

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Evaluación operacional de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico rápido de la tuberculosis a partir de frotis de esputo en la Dirección de Salud IV-
LE**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Nelson Orlando Rivera Fernández

ASESOR

Mario Monteghirfo Gomero

Lima – Perú

2007

Dedico este trabajo, a mis Padres, Esposa y Hermanos que con su invaluable comprensión y apoyo me sirvió de aliento, para la realización de esta Tesis.

AGRADECIMIENTO

A todas las personas que en alguna forma han contribuido a la realización de este estudio, de manera muy especial:

A mi Asesor Magíster Mario Monteghirfo Gomero por su orientación y guía en mi Trabajo de Tesis.

Al Lic. Roger I. Calderón Espinoza, Investigador Principal del Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.

A la Lic. Carmen Suarez Nole, Directora del Laboratorio Referencial de Lima – Este, Ministerio de Salud

ABREVIATURAS.

TB – PCR	: Reacción en Cadena de la polimerasa para tuberculosis.
BK	: Baciloscopía
ZN	: Tinción de Ziehl Neelsen
TB	: Tuberculosis
PNCT	: Programa Nacional de Control de la Tuberculosis.
BAAR	: Bacilos Alcohol Ácidos Resistentes
TB – FP	: Tuberculosis Pulmonar por frotis positivo
EDTA	: Etilen diamino tetra acético.
S	: Sensibilidad.
E	: Especificidad.
VPP	: Valor Predictivo Positivo
VPN	: Valor Predictivo Negativo
VP	: Verdadero Positivo
VN	: Verdadero Negativo
FP	: Falso Positivo
FN	: Falso Negativo
Rv+	: Razón de verosimilitud positiva
Rv-	: Razón de verosimilitud negativa
pb	: Pares de bases
EO	: Evaluación operacional
PBS	: Buffer Fosfato Salino

CONTENIDO

	Pág
1. Resumen	7
2. Abstract	8
3. Introducción	9
4. Antecedentes	11
5. Materiales y métodos	21
6. Resultados	31
7. Discusión	37
8. Conclusiones	44
9. Recomendación	45
10. Bibliografía	46

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar operacionalmente la baciloscopía usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa para Tuberculosis (TB – PCR).

Se evaluaron 144 muestras de esputo obtenidas de la Dirección de Salud Lima Este. En todas las muestras se realizó la baciloscopía usando la técnica clásica de Ziehl – Neelsen, lo que fue verificado mediante el cultivo Ogawa y las láminas fueron evaluadas con TB – PCR usando la secuencia de inserción IS6110.

Después de la amplificación se obtuvo un fragmento de 123 pares de base correspondiente a la secuencia de inserción IS6110.

Del total de muestras examinadas por el método de Ziehl – Neelsen, 54 fueron positivas y 90 fueron negativas (37.5% y 62.5% respectivamente). En las mismas muestras analizadas usando PCR, 67 fueron positivas (46.5%) y 77 fueron negativas (53.4%), mientras que para la prueba del cultivo 66 fueron positivas y 78 negativas (45.8% y 54.2% respectivamente).

Los procedimientos bacteriológicos de rutina (examen directo y cultivo), pueden ser una herramienta significativa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y otras enfermedades micobacterianas; pero hay una significativa subestimación de los casos de TB, especialmente usado la tinción clásica de Ziehl – Neelsen cuando esta es evaluada con TB-PCR como referencia.

ABSTRACT

The main objective of this research was to evaluate operationally bacilloscopy using Polimerase Chain Reaction of for tuberculosis (TB- PCR).

It was evaluated 144 sputum samples obtained from Direccion de Salud Lima Este. To all the samples they were practiced bacilloscopy using the classical technique of Ziehl-Neelsen, which was verified with the Ogawa cultivation and the slides were evaluated with TB PCR using the insertion sequence IS6110.

After the amplification it was obtained a fragment of 123 couples of bases corresponding to the sequence of insertion IS6110.

Of the total of samples examined by the Ziehl-Neelsen method, 54 were positive and 90 were negative (37.5% and 62.5% respectively). In the same samples tested using TB PCR, 67 were positive (46.5%) and 77 were negative (53.4%); while for cultivation test 66 were positive and 78 negative (45.8% and 54.2% respectively).

The routine bacteriological procedures (direct exam and cultivation) can be a very powerful tool for the diagnosis of lung tuberculosis and other mycobacterium diseases; but there is a significant underestimate on all TB cases, especially using the Classical Ziehl Neelsen staining when it is evaluated with TB-PCR as reference.

INTRODUCCIÓN

A fines de la década del 80 la tuberculosis (TB) en el Perú, había llegado a una situación de extrema severidad, con altas tasas de incidencia y baja eficiencia técnica en las actividades de control, lo que condicionaba una tendencia epidemiológica social de mal pronóstico.

En las décadas siguientes, si bien el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (PNCT), realiza decididos esfuerzos para tratar de controlar esta enfermedad, la tuberculosis viene incrementándose, al igual que en la mayoría de los países en vías de desarrollo.

Varios serían los factores que contribuyen a esta tendencia epidemiológica, pero se estima que el más significativo es el inadecuado diagnóstico de la enfermedad (13), (18).

En la actualidad, dos exámenes de laboratorio son la base inicial para el diagnóstico de la tuberculosis, la baciloscopía (BK) y el examen radiológico (26).

En los últimos años, la aplicación de la biología molecular en el estudio del *Mycobacterium tuberculosis* ha obtenido avances sumamente importantes, consiguiendo formas más rápidas, sensibles y específicas de diagnóstico microbiano.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el presente estudio tuvo por finalidad primordial, realizar una evaluación operacional a nivel molecular de *Mycobacterium tuberculosis* a partir del frotis de esputo en

la Dirección de Salud IV-LE, y de esta manera poner en relieve la subestimación de diagnósticos para TB derivados de la aplicación diagnóstica por baciloscopía.

Debe entenderse por evaluación operacional, al acto por el cual, se realiza una serie de pruebas con el fin de confirmar si un proceso determinado (o parte de el) se está realizando adecuadamente o si las consecuencias de los resultados de dicho proceso, están o no afectando aspectos de mayor envergadura dependientes del mismo.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA

El hallazgo de bacilos ácido alcohol resistentes en extensiones teñidas y examinadas al microscopio fue la primera evidencia de la presencia de micobacterias en una muestra clínica (37).

Es el procedimiento más fácil y rápido que se puede efectuar y aporta al clínico una confirmación preliminar del diagnóstico.

La Técnica Clásica de ZIEHL-NEELSEN (ZN) o sus variantes y la Tinción con fluorocromos (auramina) son igualmente eficaces y se basan en el mismo principio. La ventaja de la fluorescencia es su mayor rapidez.

COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN: se emplea para detectar la presencia de BAAR (Bacilos Acido Alcohol Resistentes).

Utilidad: diagnostico de enfermedades infecciosas producidas por:

a. Micobacterias: *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberculosis)

Mycobacterium leprae (Lepra).

b. Bacterias del género

Nocardia: Nocardiosis (similar a tuberculosis)

Mycetomus actinomicoticus (micosis subcutánea).

Fundamento: Los BAAR poseen una pared celular rica en lípidos y ácidos carboxílicos (ácido micólico) que tienen la propiedad de unirse excepcionalmente fuerte al colorante primario (fucsina de Ziehl) cuando se usa el calor como mordiente. Una vez que se forma este complejo colorante-pared, ni siquiera la acción conjunta del ácido y del alcohol

pueden deshacerlo, ya que las paredes retienen el colorante en forma "resistente". (37)

Técnica: se realiza un frotis sobre una lámina portaobjeto y se deja secar a temperatura ambiente. Se aplica el colorante primario sobre la muestra y enseguida se emplea la llama de un mechero para calentar la muestra hasta la aparición de vapores blancos, luego se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El calor se emplea como mordiente, gracias al calor los lípidos de la pared dejan pasar el colorante para que se combine con los ácidos carboxílicos de la pared, así se forma el complejo colorante-pared. Se aplica el decolorante ácido-alcohol y se deja reposar por 30 segundos para luego lavar con agua. Las bacterias que no han formado el complejo en su pared (no BAAR) no retendrán el colorante, el exceso del mismo será arrastrado por el agua. Se aplica el colorante secundario, se deja reposar por un minuto y se lava con agua. (19)

Para la correcta realización e interpretación de los resultados de un examen microscópico directo, siempre se han tenido en cuenta los siguientes hechos:

- a. La ácido alcohol resistencia es una propiedad común a todas las especies del género *Mycobacterium*.
- b. La no observación de Bacilos Alcohol Ácidos Resistentes (BAAR) en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de TB, ya que es una técnica de sensibilidad limitada.

c. Al informar los resultados del examen microscópico, el microbiólogo proporciona al clínico una estimación aproximada del número de BAAR detectados.

d. La capacidad de detectar *Mycobacterium tuberculosis* por baciloscopía (sensibilidad de 60 – 80%).

El Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* permite diagnosticar los casos que presentan baciloscopía negativa, y aporta hasta un 20% más de confirmación bacteriológica (Especificidad del 100% y Sensibilidad del 80-90%); es considerada hasta el momento el patrón de oro como prueba diagnóstica en la tuberculosis.

Desde su introducción en 1985, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite sintetizar por vía enzimática millones de copias de un fragmento específico de ADN, se vislumbró como una técnica que podía revolucionar por su rapidez y sensibilidad el diagnóstico de las enfermedades infecciosas (29). La extraordinaria sensibilidad de esta técnica es su principal atractivo, aunque se debe tener cuidado con la contaminación, ya que esto puede dar lugar a un falso positivo.

El sistema Amplicor TB^R, fue uno de los primeros en ser introducido al mercado (29). En este sistema se amplifica por PCR un fragmento del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S de la micobacteria, posteriormente se híbrida el producto amplificado a una sonda marcada

enzimáticamente y la detección del producto amplificado se realiza mediante una reacción colorimétrica.

Posteriormente se implementa el Sistema Gen-Probe Amplified MTD^R. Este método ha sido ampliamente evaluado. En este sistema se amplifica ARN ribosómico 23S de la micobacteria mediante la síntesis de cADN y ARN, utilizando una mezcla enzimática compuesta principalmente por transcriptasa inversa y ARN polimerasa (16).

En la actualidad, la aplicación de nuevas técnicas moleculares permiten establecer con precisión la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, inclusive el tipo de cepas que esta presente temporalmente en una población (30).

Herramientas de biología molecular, tales como Fingerprinting (RFLP: polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) o la técnica de Spoligotyping (21), (24) es altamente efectiva para tipificar las micobacterias y determinar los genotipos de los aislamientos clínicos. En tuberculosis humana la tipificación molecular se logra por el uso de la secuencia de inserción IS6110 (09), (17), (06), (07). En *Mycobacterium bovis*, IS6110 es menos útil porque el genoma de la mayoría de las cepas contiene solo algunas copias de IS6110 (40). Estos estudios han indicado que algunas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* pueden ser más fácilmente transmitidas y más exitosas en el desarrollo de una infección y/o enfermedad (12).

De todas estas técnicas moleculares la más utilizada por su gran poder discriminativo ha sido el estudio del polimorfismo amplificado por PCR utilizando la secuencia de inserción IS6110 (36). Existe un protocolo estandarizado que permite comparar los resultados entre distintos laboratorios y establecer bancos de datos a una gran escala.

Este marcador puede utilizarse para:

- a. Conocer el patrón epidemiológico general de una población.
- b. En el control de epidemias.
- c. En el estudio de contaminaciones cruzadas en el laboratorio.
- d. En estudios operacionales a nivel molecular

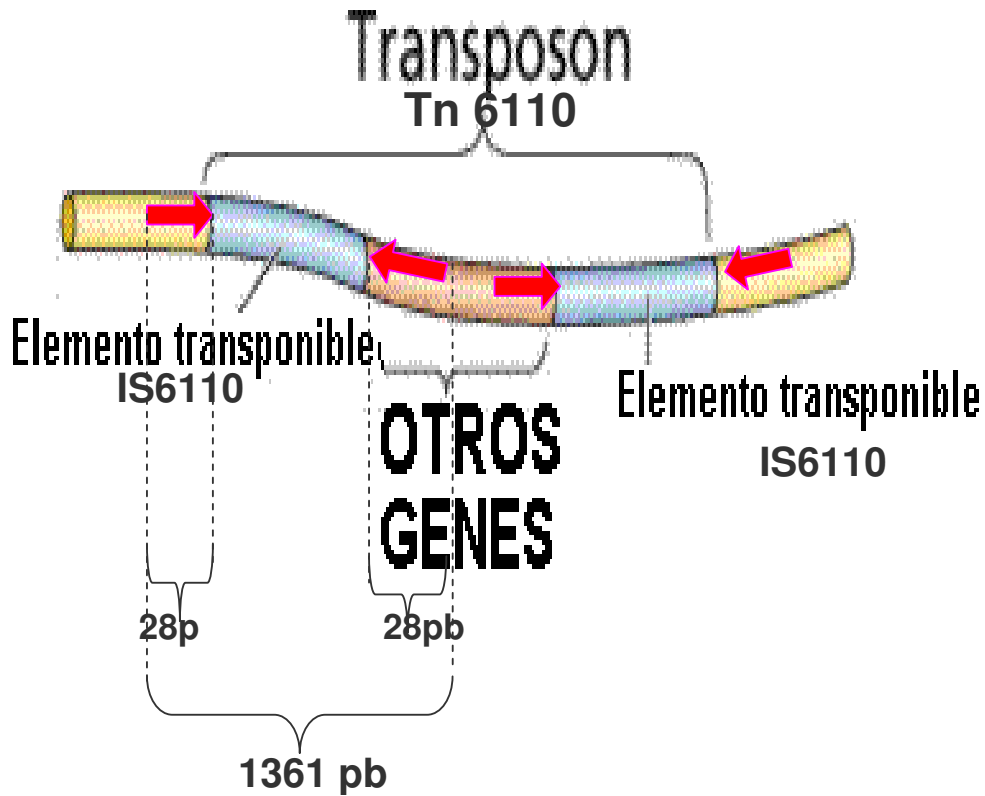
El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* contiene en general un elevado número de copias IS6110 entre 5 y 20, localizadas en posiciones variables a lo largo del cromosoma debido a su capacidad de transposición (36).

La IS (secuencia de inserción) IS6110 es un miembro de la familia IS3. Los miembros de esta familia son los grupos de IS bacterianas más ampliamente extendidas, siendo encontradas en más de 24 géneros de bacterias Gram positivas y Gram negativas (17). La especificidad y la naturaleza repetitiva del IS6110 lo hacen un objetivo ideal para la amplificación por RCP (38).

La secuencia de inserción IS6110 frecuentemente se encuentra en un locus único en el genoma del complejo *Mycobacterium tuberculosis* denominado región “Direct Repeat” (DR) (17). La región DR consiste en secuencias repetitivas de 36 pb separadas por espaciadores no repetitivos cuyas longitudes varían de 27 a 41 pb (17), (14). Esta región ha sido completamente secuenciadas en *Mycobacterium tuberculosis*, la gran mayoría de las cepas contienen uno o más elementos IS6110 en la región DR.

Las inserciones IS6110, también denominadas elementos transponibles IS6110, se encuentran agrupadas de a pares (aunque en algunos casos también se puedan agrupar de a tres), en una estructura mayor denominada transposon Tn 6110. Cada elemento transponible IS6110 está flanqueado en sus extremos por secuencias repetitivas inversas que tienen una longitud de 28 pb, de tal forma que la longitud del elemento transponible IS6110 alcanza las 1361 pb. Entre los elementos transponibles se ubican varios genes con sus funciones correspondientes, uno de ellos es el gen que codifica para la enzima transposasa que permite al elemento Tn 6110 localizarse en posiciones variables del cromosoma bacteriano. A continuación se muestra al elemento de transposición Tn 6110 (Fig. 1).

Fig. No. 1



Por ello las cepas no relacionadas epidemiológicamente presentan patrones propios y por lo tanto un elevado grado de polimorfismo. Contrariamente, las cepas relacionadas muestran patrones idénticos pudiendo establecerse fácilmente una relación de clonalidad (35).

Para el caso de nuestro estudio, sería precisamente el elevado número de copias (entre 5 y 20) del elemento de inserción IS6110, el que nos permitiría utilizar el TB-PCR en el contexto evaluativo operacional con respecto al examen microscópico.

Para valorar la eficacia del TB-PCR como un evaluador operacional en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, es conveniente evaluar el examen

microscópico, por medio del TB-PCR. Ya que se debe considerar asimismo que el examen microscópico tiene una sensibilidad del 60 – 80% como método de diagnóstico rápido (37), lo que lleva a iniciar tratamientos basados en la sospecha clínica, o el retraso inapropiado de los mismos en espera del resultado del cultivo (11). Es necesario considerar con respecto al examen microscópico, que si bien su baja sensibilidad se debería en primera instancia a su capacidad de detectar BAAR en muestras con baja concentración de los mismos, también podría haber otros factores que influyan sobre la sensibilidad del examen microscópico, como por ejemplo la concentración de los reactivos usados en la baciloscopía (25).

Cuando se consideran las muestras BAAR positivos, la sensibilidad del TB-PCR puede llegar al 99%. Además lo más importante es que entre el 30% y el 60% de las muestras negativas tras el examen microscópico son positivas para TB-PCR (15). Una ventaja adicional del TB-PCR en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar es la confirmación de que las muestras positivas por tinción y por TB-PCR contienen *Mycobacterium tuberculosis* (31), siempre y cuando se mantenga la integridad del DNA de *Mycobacterium tuberculosis* (34). Por lo que el método TB-PCR es actualmente un método de elección para el diagnóstico rápido de la tuberculosis no solo pulmonar sino de otras ubicaciones como es el caso de la tuberculosis intestinal (33).

Aunque la indicación aceptada de los métodos de TB-PCR es precisamente, la confirmación de que la micobacteria detectada en el examen microscópico es *Mycobacterium tuberculosis* (8), la utilidad en la práctica clínica es mayor si se interpretan los resultados en el contexto clínico adecuado, como la sospecha de primoinfección tuberculosa en un ambiente epidemiológico de riesgo, lesiones en pacientes inmunodeprimidos con alto riesgo de reactivación de lesiones residuales o, incluso, para confirmar retrospectivamente el diagnóstico de tuberculosis en pacientes tratados empíricamente desde uno a tres meses antes (41). En un estudio realizado en España (Valencia), por Querol y col. en 105 pacientes diagnosticados de tuberculosis pulmonar, se detectó 10 pacientes cuyo cultivo de esputo fue negativo y la PCR positiva, cinco de estos pacientes formaban parte de un estudio de contactos por una microepidemia escolar de tuberculosis y mostraban además de la reacción positiva a la tuberculina, infiltrado pulmonar en los lóbulos superiores, tres pacientes presentaron un infiltrado pulmonar no cavitado siendo detectados en un estudio de contacto de alto riesgo, una joven de 14 años tenía un eritema nodoso con radiografía de tórax normal y su madre había sido diagnosticada recientemente de tuberculosis pulmonar y finalmente un paciente tenía meningitis tuberculosa con radiografía de tórax normal y a la semana comenzó a apreciarse el patrón extendido de tejido fibroso en un control radiológico (32).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar operacionalmente frotises de esputo a nivel molecular en el contexto de la tuberculosis para poner en relieve la subestimación diagnóstica de esta enfermedad derivada de la utilización de la baciloscopía.

Objetivos Específicos

- Proveer una metodología a nivel molecular que permite llevar a cabo no solo estudios a nivel operacional, sino también, estudios retrospectivos y forenses de la tuberculosis.
- Proveer un método rápido y sensible en el diagnóstico de la tuberculosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Todos los procedimientos se realizaron bajo las normas de Bioseguridad, contempladas en los Manuales respectivos de los laboratorios de la Dirección de Salud de Lima Este (Estudios microbiológicos) y el laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (estudios moleculares).

Obtención de las Muestras Biológicas

El estudio se llevó cabo en la Dirección de Salud IV Lima Este e incluyó a tres establecimientos de Salud, Centro de Salud Calcuta, Centro de Salud Primavera, Centro de Salud San Fernando, incluyendo asimismo el Laboratorio Referencial. Se obtuvieron 144 frotises de esputo procedentes de 1024 láminas que pasaron control de calidad correspondiente al cuarto trimestre del 2004 de los establecimientos antes mencionados de acuerdo a los criterios establecidos en el Manual de Actualización de la Doctrina, Normas y Procedimientos para el Control de la Tuberculosis en el Perú.

Criterios establecidos en el Manual de Actualización de la Doctrina, Normas y Procedimientos para el Control de la Tuberculosis en el Perú,

para laboratorios que procesan 100 o más baciloscopías y también para aquellos que procesan menos de 99 baciloscopías como promedio mensual.

Conservación de Láminas

Los laboratorios que procesan 100 o más baciloscopías como promedio mensual, conservan todas las positivas y las 2 negativas siguientes a la positiva.

Los laboratorios que procesan menos de 99 baciloscopías como promedio mensual, conservarán todas las positivas y un mínimo de 20 láminas negativas de numeración correlativa.

Solicitud de Láminas

Los laboratorios supervisores solicitarán a cada uno de los laboratorios de su red local el envío de láminas como mínimo cuatro veces al año (una vez por trimestre).

Envío de Láminas

Una vez recibida la solicitud del laboratorio supervisor, el laboratorio supervisado procederá a embalar en forma adecuada las láminas conservadas para su remisión.

Lectura de Láminas para Control de Calidad

El laboratorio supervisor deberá realizar la lectura al 100% de las láminas recibidas sin conocer el laboratorio de origen y enviará los resultados al laboratorio supervisado en un plazo máximo de treinta días desde la fecha de recepción de las láminas

Revisión de Registros Clínicos.

Se revisaron los Libros de Registro para pacientes sintomáticos respiratorios y registro de muestras para investigación bacteriológica de los Centros de Salud dependientes del Laboratorio referencial de Lima – Este que participaron en este estudio, para verificar el diagnóstico por Baciloscopía y Cultivo de los casos evaluados.

Reactivos

Los reactivos usados fueron de grado analítico:

Reactivos para la extracción de ADN

Cloruro de Sodio.

Cloruro de Potasio.

Fosfato disódico dihidratado.

Fosfato Potásico.

Chelex – 100^R

Saponina.

Reactivos para la amplificación de ADN para un volumen final de 25 uL.

dNTPs (200 uM)

Cebador IS6110 F 150 pM CTCGTCCAGCGCCCGCTTCGG.

Cebador IS6110 R 150 pM CCTGCGAGCGTAGGCGTCCGG.

Taq polimerasa 1 U.

MgCl₂ 2mM

PCR Buffer 1X

10 mM tris – HCL

50 mM KCL

0.8% nonidet P40

(pH 8.8 a 25º)

Reactivos para la electroforesis y tinción.

Buffer TBE 1X

89 mM tris base

89 mM ácido bórico.

2 mM EDTA

Agarosa 2%

Bromuro de Etidio 1 mg/mL.

Buffer de carga 6X

0.25% azul de bromofenol.

0.25% Xylencianol.

40% (w/v) sucrosa con agua.

Estándar de tamaño molecular de 100 pb

Equipos y materiales

Cabina de Flujo laminar de clase II. LABCONCO

Termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400

Cámara de electroforesis horizontal Fotodyne

Fuente de poder de 1,500 voltios marca Hoefer

Transiluminador UV marca Fotodyne

Centrífuga IEC HN-SII

Microcentrifuga Eppendorf 5415 C

Horno de Microondas Samsung Modelo MV 630WB

Estufa incubadora Memmer BE-200

Micropipetas digitales de 2,5 μ L, 10 μ L y 200 μ L.

Congeladora a - 70^o C. Sanyo Ultra Low.

Vortex Genie 2

Tubos para PCR

Puntas para micropipetas

Diversos materiales de vidrio.

Respirador bacteriológico ajustable.

Guantes descartables.

2. Métodos

2.1. Extracción de ADN a partir de frotis de esputo coloreadas con ZN.

Se hizo un raspado total de los frotis de esputo adherido a lámina portaobjeto mediante una lanceta y colocando dicho raspado en un tubo eppendorf de 1.5 ml. y se siguió el procedimiento de extracción usando una solución de Chelex-100^R al 5% (1),(20), como sigue:

1. 500 μ L de saponina al 1% se añadió al tubo conteniendo el material de muestra obtenido en el raspado.
2. Las muestras obtenidas en el raspado con 500 μ L de saponina fueron incubadas en hielo por 60 minutos, luego homogenizadas de 3 a 4 veces, y luego se centrifugaron (Microcentrifuga Eppendorf 5415 C) nuevamente por 15 minutos a 5,000 g.
3. Después de descartar el sobrenadante, el precipitado fue lavado con PBS pH = 8.8, hasta que el sobrenadante estuviera claro.
4. Seguidamente se añadió 50 μ L de Chelex 100^R al 5% en el precipitado lavado con PBS, luego se homogenizó brevemente. Las muestras homogenizadas se incubaron a 56^o C por 15 minutos para luego incubarlas en agua hirviendo por 10 minutos.

5. Después de centrifugar las muestras homogenizadas a 5,000 g por 15 minutos el sobrenadante fue colectado y guardado a -20° C hasta su uso.

2.2. PCR para la secuencia IS 6110.

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar un fragmento IS6110. Se usaron los primers correspondientes para IS6110: IS-1 (5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') y IS-2 (5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3'), los cuales amplificaron un fragmento de 123 pb (10).

El volumen total de reacción para cada ciclo de PCR fue de 25 µL. La mezcla de reacción para PCR fue la siguiente: 200 µM de dNTPs, 2 U de Taq polimerasa, 0.2 uM de par de primers y 7.5 µL de DNA. La amplificación se realizó usando un termociclador Perkin Elmer 9600 bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos de denaturación a 94°C por 5 minutos, alineamiento a 68°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de la amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 2%, coloreadas con bromuro de etidio (22).

2.3 Análisis estadísticos de los resultados.

En este estudio se utilizaron los siguientes estadígrafos

Sensibilidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo.

La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad (2).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

ESPECIFICIDAD

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo (2). En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos, la especificidad se determinaría como:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

Valor predictivo positivo:

Es la probabilidad de padecer la afección si se obtiene un resultado positivo en el test (3). El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de

pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

Valor predictivo negativo:

Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano (3). Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{FN} + \text{VN}}$$

Razón de verosimilitud positiva:

Se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes enfermos entre la probabilidad de un resultado positivo entre los sanos. Es en definitiva, el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad):

$$\text{RV+} = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}}$$

Razón de verosimilitud negativa:

Se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de enfermedad entre la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Se calcula por lo tanto, como el cociente entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad):

$$RV- = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

RESULTADOS

De las 144 baciloscopías analizadas 54 eran baciloscopía positiva (BK+) y 90 baciloscopía negativa (BK-). Cuando estas mismas 144 baciloscopías fueron evaluadas operacionalmente por TB-PCR, se obtuvo 67 PCR positivas (PCR+) y 77 PCR negativas (PCR-). En cuanto al cultivo, de las 144 muestras que originaron las baciloscopías analizadas 66 resultaron ser Cultivo positivo (Cultivo+) y 78 Cultivo negativo (Cultivo-) (Tablas 4, 5, 6 y figuras 3, 4 y 5).

En función de los datos obtenidos, se obtuvieron primeramente los valores de Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN), Razón de verosimilitud positiva (Rv+), y Razón de verosimilitud negativa (Rv-) para la baciloscopías, como se observa en la tabla No.1

Tabla No.1

Datos Estadísticos obtenidos a partir de la baciloscopía

BACILOSCOPIA
S = 78%
E = 97%
VPP = 0.96
VPN = 0.84
Rv+ = 26
Rv- = 0.2

Luego se obtienen los valores de S, E, VPP, VPN, RV+, RV-, para la evaluación operacional de TB-PCR, como se observa en la Tabla No. 2.

Tabla No.2

Datos Estadísticos obtenidos en la evaluación operacional de TB-PCR

PCR
S = 98%
E = 97%
VPP = 0.97
VPN = 0.97
Rv+ = 33
Rv- = 0.02

Finalmente se obtienen los valores de S, E, VPP, VPN, RV+, RV-, para el cultivo, como se observa en la tabla No.3.

Tabla No.3

Datos Estadísticos obtenidos a partir de los cultivos de los pacientes a quienes pertenecen las baciloscopías de la Tabla No. 1

CULTIVO
S = 98%
E = 99%
VPP = 0.97
VPN = 0.99
Rv+ = 98
Rv- = 0.02

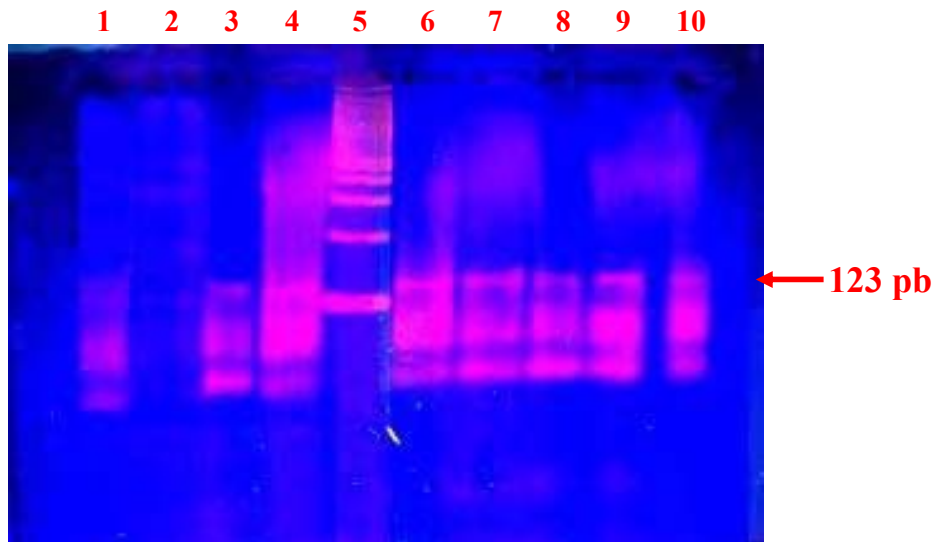


Fig. 2- Gel de Agarosa al 2%, coloreadas con bromuro de etidio de los productos amplificados pertenecientes a fragmentos de inserción IS6110.

Carril No.1 muestra paucibacilar,

Carril No.2 control negativo,

Carril No. 3 muestra con baciloscopía: ++,

Carril No 4 muestra con baciloscopía mayor a +++,

Carril No. 5 lader,

Carril No. 6 control positivo,

Carril 7 – 10: muestra con baciloscopía: +++.

NOTA:

1-9 BARR/ 100 campos: (+) Muy escaso (paucibacilar)

1-9 BARR/ 10 campos: (++) Escaso

1-9 BARR/ campo de inmersión: (+++) Abundantes

Todas las observaciones fueron hechas a 100x

Resultados de las Baciloscopias en 144 muestras de la DISA LIMA ESTE

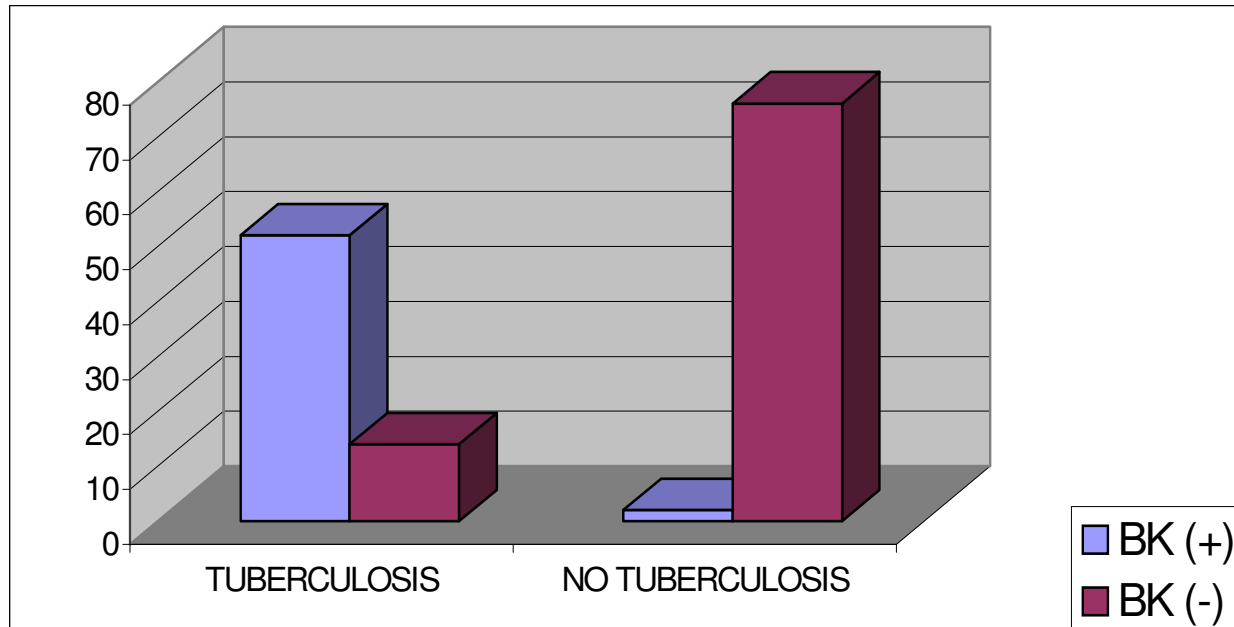


Fig.Nº 3

Resultados de TB-PCR sobre las 144 baciloscopias de la Fig.No. 3

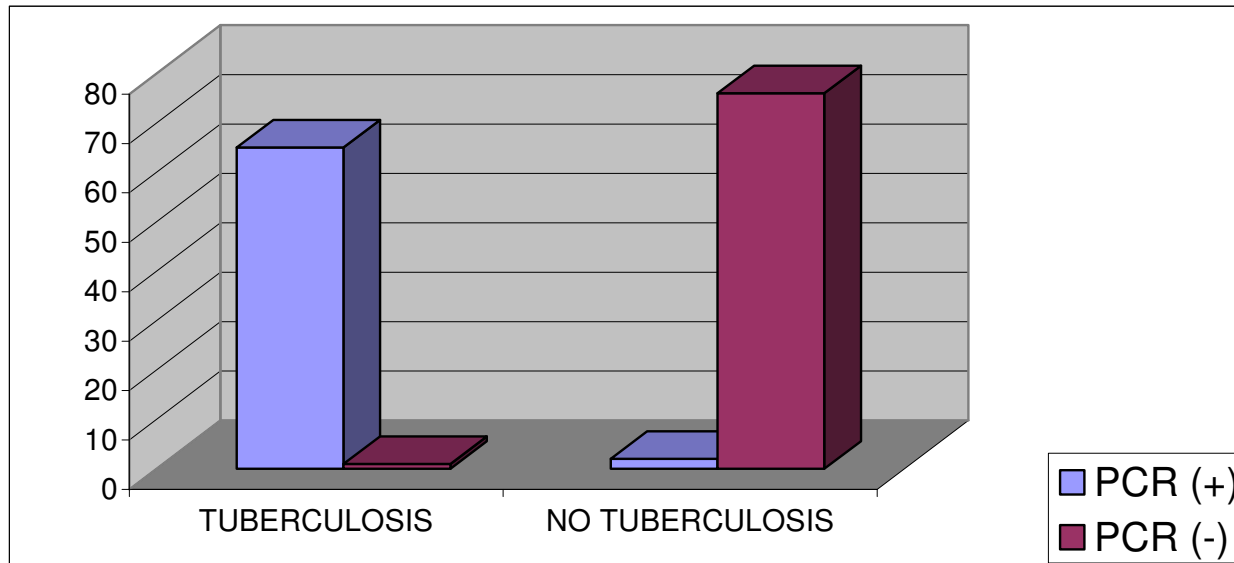


Fig. No. 4

Resultados de Cultivos de los pacientes a quienes pertenecen las baciloscopías de la Fig.No. 3

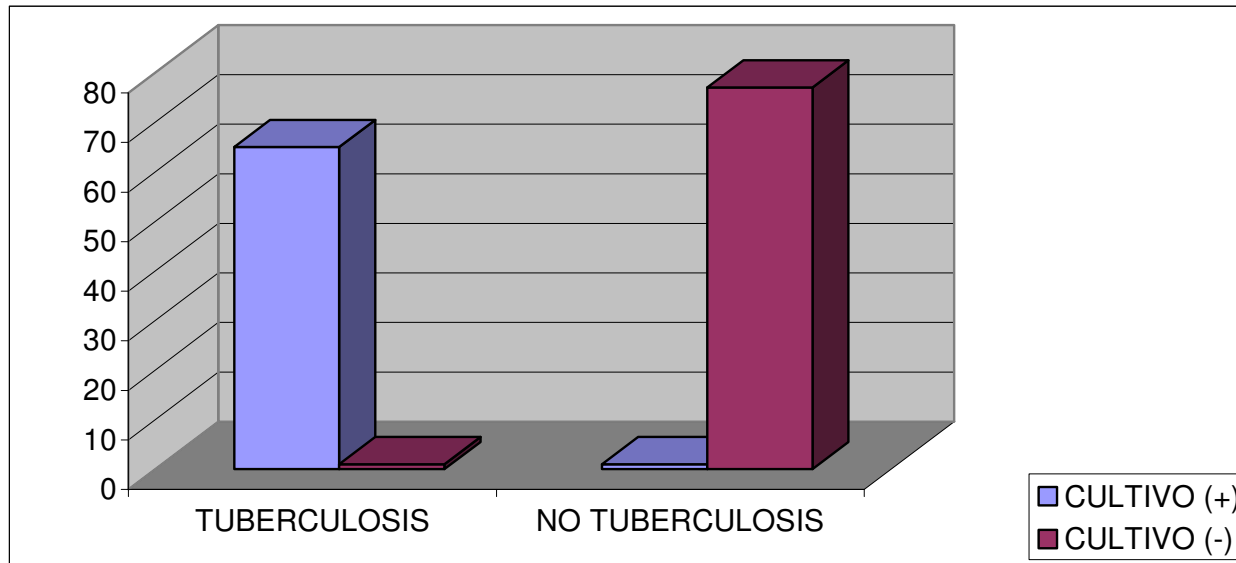


Fig. 5

DISCUSIÓN

La tuberculosis, la enfermedad que mayor número de muertes ha ocasionado en toda la historia de la humanidad, continúa causando estragos. En la actualidad sigue siendo la enfermedad infecciosa más importante. Se calcula que en el mundo están infectados por *Mycobacterium tuberculosis* unos 1,800 millones de habitantes.

Este reservorio condiciona que se produzcan anualmente entre 8 y 10 millones de casos nuevos de esta enfermedad. Además, debido a que la tasa de disminución de los casos nuevos de TB, es más baja que la tasa de aumento de la población, es probable que actualmente, existan más tuberculosis que en 1882, año en el que Robert Koch descubrió el bacilo (5).

El Programa Nacional de Control de la Tuberculosis del Perú cuenta con una red de laboratorios a fin de asegurar, entre otros aspectos, calidad en el diagnóstico de la tuberculosis, con pruebas bacteriológicas confiables. En este contexto la baciloscopía (examen directo de esputo) es la herramienta fundamental rutinaria para el diagnóstico de la tuberculosis; sin embargo su confiabilidad diagnóstica y sobre todo su capacidad de detección es baja; mientras que el cultivo permite diagnosticar los casos que presentan baciloscopía negativa, y aporta hasta un 20% más de confirmación bacteriológica; desafortunadamente

es un procedimiento relativamente largo que puede tomar de 4 a 8 semanas para completarse (27).

Desde su introducción en 1985, la técnica de PCR, se vislumbró como una técnica que podía revolucionar por su rapidez y sensibilidad no solo el diagnóstico de las enfermedades infecciosas sino también las formas de evaluación de dicho diagnóstico (31).

En la evaluación operacional de este trabajo de tesis se pone de manifiesto, en forma significativa, la subestimación en el diagnóstico de TB por BK, ya que de 66 pacientes con TB, mientras que BK dio un resultado positivo en el 79% de los casos, PCR dio un resultado positivo en el 98.5% de los mismos. Al hallar los valores de S y E de la 144 baciloscopías que intervienen en este estudio se observa valores del 78% y 97% respectivamente, los cuales son iguales a los hallados por otros autores (4), (15), (37). Cuando se hallan los valores de S y E del TB-PCR como evaluador operacional de estas 144 baciloscopías evaluadas se obtienen valores del 98% y 97% respectivamente. Al correlacionar estos valores con los obtenidos en los cultivos a partir de las muestras que originaron las 144 baciloscopías en mención (S = 98%, E = 97%), se puede apreciar la alta performance del TB-PCR como evaluador operacional de la baciloscopía, puesto que hay que considerar, que los valores de S y E obtenidos en el cultivo están inmersos en un contexto de confirmación clínico – diagnóstica para cada uno de las muestras consideradas en el estudio (23).

En un estudio de Osman y col.(28) publicado en el 2003 se muestra una sensibilidad de 98% y especificidad del 100% para TB-PCR. Se observa que estos valores son similares a los encontrados en el presente trabajo, sin embargo lo significativo en este punto es el hecho de que Osman y col. trabajaron entre otras muestras (aspirado gástrico, biopsias pleurales y cepas bacterianas) con esputo, mientras que en nuestro estudio se trabajó en láminas de BK, derivadas de las muestras de esputo, lo que pone en relieve una vez más el significativo nivel evaluativo operacional que tiene el TB-PCR.

En otro estudio Van Soolingen y col. evaluó comparativamente varios elementos ADN repetitivo, entre ellos el IS6110 en el contexto del TB-PCR, obteniéndose el VPP de 100% y VPN de 98%. Estos valores son similares a los hallados en nuestro estudio, con la salvedad que en el estudio de Van Soolingen y col.(39) publicado en 1994, se trabajó con cepas micobacterianas, mientras que en nuestro estudio se trabajó con láminas BK, poniendo en relieve una vez más el significativo nivel evaluador operacional del TB-PCR.

Los valores de Sensibilidad, Especificidad y Valores predictivos hallados en los estudios de referencia que sirvieron de elemento comparativo con los resultados hallados en nuestro estudio, pertenecen a países con una baja prevalencia de tuberculosis (Estados Unidos, Países Bajos, Uruguay) (11), lo que podría afectar el nivel de significación evaluativo operacional del TB-PCR. Sin embargo al hallar las razones de verosimilitud del TB-

PCR en nuestro estudio, encontramos valores de $Rv+ = 33$ y $Rv- = 0.02$ lo que nos indica que independientemente de la prevalencia de esta patología el nivel evaluador operacional del TB-PCR es óptimo.

Cuando se consolidan estos estudios comparativos, si bien es concluyente la evidente baja sensibilidad de la baciloscopía, el criterio unánime con respecto a esta baja sensibilidad es el hecho de que la baciloscopía no puede detectar a los BAAR debido a que estos están en baja concentración en la muestra correspondiente. Al evaluar operacionalmente la baciloscopía mediante TB-PCR se pone de manifiesto lo relativo de este criterio, toda vez que en un porcentaje significativo de baciloscopías negativas el TB-PCR fue positivo, indicando de esta manera que debe haber otros factores que influyen en la baja sensibilidad de la baciloscopía. Se estima que uno de los más significativos sería la concentración de los reactivos que intervienen en la baciloscopía (25).

Es en este sentido que tomando como referencia a los resultados preliminares de este trabajo de tesis, un grupo de investigación de la Universidad Cayetano Heredia ha planteado a la Dirección de Salud IV Lima-Este, la realización de un proyecto de investigación bajo la premisa de evaluar si la concentración de la carbofuscina influye en la sensibilidad de la baciloscopía.

Si bien no es recomendable el uso de TB-PCR en forma rutinaria para el diagnóstico de la tuberculosis, el costo beneficio como evaluador

operacional es muy significativo, dependiendo del contexto clínico, epidemiológico y radiológico del paciente, toda vez que hasta el momento actual no ha sido posible dilucidar si hay otros criterios que influyen en la baja sensibilidad de la baciloscopía.

En este contexto a través de este trabajo de tesis se ha podido establecer mediante la evaluación operacional por PCR que a pesar de la baja concentración de BAAR en la baciloscopía, el PCR pudo detectar dichos BAAR. Lo que induce a pensar que es otro, o son otros, los criterios que influyen en la baja sensibilidad de la baciloscopía, como podría ser el caso de la concentración de los reactivos que se utilizan en la misma.

Así mismo en nuestro estudio se aprecia el aspecto relativo del diagnóstico clínico, debido a que un paciente (código 5235) diagnosticado clínicamente con tuberculosis resulto tener baciloscopía negativa y cultivo negativo, corroborados estos resultados mediante un PCR negativo.

Mientras que a dos pacientes que no se les diagnosticó tuberculosis, en uno de los pacientes (código 5514) se obtuvo baciloscopía positiva y cultivo positivo corroborados asimismo estos resultados mediante un PCR positivo. Sin embargo en el otro paciente (código 3666) se obtuvo baciloscopía positiva pero su cultivo fue negativo, obteniéndose en este caso un PCR positivo; al hacer mayores indagaciones sobre éste último

caso, se confirmó que dicho paciente (código 3666) tuvo una segunda baciloscopía, pero en esta oportunidad resultó negativa.

Finalmente, hay que poner en relieve la connotación de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación; debido a que dichos resultados pueden incidir en una parcial reformulación de las estrategias utilizadas en la lucha contra la tuberculosis en nuestro medio, ya que en la Dirección de Salud Lima Este luego de un análisis epidemiológico en base a los resultados obtenidos, se ha propuesto en primera instancia trabajos de investigación para evaluar los diferentes aspectos que configuraron la baciloscopía; tales como los reactivos utilizados para la tinción ZN, operatividad en la baciloscopía y análisis de los resultados. Y en segunda instancia el planteamiento de un proyecto presupuestal que contemple la implementación de un Laboratorio de Biología Molecular en dicha Dirección de Salud, con el objetivo de minimizar la subestimación del diagnóstico clínico por baciloscopía y a la necesidad de incluir a la brevedad posible técnicas de biología molecular como el TB – PCR, que no solo servirían como un evaluador operacional, sino también como herramienta de diagnóstico rápido y oportuno, lo cual incide en el costo beneficio del diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis, ya que si bien el costo promedio de las pruebas convencionales (baciloscopía y cultivo es de S/. 7.50 y S/. 22.75 respectivamente, el costo promedio por tratamiento incluyendo la hospitalización asciende a S/. 2,100.00. Si

consideramos el costo promedio de la prueba molecular para el diagnóstico de tuberculosis, que es de S/. 105.00, vemos que el costo beneficio con respecto al tratamiento y hospitalización es favorable en lo concerniente a la aplicación de la prueba molecular, ya que con esta pruebas se detectaría rápidamente y específicamente la tuberculosis, disminuyendo considerablemente los costos por tratamiento y/u hospitalización (entre 90 y 95% de disminución en los costos).

CONCLUSIONES

1. Al evaluar operacionalmente los casos sospechosos de TB a partir del frotis de muestras de esputo coloreadas con la Técnica de ZN, mediante el PCR, se ha logrado establecer que existe una significativa subestimación de los casos de TB, lo cual contribuye a la transmisión de la enfermedad.
2. TB-PCR es un método rápido y sensible en el diagnóstico de TB, por que incide favorablemente en el costo beneficio del diagnóstico de la enfermedad versus el tratamiento y/u hospitalización de la misma.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar Evaluaciones Operaciones por TB –PCR en todas aquellas pruebas susceptibles de este tipo de evaluación, a fin de establecer criterios de certeza en los diagnósticos de TB.
2. Se recomienda implementar en nuestro medio, Unidades de Biología Molecular en los Laboratorios de Referencia o nivel Regional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alger J., Acosta M., Lozano C., Velasquez C., Labrada L.. Stained Smears as a Source of DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996 Vol. 91 (5): 589 – 591.
2. Altman D.G. Bland J.M. Statistics Notes: Diagnostic Test 1: sensitivity and specificity. BMJ 1994; 308: 1552.
3. Altman D.G. Bland J.M. Statistics Notes: Diagnostic Test 2: predictive values. BMJ 1994; 309: 102.
4. Brown T J. Power EG, French GI. Evaluation of three detection system for mycobacterium tuberculosis where clinical diagnosis is difficult. J. Clin. Pathol 1999; 52: 193-197.
5. Caminero J.A. y col. Diagnóstico de la tuberculosis Arch Bronconeumol 1996; 32 : 85 -99
6. Cave, M. D., K. D. Eisenach, G. Templeton, M. Salfinger, G. Mazurek, J. H. Bates, and J. T. Crawford. "Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of Mycobacterium tuberculosis". J. Clin. Microbiol 1994; 32:262-266.
7. Cave, M. D., K. D. Eisenach, P. F. McDermott, J. H. Bates, and J. T. Crawford. "IS6110: conservation of sequence in the Mycobacterium tuberculosis complex and its utilization in DNA fingerprinting". Mol. Cell. Probes 1991;5:73-80.

8. Cohinta Hernandez, Maria F Correa de Adjounian, Felipe Zamora, Marcelo Rossi, Susana Gonzalez Rico, Raquel Pedroza, Maria Gomez "Aislamiento e identificación de micobacterias mediante métodos bacteriológicos y de biología molecular" Rev. Soc. Ven. Microbiol. Feb. 2005 vol.25 No.2 Caracas.
9. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL.. "Use of polymerasa chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis". J Clin Microbiol 1992; 30: 255-258.
10. Do Youn Park, MD; Joe Yeon Kim, MD; Kyung Un Choi, MD; Jim Sook Lee, Md; Chang Hun Lee, MD; Mee Young Sol. MD; Kang Sook Suh, MD. Comparison of polymerase Chain Reaction with Histopathologic Feature for Diagnosis of Tuberculosis in Formalin-Fixed, Paraffin-Embeddad Histologic Specimens. Arch Pathol Lab. Med – March 2003 Vol 127, p. 326-330.
11. Dye C, Scheele S, Dolin P. Pathania V, Raviglione Mc for who global surveillance and Monitoring Project. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence and mortality by contry, JAMA 1999; 282(7): 667-686.
12. Galway, S. E., P.C. Sanchez, T. F. Shinnick, I. Orme, T. Agerton, D. Hoy, J. S. Jones, *et al.* "An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis". N. Engl. J. Med 1998; 338: 663.
13. Garcia JM, Palacios GJJ, Sanchez AAA. Respiratory infections caused by environmental mycobacteria. Arch Bronconeumol 2005; 41: 206-19.

14. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. "Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method". *Mol Microbiol* 1993; Dec; 10(5):1057-65.
15. Heifets L. Dilemma and realities of rapid diagnostic test for tuberculosis, *Chest* 2000; 118: 4-5.
16. Hermán PWM, Scmiterna ARL Von Sooligen D et al. Specific detection of *M. tuberculosis* complex, Strains by polymerase chain reaction. *J. Clin Microbiol.* 1990;28:1204-1213.
17. Hermans, P. W., D. van Soolingen, J. W. Dale, A. R. Schuitema, R. A. McAdam, D. Catty, and J. D. van Embden. "Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis". *J. Clin. Microbiol* 1990; 28:2051-2058.
18. Jesudason MV, Gladstone P. Non tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens at a tertiary care hospital in South India. *Indian J. Med Microbiol* 2005; 23:136-44.
19. Instrumento normativo: Actualización de la doctrina, Normas y procedimientos para el control de la tuberculosis en el Perú. Dirección General de la Salud de las Personas 2001, Ministerio de Salud, pag. 35.
20. Kain et al. Extraction form Field – Stained of variety from microorganisms. *Am J. Trop Med. Hyg.* 1992. 46: 473 – 479.

21. Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, *et al.* "Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology". *J. Clin. Microbiol* 1997; 35:907-914.
22. Klaster P.R. Amplification reactions in mycobacteriology. *J. Microbiol. Methods*. 1995 23: 75 – 78.
23. Maha A. El Demellawy, Abeer Abdel Wahab, Essarn M. Emad., Kamal M. Kandeel, Ashraf A. Tabll and Mostafa K. El Awady, Sensitivity of IS6110, mtp40 and 85B-RNA Based Amplification Assays in the Diagnosis and Treatment Follow up of Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Biological Sciences* 2006 6(1): 121-126.
24. Molhuizen, H. O., A. E. Bunschoten, L. M. Schouls, and J. D. A van Embden. "Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping". *Methods Mol. Biol* 1998; 101:381-394.
25. N. Selvakumar, Fathima Rahman, S. Rajasekaran, P. R. Narayanan, and Thomas R. Frieden "Inefficiency of 0.3% Carbol Fuchsin in Ziehl-Neelsen Staining for Detecting Acid-Fast Bacilli" *J. Clin. Microbiol* 2002;. pp.3041-3043.
26. López Focal P. Técnicas de imagen en el Diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Tuberculosis*. Caminero Luna JA. Ed. Madrid: Gráficos Letra S.A. 1992; 87-04
27. Murray JF Un programa mundial contra la tuberculosis que emerge: Agenda de investigaciones, incluyendo el impacto de la infección VIH. *Bol Unión Int. Tuberc.Enf.Resp.* 1991; 66: 229 – 231.

28. Osman Cataloluk, Tekin Karsligil and Nurhajat Bayazit. Evaluation of polymerase chain Reaction Amplification Method for Mycobacterium tuberculosis Complex on Samples from Different Sources. Scand J infect Dis 2003; 35: 329 – 331.
29. Pao CC, Yen TSB, You JB, Mac JS, Fiss EM, Chang Ch. Detection and identification of M. tuberculosis by DNA amplification. J. Clin. Microbiol 1990; 28: 1,887-1,880.
30. Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, Dormandy J, Mirabello L, Polletta VL y col., Phenotypic and molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2218-25.
31. Querol JM, Forge MA, Granda D, Gamero C, García de Lomas J. The utility of polymerase Chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 1995; 107: 1631-1635.
32. Querol JM, Granda D, Vañó RF. ¿Qué aportan los métodos de amplificación genética de diagnóstico de la tuberculosis en la práctica clínica?. Control de Calidad SEIMC Ed. Valencia 2003.
33. Ramadass Balamurugan, Subramanian Venkataraman, K. R. John, and Balakrishnan S. Ramakrishna, PCR Amplification of the IS6110 Insertion Element of *Mycobacterium tuberculosis* in Fecal Samples from Patients with Intestinal Tuberculosis, Journal of Clinical Microbiology, May 2006, p. 1884-1886, Vol. 44, No. 5
34. Robin Warren, Marianna de Kock, Erica Engelke, Roseline Myburgh, Nico Gey van Pittius, Thomas Victor, and Paul van

- Helden, Safe *Mycobacterium tuberculosis* DNA Extraction Method That Does Not Compromise Integrity, Journal of Clinical Microbiology, January 2006, p. 254-256, Vol. 44, No. 1
35. ROSS BC, Raios K, Jacson K. et al. identification of genetically distinct supespecies of *M. Kansaire*. J. Clin. Microbial 1992: 30:2,930-2,933.
 36. Thierry D, Brisson - Noel A, Lévy-Frébault V, Nguyens, Guesdon JL, Gicquel B. Characterizacion of a *M. tuberculosis* insection sequience IS6110, an dits aplication in diagnosis J. Clin. Microbiol. 1990:28:2,673-2,688.
 37. Timpe A, Runyon Eh. The relationship of acid-fast bacteria to human disease. A preliminary report. Lab clin.Med. 1954; 44: 202-209.
 38. Van Embden, J. D. A., M. A. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, *et al.*. "Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology". J. Clin. Microbiol 1993; 31:406-409.
 39. Van Soolingen D, de Haas P.E.W., Hermans P.W.M., Groenen. P.M.A., Van Embden J.D.A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. J. Clin Microbiol 1993 51: 1987 – 1995.

40. Van Soolingen, D., P. E. W. de Haas, J. Haagsma, T. Eger, P. W. M. Hermans, V. Ritacco, A. Alito, *et al.* "Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis". *J. Clin. Microbiol* 1994;. 32:2425-2433.
41. Woods GL. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 123: 1002-1006.