gorresistentes, multidrogorresistentes (MDR) y más recientemente multidrogorresistentes extremas (X-MDR), están configurando un escenario poco alentador y obligando a las autoridades sanitarias de todos los niveles a replantear las estrategias epidemiológicas y operativas en contra de esta enfermedad.<sup>1-3</sup>

Está bien demostrado que los únicos procedimientos efectivos para disminuir la prevalencia y la drogorresistencia de TB son: el diagnóstico oportuno, un sistema eficiente de registro y seguimiento tanto del paciente como de sus contactos y la aplicación de campañas de promoción de salud con énfasis en la prevención.<sup>1</sup> Actualmente el diagnóstico de TB se fundamenta en tecnologías que han sido usadas desde hace más de 70 años.<sup>1,2,4</sup> El examen microscópico de una expectoración preparada mediante la técnica de Ziehl-Neelsen, se considera como el estándar de oro dentro de los programas de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) en países de bajos recursos y alta incidencia de la enfermedad, debido a que es barata, fácil de realizar y los resultados se obtienen rápidamente; sin embargo requiere de varias muestras, las cuales deben ser colectadas en días consecutivos, lo cual la convierte en un procedimiento lento y de difícil apego por parte del paciente; sin embargo el principal problema radica en su baja sensibilidad, 50-70%, y al hecho de que el 30-40% de los casos nuevos de TB detectados cada año son bacilos cópicos negativos o infecciones extrapulmonares.<sup>5</sup> El cultivo bacteriano en medio sólido o líquido es la prueba más confiable, debido a sus altos niveles de sensibilidad y especificidad, sin embargo es laborioso y de poca utilidad clínica debido a que requiere de 6 a 8 semanas para lograr el máximo de especificidad, por lo que se emplea únicamente para confirmar un diagnóstico presuntivo o como un análisis previo para determinar drogorresistencia. Finalmente el cultivo líquido radiométrico (BACTEC), requiere un promedio de 13 días para dar positividad, posee una sensibilidad y especificidad superiores al 90%, y se emplea predominantemente para diagnóstico de drogorresistencia; sin embargo sus principales inconvenientes radican en los altos costos de los reactivos y mantenimiento del equipo; requiere de personal altamente capacitado y presenta una serie de dificultades para el manejo final de los desechos radiactivos, instalándose entonces como un sistema que dificulta la toma de decisiones operativas en salud pública.<sup>2,4</sup>

La Organización Mundial de la Salud ha hecho un llamado a las naciones con altas y medianas prevalencias de TB para desarrollar nuevos y propios procedimientos diagnósticos de TB, con alta sensibilidad,

especificidad, rápidos, útiles en cualquier tipo de muestra biológica y económicamente asequibles, de manera que pudieran emplearse sin restricciones en sus programas de TB.<sup>1</sup> En respuesta, los últimos 10 años han testificado el desarrollo de varios métodos moleculares que permiten diagnosticar *Mycobacterias* prácticamente en cualquier tipo de muestra clínica.<sup>4,6</sup> La amplificación de marcadores genéticos específicos de *Mycobacterium*, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), a partir de ADN o ARN aislado de la muestra clínica, es uno de los más conocidos, ampliamente evaluado y en muchos países clínicamente aceptado.<sup>6-9</sup>

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), México se ubica dentro de los países con mayores prevalencias de TB en Latinoamérica, antecedido por Haití, Brasil y Perú;<sup>10</sup> de acuerdo a la Secretaría de Salud, el comportamiento de la tuberculosis en los últimos años en México ha obedecido a una disminución de su mortalidad y estacionamiento de su morbilidad; el sistema nacional de vigilancia epidemiológica para el año 2006 reportó 15,484 casos, con una prevalencia de 14.1 por 100 mil habitantes, y como los tres primeros contribuyentes a los estados de Veracruz, Baja California y Guerrero, con 1,905 (12%), 1,387 (8.9%) y 1,107 casos (7.14%).<sup>11</sup>

El comportamiento de la tuberculosis y los nuevos factores asociados están obligando a desarrollar nuevos procedimientos diagnósticos que permitan dar un nuevo abordaje a la enfermedad, por lo que el objetivo de este trabajo es describir y evaluar la utilidad de un sistema de diagnóstico de TB mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa del marcador rADN16S, a partir de especies clínicas de expectoración.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Recolección, descontaminación y tinción de muestras clínicas

El esputo de pacientes con sospechas clínicas de TB, definida por una tos de 3 semanas de duración y/o hemoptisis, fueron colectadas en diversas clínicas del sector salud y el laboratorio estatal de salud pública de los servicios de salud de Veracruz. Se descontaminaron mediante la técnica de N-acetil-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH). Los procedimientos de concentración y manejo de las muestras se realizaron de acuerdo a las normas nacionales.<sup>12</sup> La baciloscopia (BA) se realizó de acuerdo a la técnica de Ziehl-Nielsen (ZN).

## Extracción de ADN de los especímenes clínicos

El botón proveniente del centrifugado de cada una de las tres expectoraciones, provenientes del mismo paciente se resuspendió con 500  $\mu$ L del amortiguador TE (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA pH8.0) (Sigma, St. Louis MO, EU), en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Las muestras fueron calentadas 20 min a 95 °C, posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL) (Sigma, St. Louis MO, EU) e incubó 1.5 h a 37 °C, finalmente se agregaron 70  $\mu$ L de SDS (10%) y 6  $\mu$ L de proteinasa K (10 mg/mL) (Sigma, St. Louis MO, EU) y se incubó 10 min a 37 °C. Posteriormente se incorporaron 100  $\mu$ L de NaCl (5M) y 80  $\mu$ L de bromuro de acetiltrimetilamonio/cloruro de sodio, CTAB / NaCl (0.2 M / 0.7 M) (Sigma, St. Louis MO, EU) e incubó la mezcla 10 min a 65 °C. A continuación se agregaron 700  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) (Sigma, St. Louis MO, EU), se incubó 10 s y centrifugó a 10 min a 13,000 rpm a 20 °C en una centrífuga refrigerada (Beckman Coulter, California, EU). La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el ADN se precipitó mediante la adición de 0.6 volumen de isopropanol (Sigma, St. Louis MO, EU). Se conservó toda la noche a -20 °C, posteriormente el ADN se colectó por centrifugación a 16,000 rpm, 10 °C, en una centrífuga refrigerada (Beckman Coulter, California, EU), el botón se lavó en dos ocasiones con etanol, se resuspendió finalmente con 100  $\mu$ L de TE y se almacenó a -20 °C hasta su empleo.

## Diseño de los iniciadores y amplificación del marcador rADN16S

A partir del análisis de la región conservada entre las especies de mycobacterias del marcador rADN16S (número de acceso en nucleótido-Entrez: X58890), y ayudados por el programa de análisis de *DNA MB Advanced V. 6.8*.<sup>13</sup> Se identificaron los iniciadores r16S1 (5' TTAACACATGCAAGTCGAACG3') y r16S2 (5' CACCAGGAATTCCAGTCTC C 3'), se calculó que el producto resultante tendría un peso aproximado de 675pb. La mezcla de reacción consistió de 50  $\mu$ L de la solución de ADN obtenida en el paso anterior, 0.5  $\mu$ M de r16S1 y r16S2, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPS, 10  $\mu$ L de amortiguador de reacción 10X, 1 U Taq ADN polimerasa (Promega Corp. Madison, EU) y agua tridestilada estéril hasta ajustar un volumen de 100  $\mu$ L. En todos los ensayos se realizó una prueba con un control negativo, sin ADN, y un control positivo, utilizando ADN de *M. tuberculosis H37Rv*. La amplificación se realizó en un termociclador PTC-

2000 (MJ-research, Watertown, Ma, EU), de acuerdo a las siguientes condiciones: 1.5 min a 94 °C seguido por 25 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min. a 60 °C, y 2 min a 72 °C, con un tiempo de extensión final de 4 min a 72 °C. Todo el manejo tanto de las muestras como del RCP fueron realizados en campana de bioseguridad (Telstar Bio-II-A, Barcelona, España) y gabinete de RCP (Labconco, Missouri, EU), aplicando luz UV en el área de trabajo, antes y después de cada sesión, se emplearon pipetas descontaminadas y puntas únicas con filtro para prevenir contaminación cruzada. Cada muestra clínica fue analizada por triplicado, dos ensayos positivos clasificaban a la muestra como positiva. Los productos de RCP obtenidos fueron almacenados a -20 °C.

## Cobertura de especie de los iniciadores

Las especies de mycobacteria *M. smegmatis*, *M. bovis AN5*, *M. avium*, *M. africanum* y *M. tuberculosis H37Rv*, fueron empleadas para determinar la cobertura de amplificación del género de mycobacteria, la especificidad del ensayo y de los iniciadores. Todas las bacterias se cultivaron por 6 semanas en medio sólido Lowenstein-Jensen y a partir de una asada de bacteria cultivada se extrajo el ADN, de acuerdo al procedimiento descrito previamente. De igual manera se obtuvo el ADN de las especies *E. coli*, *S. aureus* y humano a partir de linfocitos humanos de sangre periférica. La amplificación del marcador rADN16S en todos los casos se realizó de acuerdo a como se describió anteriormente.

## Sensibilidad de los iniciadores

*M. tuberculosis H37Rv* cultivada por 4 semanas en 100 mL de medio Proskauer-Beck-Youmans (PBY) se concentró por centrifugación. El botón se resuspendió en 500  $\mu$ L de amortiguador TE en un tubo eppendorf de 2 mL, y se extrajo el ADN como se describió previamente, la concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000, Nanodrop Technologies, Delawer, EU) y a partir de la concentración inicial se realizó una doble dilución seriada, con este ADN se realizó la amplificación del marcador rADN16S como se describió previamente.

## Detección de productos de RCP

Por medio de electroforesis en agarosa al 1.5% con 0.5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio, se evidenciaron los amplicones del marcador rADN16S, el peso teórico calcula-

do fue de  $\pm 675$  pb, se emplearon como marcadores de peso molecular estándares de 100 pb (In vitrogen, California, EU), y se utilizó un fotodocumentador Gel-Doc (Gel-Doc XR system, Bio-Rad, California, EU), para la visualización de los productos.

### Análisis estadístico

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las muestras clínicas analizadas por RCP se determinó de acuerdo a Galen y Gambino,<sup>14</sup> utilizando la BA como el estándar de referencia.

## RESULTADOS

### Baciloscopia, descontaminación, extracción de ADN y amplificación del marcador rADN16S

Un total de 107 muestras de esputo descontaminadas provenientes de 40 pacientes con sospechas de TB, se diagnosticaron con la técnica de ZN y posteriormente se aplicó la técnica de RCP, teniendo entonces que de 35 especímenes BA positivos, 28 (80%) mostraron, por electroforesis en gel de agarosa, la presencia de un amplicón con un peso aproximado de  $\pm 600$  pb (Figura 1), sólo en 7 (20%) muestras no se observó esta banda; de 72 muestras BA negativas sólo 8 (11%) mostraron un amplicón y 64 no (Cuadro I). La sensibilidad y especificidad calculadas para la RCP a partir de los resultados anteriores y tomando la BA como estándar de referencia, fueron del 80% y 90% respectivamente y el valor predictivo positivo y negativo fueron del 80 y 88%.

### Amplitud de cobertura de los iniciadores

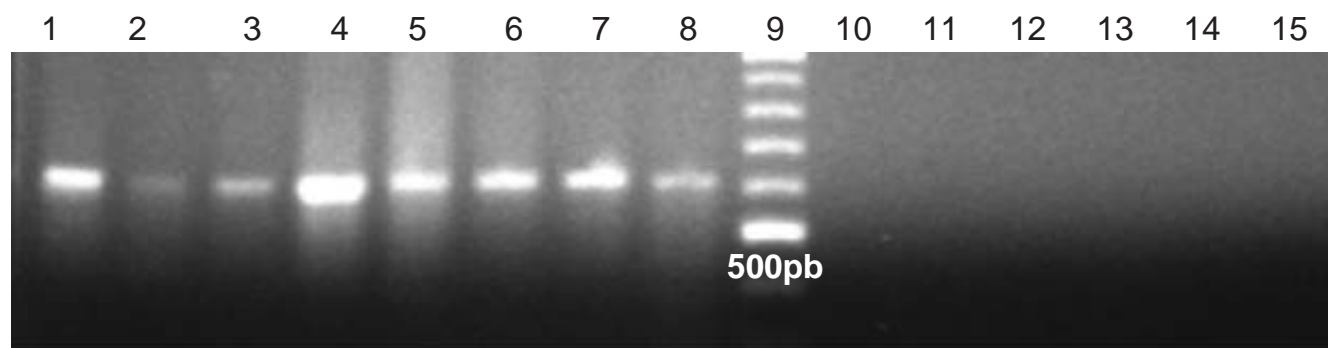
La amplificación del marcador rADN16S, mediante los iniciadores r16s1 y r16s2 identificados, a partir del ADN proveniente de mycobacterias pertenecientes al complejo mycobacterium (MTC); *M. bovis* AN5, *M. africanum* y *M. tuberculosis* H37Rv; y de micobacterias no pertenecientes al complejo (MOT); *M. smegmatis* y *M. avium*, fue positiva en todos los casos, se presentó un amplicón de  $\pm 600$  pb; no se observaron productos de amplificación en ADN provenientes de otras especies como *E. coli*, *S. aureus* y linfocitos humanos.

### Sensibilidad de la reacción de amplificación

La sensibilidad del procedimiento de amplificación se analizó a partir de diluciones de ADN proveniente de *M. tuberculosis* H37Rv, la concentración inicial fue de 525 ng, seguida por una doble dilución, teniendo entonces, 253 ng, 175 ng, 87 ng, 42 ng, 17 ng, 7 ng y finalmente 1.5 ng; todas las diluciones mostraron la presencia de un amplicón de  $\pm 600$  pb. Lo anterior significa que los iniciadores r16s1 y r16s2, son capaces de detectar concentraciones bajas de ADN y amplificar un producto con un rendimiento tal que puede ser detectable en un gel de agarosa.

## DISCUSIÓN

Los esfuerzos actuales para el control de tuberculosis están fundamentados entre otros aspectos por el diagnóstico del caso seguido por un tratamiento acor-



**Figura 1.** Amplificación del marcador rADN16 con los iniciadores r16s1 y r16s2; carril 1, producto de amplificación de *M. tuberculosis* H37Rv (control de amplificación +); carril 2, producto de amplificación de *M. avium*; Carril 3, producto de amplificación de *M. bovis* HN5; carril 4, producto de amplificación de *M. africanum*; carriles 5-8, amplificación positiva del marcador rADN16S a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes con BA positiva; carril 9, Marcador de peso molecular (Promega); carriles 10-11, amplificación negativa de muestras clínicas provenientes de pacientes con BA negativa; carriles 12-14, amplificación negativa a partir de muestras de ADN de *E. coli*, *S. aureus* y linfocitos humanos; carril 15, control de reactivos (Sin ADN).



**Cuadro I.** Resultados de RCP y baciloscopias en las 107 muestras estudiadas.

Prueba realizada	Baciloscopia (+)	Baciloscopia (-)	Total
RCP (+)	28	8	36
RCP (-)	7	64	71
Total	35	72	107

tado estrictamente supervisado (TAES o DOTS).<sup>1</sup> Esto ubica al diagnóstico como un factor importante, que debe ser desarrollado temprana, rápida y eficientemente con la finalidad de evitar la transmisión de la enfermedad.

En este trabajo identificamos un par de iniciadores r16s1 y r16s2 con los cuales se desarrolló un método de diagnóstico molecular de TB, basado en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del marcador de ADN rADN16S. La sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos obtenidos fueron iguales o superiores al 80%, comparables con lo reportado para el mismo y diferentes marcadores en otros países con mediana y baja prevalencia de la enfermedad.<sup>15-19</sup> El principal factor que afectó la sensibilidad del procedimiento fue la obtención de un amplicón en 8 muestras BA negativas; esto podría deberse a que el paciente se encontraba en las fases iniciales de la infección y que su carga bacteriana no es detectable por la BA; por otro lado, es un hecho bien establecido que el 30-40% de los casos de tuberculosis pulmonar son BA negativos.<sup>5</sup> Esta propiedad representa una ventaja del procedimiento molecular sobre la BA, ya que nos permitirá identificar infecciones extrapulmonares y/o pulmonares en etapas iniciales de desarrollo. Por otro lado, identificamos 7 BA positivas que no mostraron el amplicón, este fenómeno de falsos negativos en la amplificación se ha descrito por varios autores como la principal desventaja del procedimiento y las causas para explicarlo van desde fallas técnicas para la colecta de muestras, una mala descontaminación, errores en la extracción del ADN de la muestra, hasta la presencia de inhibidores de la enzima Taq polimerasa,<sup>18-20</sup> sin embargo, se pueden resolver fácilmente mediante la obtención de ADN a partir de una muestra de expectoración fresca del mismo paciente.

A pesar de lo anterior dentro de las principales ventajas demostradas con los iniciadores r16S1 y r16S2, para el marcador rADN16S tenemos que: 1) son altamente específicos, se produce un solo amplicón de  $\pm 600$  pb en todas las mycobacterias, independientemente si pertenecen o no al complejo mycobac-

teria, no observamos productos de amplificación en muestras de ADN proveniente de linfocitos humanos y bacterias gram positiva y negativa, resultados similares se han descrito con otros iniciadores para el mismo marcador, lo cual lo ubica como un marcador confiable.<sup>18</sup> Estas propiedades serían de mucha ayuda para identificar en poblaciones de alto riesgo, mycobacterias atípicas difíciles de diagnosticar con los procedimientos tradicionales tales como *M. avium* en pacientes con VIH/SIDA<sup>21</sup> y *M. bovis* en trabajadores de campo que manejan ganado infectado.<sup>12</sup> 2) La sensibilidad de este método molecular de diagnóstico es alta, debido a que se pueden generar y detectar amplicones observables en un gel de agarosa, con 1.7 ng de ADN, el equivalente al ADN contenido en 100 bacterias en una muestra. Inclusive sería posible lograr una mayor sensibilidad empleando pruebas de hibridación de ADN o alguna otra técnica similar. 3) Reducción del tiempo de diagnóstico, el tiempo promedio calculado desde la obtención de la muestra, descontaminación, extracción de ADN, ejecución de la RCP, electroforesis, y el resultado final fue de 16 h, es decir dos jornadas laborales de un técnico laboratorista bien capacitado, el cual podría manejar hasta 30 muestras por día.

Hasta donde tenemos conocimiento, todos los procedimientos de diagnóstico molecular basados en amplificación por RCP desarrollados en México, están fundamentados en el empleo del marcador IS6110 y de la proteína de 65 kDa,<sup>22-24</sup> así que este es el primer reporte en donde se emplea el marcador rADN16S en muestras provenientes de pacientes mexicanos con TB. En este sentido varias propiedades hacen del rADN16S un marcador útil para el desarrollo de un ensayo de diagnóstico molecular; ya que es un constituyente esencial de ribosomas bacterianos, el análisis comparativo de diversas secuencias de este gen muestra la existencia de regiones altamente conservadas y otras con considerable variabilidad en función de la especie, la cual podría ayudar a desarrollar un sistema de RCP-múltiple que nos permitiría al mismo tiempo que se diagnostica la TB, determinar la especie de mycobacteria presente en el paciente, información que conjuntamente con el perfil de drogoresistencia son cada vez más necesarios para establecer acciones epidemiológicas y de salud pública; otra particularidad de este marcador es que el genoma bacteriano presenta varias copias del mismo,  $\pm 100$ , por lo que se ubica como un marcador altamente sensible y facilita su empleo en sistemas diagnósticos; pero quizá la mejor propiedad de este marcador es que evita desventajas observadas en el marcador IS6110 tales

como; baja sensibilidad a mycobacterias del grupo MOT, presencia de mutaciones en las regiones de acoplamiento de los iniciadores y depleción del marcador en el genoma de la bacteria, lo cual daría lugar a falsos negativos.<sup>25</sup>

En conclusión, los resultados de este primer acercamiento nos permitieron identificar los iniciadores, estandarizar los reactivos y protocolos para el diagnóstico altamente sensible y específico de TB usando como blanco de amplificación de la RCP, el gen rADN16S. Actualmente estamos evaluando un mayor número de muestras clínicas comparando con el cultivo como estándar de oro, el objetivo final es contar con una herramienta diagnóstica con alta significancia clínica en contra de la tuberculosis.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Dr. Javier Fuentes responsable del Programa Estatal de Mycobacteriosis, de los Servicios de Salud del Estado de Veracruz y de la Mtra. Aurora Parissi, directora del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

## REFERENCIAS

1. *Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing*. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Zenteno R. Tuberculosis realidades y perspectivas. En: Saldaña S, Zenteno R, Ladrón de Guevara E, Vázquez D, Ortiz M, Rodríguez E. eds. *Tópicos selectos de la salud pública*. Veracruz: Universidad Veracruzana; 2006: 9-28.
3. Mariscal A, Ramírez C, Sánchez L, Zenteno R. Pobreza, drogoresistencia, diagnóstico, VIH-SIDA y su impacto en la evolución de la tuberculosis en México. *MedUNAB*. 2005; 8(1): 37-42.
4. Zenteno R. Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Rev Inst Nac Enf Resp Mex*. 2003; 16: 181-6.
5. Colebunders R, Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4: 97-107.
6. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of Mycobacteria. *Clin Chem*. 2001; 47: 809-14.
7. Lores LL, Pai M, Colford JM Jr, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol*. 2005; 3: 55.
8. Pfyffer GE. Amplification techniques: hope or illusion in the direct detection of tuberculosis? *Med Microbiol Lett*. 1994; 3: 335-47.
9. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 1407-12.
10. Organización Panamericana de la Salud. *Situación de la tuberculosis en las Américas 2004*. Disponible en: <http://www.paho.org/common/Display.asp?Lang=E&RecID=6432>. Consultado el 25 de mayo del 2007.
11. SSA. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica; Boletín Epidemiológico 2007*. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem01/pdf/cua5.pdf>. Consultado el 25 de mayo 2007.
12. Balandro S, Anzaldo G, Peña G, Betancourt X. *Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR*. 18. Tuberculosis. México: Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, OPS; 1996.
13. *MB advanced DNA analysis V 6.8*. Disponible en: <http://www.molbiosoft.de/help/index.html>. Consultado el 25 de mayo del 2007.
14. Galen RS, Gambino RS. *Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1985.
15. Eisenach K, Cave M, Crawford JT. Polymerase chain amplification of a repetitive DNA sequence for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inf Dis*. 1990; 161: 977-81.
16. Dilworth JP, Goyal M, Shaw RJ. Comparison of polymerase chain reaction for IS6110 and Amplicor in the diagnosis of tuberculosis. *Thorax*. 1996; 51: 320-2.
17. Portillo-Gomez L, Panduro A. Rapid and efficient detection of extra pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 4: 361-70.
18. Kocagoz T, Yilmaz E, Ozkara S, Kokagoz S, Hayran M, Sachedeva M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J Clin Microbiol*. 1993; 34: 134-9.
19. Gengvinij N, Pattanakitsakul SN, Chairasert A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens using one-tube nested PCR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2001; 32: 114-25.
20. Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK, et al. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities. *J Clin Lab Anal*. 2003; 17: 155-63.
21. Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, Schuitema A, et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 1012-5.
22. Moran-Moguel MC, Aceves-Hernández D, Peña-Montes de Oca PM, Gallegos-Arreola MP, Flores-Martínez SE, Montoya-Fuentes H, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Rev Panam Salud Pública*. 2000; 7: 389-94.
23. Sánchez-Pérez HJ, Hernan MA, Jansa JM, Halperin D, Ascherio A. Detection of pulmonary tuberculosis in Chiapas, Mexico. *Ann Epidemiol*. 2002; 12: 166-72.
24. Rodríguez AJ, Palma S, Maestre JL, Saavedra D, Reyes T, Perovani M. Detección de mycobacterias en muestras clínicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Biomed*. 2000; 11: 257-62.
25. Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Rossetti ML, Zahab A, Barroso EW, Barreto AM, et al. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol*. 2000; 151: 343-51.