

DetECCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN UNA POBLACIÓN SELECCIONADA DEL NOROCCIDENTE DE MÉXICO¹

María Cristina Morán Moguel,² Dolores Aceves Hernández,³
Patricia Maribel Peña Montes de Oca,² Martha Patricia Gallegos
Arreola,² Silvia Esperanza Flores Martínez,² Héctor Montoya Fuentes,²
Luis E. Figuera,⁴ Luis Villa Manzanares³ y José Sánchez Corona²

RESUMEN

Este estudio compara la detección de Mycobacterium tuberculosis mediante baciloscopia (tinción de Ziehl-Neelsen), cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y reacción en cadena de la polimerasa (RCP) realizada con ADN extraído directamente de distintos tipos de muestras. Se analizaron 252 muestras (114 de esputo, 96 de orina, 15 de LCR y 27 de otros tipos) de 160 pacientes con sospecha de tuberculosis en cualquiera de sus formas que acudieron al Laboratorio de Patología Clínica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social. En todos los casos se realizó tinción de Ziehl-Neelsen, cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y amplificación por RCP de un segmento de 285 pares de bases específico del complejo M. tuberculosis. De las 252 muestras, 18 fueron positivas para micobacterias no tuberculosas en el cultivo. De las 234 restantes, 12 (5,1%) fueron positivas en la RCP y el cultivo, 174 (74,4%) negativas en ambas pruebas, 47 (20,1%) positivas en la RCP y negativas en el cultivo y 1 (0,4%) negativa en la RCP y positiva en el cultivo; tomando el cultivo como prueba de referencia, la RCP proporcionó una sensibilidad de 92,3%, una especificidad de 78,7%, un valor predictivo positivo de 20,3% y un valor predictivo negativo de 99,4%. El límite de detección de la RCP en ADN extraído de cultivo fue de 10 fg (equivalente a 4 ó 5 micobacterias). También en comparación con el cultivo, la RCP identificó correctamente a la totalidad de las micobacterias del complejo M. tuberculosis. Tomando como prueba de referencia el cultivo, al analizar únicamente las muestras de esputo, la RCP directa proporcionó una sensibilidad de 90,9%, una especificidad de 89,5%, un valor predictivo positivo de 52,6% y un valor predictivo negativo de 98,7%. La RCP es una técnica sensible y específica para detectar el complejo M. tuberculosis en muestras tanto positivas como negativas en la baciloscopia. Un procedimiento controlado de RCP permite establecer o excluir el diagnóstico de tuberculosis en un tiempo que se reduce de más de tres semanas a tan solo 24 a 48 horas, lo cual resulta particularmente útil cuando es necesario un diagnóstico temprano para establecer el pronóstico del paciente o en casos de transplante de órganos.

¹ El presente trabajo fue parcialmente apoyado con fondos del Sistema de Investigación Morelos del CONCYT. Clave 95-02-038.

² División de Medicina Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Médico Nacional de Occidente (CMNO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Guadalajara, Jalisco, México. Toda la correspondencia debe ser

enviada a María Cristina Morán Moguel, a la siguiente dirección postal: Sierra Mojada No. 800, Colonia Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México. Correo electrónico: cmoran_moguel@hotmail.com

³ Laboratorio de Patología Clínica, Hospital de Especialidades, CMNO, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México.

⁴ División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CMNO, IMSS y Postgrado de la Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud establece que la tuberculosis es una enfermedad de notificación semanal obligatoria. La tuberculosis ocupa en México el lugar número 17 entre las causas de muerte y el primero como causa de muerte por un solo agente infeccioso (1). De acuerdo con las notificaciones de los casos de tuberculosis en todas sus formas hechas a la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud en 1996, México se encuentra entre los países de las Américas con tasas de incidencia entre 25 y 85/100 000 (2). El diagnóstico definitivo de las infecciones micobacterianas se basa en la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y el aislamiento por cultivo seguido de identificación bioquímica. La sensibilidad de la baciloscopia varía entre 30 y 80% y depende tanto del aislamiento en cultivo como de los métodos de recuperación utilizados y de la población evaluada (3); en general se considera que la baciloscopia tiene un límite de detección del orden de 10^3 a 10^5 microorganismos por mililitro de muestra (3, 4). Por otra parte, debido al prolongado tiempo de duplicación de las micobacterias, las técnicas de aislamiento basadas en el cultivo requieren 3 a 8 semanas y su sensibilidad es muy baja cuando se analizan muestras biológicas que contienen un pequeño número de microorganismos (5).

Las limitaciones de los métodos tradicionales de laboratorio para la detección e identificación de micobacterias han creado la necesidad de implementar nuevas estrategias para disminuir el tiempo necesario para el análisis de las muestras remitidas al laboratorio clínico. Un avance en este campo es el sistema de detección radiométrica BACTEC (6), que reduce el tiempo de crecimiento de *M. tuberculosis* en cultivo a 4-25 días. No obstante, siguen siendo necesarios nuevos métodos para la detección rápida de *M. tuberculosis* en muestras biológicas. Las pruebas rápidas y directas que detectan ácidos nucleicos resultan atractivas para el diagnóstico de laboratorio de la tu-

berculosis (5). Se han utilizado sondas de ácidos nucleicos para la identificación de micobacterias en cultivo, pero carecen de sensibilidad cuando se utilizan en la detección directa en muestras biológicas (7).

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es una técnica de la biología molecular que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN que puede ser detectada tras electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La técnica puede realizarse en tan solo 24 a 48 horas (8) y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis y resultados negativos en la tinción de Ziehl-Neelsen o el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas y en pacientes con cuadros atípicos asociados con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o a la inmunosupresión por trasplante (9, 10). La amplificación de secuencias específicas de ADN micobacteriano mediante RCP ha sido utilizada en cultivo y directamente en muestras biológicas (11, 12). Sin embargo, se han reconocido dos grandes obstáculos al éxito de la técnica: las dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción del ADN, y la presencia de inhibidores de la RCP. La manipulación necesaria en la mayoría de los protocolos de extracción del ADN descritos los hace propensos a la contaminación cruzada de las muestras (13); además, es necesario utilizar reactivos y procedimientos agresivos que eventualmente podrían conducir a la pérdida del genoma micobacteriano presente en la muestra. Otros factores que pueden afectar a la sensibilidad y especificidad de la técnica son la variabilidad biológica y la amplificación inespecífica. Antes de que pueda ser utilizada ampliamente en el diagnóstico de la tuberculosis, consideramos necesario examinar estos aspectos y comparar los resultados de la RCP con los de los métodos tradicionales de diagnóstico (baciloscopia y cultivo), para lo cual hemos realizado el presente estudio.

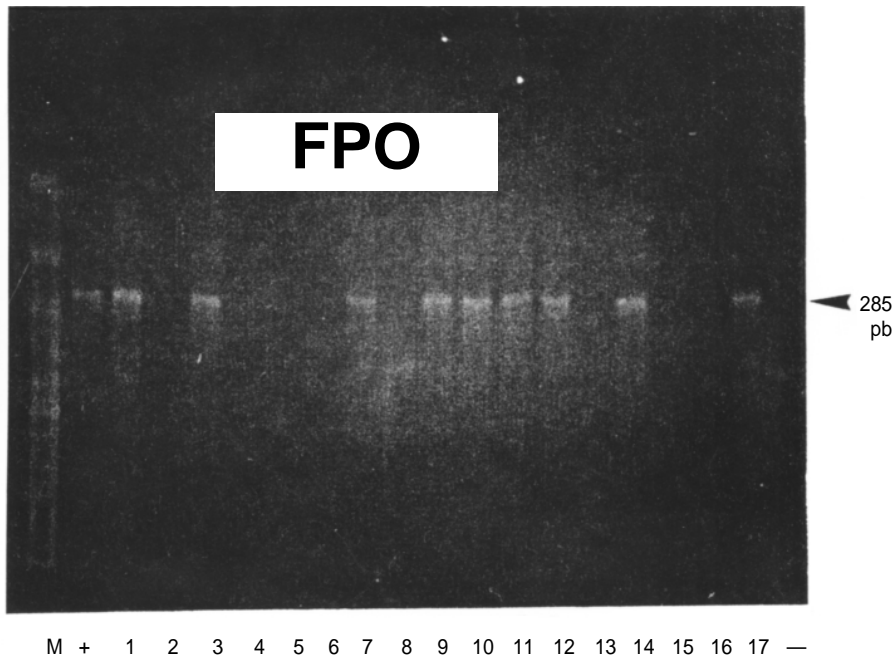
MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó entre octubre de 1995 y octubre de 1996. Participaron 160 pacientes con sospecha de tuberculosis en cualquiera de sus formas que acudieron al Laboratorio de Patología Clínica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, que atiende a la población del noroccidente de México (estados de Jalisco, Michoacán, Colima, Nayarit y Aguascalientes).

Se recolectaron 252 muestras biológicas de diferentes tipos: 114 de esputo, 96 de orina, 15 de líquido cefalorraquídeo (LCR), 6 de líquido ascítico, 6 de líquido pleural, 3 de líquido peritoneal, 3 de líquido sinovial, 3 de líquido de lavado bronquial, 3 de secreciones de lesiones tisulares, 2 de jugo gástrico y 1 de líquido pericárdico. Las muestras de esputo (5-10 mL) se obtuvieron de forma espontánea y las de orina (15 mL como mínimo) a la mitad de la primera micción de la mañana. Las muestras de jugo gástrico y de lavado bronquial se obtuvieron por aspiración, las de secreciones de lesiones tisulares por raspado con hisopo, y las demás por punción.

Para estandarizar la metodología de la RCP se amplificó el ADN extraído de 17 cepas de bacterias: 9 de *M. tuberculosis*, 1 de *M. simiae*, 2 de *M. gordonae*, 1 de *M. terrae*, 2 de *Mycobacterium* spp. y 2 de microorganismos distintos de *Mycobacterium*. El resultado fue positivo con las nueve cepas de *M. tuberculosis* y negativo con las ocho restantes (figura 1). Al comparar el resultado de la RCP con la caracterización bioquímica de los 17 cultivos por procedimientos estándar (reducción de nitrato, producción de niacina y producción de pirazinamida), la RCP identificó correctamente a la totalidad de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. El límite de detección de la RCP se probó utilizando diferentes cantidades (2 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng, 100 pg, 10 pg, 100 fg y 10 fg) de AND "molde" extraído de un cultivo puro de *M. tuberculosis* que tenía una concentración inicial de 326 ng/µL, determinada por espectrofotometría. Mediante electroforesis en gel

FIGURA 1. Fotografía de un gel de agarosa al 2% en el que se observa la banda de 285 pares de bases (pb) característica del complejo *M. tuberculosis*. M: marcador de peso molecular (secuencia de 100 pb).



de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio fue posible observar el producto amplificado con concentraciones desde 2 µg hasta 100 pg; sin embargo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata se observó el producto amplificado con todas las concentraciones (desde 2 µg hasta 10 fg).

Las muestras de esputo y orina se descontaminaron con N-acetil-L-cisteína según el procedimiento recomendado por la American Society for Microbiology para el análisis de ácidos nucleicos micobacterianos (14), y las demás se concentraron por centrifugación, antes de ser divididas en tres alícuotas destinadas a la baciloscopia (tinción de Ziehl-Neelsen), cultivo en medio Löwenstein-Jensen y extracción de ADN, respectivamente.

El ADN fue extraído y amplificado según procedimientos descritos con anterioridad (8). La RCP se llevó a cabo con los iniciadores TB1 (5'-CAA GGC TTC AAT TCC GGT GAT GCC-3') y

TB2 (5'-TGG TCC GGT TCA TAC TCG GGC TGG-3') en un volumen final de reacción de 50 µL que contenían (concentraciones finales) MgCl₂ 25 mM, KCl 25 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3), gelatina al 0,01%, 200 µM de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfatos, 320 nM de cada iniciador, ADN "molde" en 25 µL de agua y 1,5 U de polimerasa *Taq* (Life Technologies, Inc., Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, EUA). Se utilizó un termociclador MJ Research (MJ Research, Inc., Waltham, MA, EUA) para realizar 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1,5 min, alineamiento a 70 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% se analizaron 10 µL de la reacción utilizando una escalera de 100 pares de bases (pb) (repeticiones de una secuencia de 100 pb, desde 100 hasta 1 500 pb en incrementos de 100 pb) como marcador de peso molecular. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y las muestras se considera-

ron positivas para el complejo *M. tuberculosis* cuando estuvo presente una sola banda de 285 pb.

El análisis estadístico se realizó con el programa "Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados" (EPIDAT), versión 2.0 para Windows 1997.

RESULTADOS

El límite de detección de la RCP en ADN extraído de cultivo fue de 10 fg (equivalente a 4 o 5 micobacterias) y, en comparación con el cultivo, la RCP identificó correctamente a la totalidad de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*.

Los resultados de la baciloscopia, cultivo y RCP por tipo de muestra se detallan en el cuadro 1. En 18 muestras (17 de esputo y 1 de orina) el cultivo fue positivo para micobacterias no tuberculosas; en 4 la baciloscopia fue positiva y en las otras 14 negativa; la RCP fue negativa en todas. Excluyendo estas 18 muestras y considerando el cultivo de *M. tuberculosis* como prueba de referencia, de las 234 muestras restantes, 12 (5,1%) fueron positivas en la RCP y el cultivo, 174 (74,4%) negativas con ambas pruebas, 47 (20,1%) positivas en la RCP y negativas en el cultivo y 1 (0,4%) negativa en la RCP y positiva en el cultivo. De acuerdo con estos datos, la RCP proporcionó una sensibilidad de 92,3%, una especificidad de 78,7%, un valor predictivo positivo de 20,3% y un valor predictivo negativo de 99,4%. Para las muestras de esputo (tuberculosis pulmonar), la sensibilidad de la RCP fue de 90,9%, la especificidad de 89,5%, el valor predictivo positivo de 52,6% y el valor predictivo negativo de 98,7%.

DISCUSIÓN

La observación de BAAR en muestras de esputo u otro material biológico debe ser considerada solo como sospechosa de tuberculosis, ya que la tinción no identifica específicamente a *M. tuberculosis*. Además, la baciloscopia se considera el menos sensible de los métodos de diagnóstico de tuber-

CUADRO 1. Resultados de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa en 234 muestras biológicas^a. México (Jalisco, Michoacán, Colima, Nayarit y Aguascalientes), 1995–1996

Prueba diagnóstica			Muestra											Total
Tinción	Cultivo	RCP	ESP	ORI	LCR	ASC	PLE	SIN	BRO	PER	LES	GAS	CAR	
+	+	+	6										1	7
-	+	+	4		1									5
+	-	+	1	2										3
-	-	+	8	23	2	5	1		1	1	2	1		44
+	+	-	1											1
-	+	-												-
+	-	-	2	4										6
-	-	-	75	66	12	1	5	3	2	2	1	1		168

^a Se excluyeron 18 muestras (17 de esputo y 1 de orina) con cultivo positivo para micobacterias no tuberculosas; en 4 la baciloscopia fue positiva y en 14 negativa; la RCP para *M. tuberculosis* fue negativa en todas.

RCP: reacción en cadena de la polimerasa, ESP: esputo, ORI: orina, LCR: líquido cefalorraquídeo, ASC: líquido ascítico, PLE: líquido pleural, SIN: líquido sinovial, BRO: aspirado bronquial, PER: líquido peritoneal, LES: secreción de lesiones tisulares, GAS: jugo gástrico, CAR: líquido pericárdico.

culosis, ya que se ha estimado que el número de microorganismos necesarios para que una baciloscopia resulte positiva es de 10^3 a 10^5 por mililitro. Esto explicaría la negatividad de la baciloscopia en cinco muestras positivas por RCP y cultivo, técnicas más sensibles que la baciloscopia.

Las tres muestras (1 de esputo y 2 de orina) positivas en la baciloscopia y la RCP, pero negativas en el cultivo, podrían explicarse por la contaminación del medio de cultivo (principalmente por hongos), que se presenta con mayor frecuencia en estos tipos de muestras; otra posibilidad sería que las bacterias presentes en la muestra hubieran perdido su viabilidad durante el proceso de descontaminación o concentración, hecho que no afecta a los resultados de la RCP, siempre y cuando el segmento de ADN buscado permanezca en la muestra después de este proceso.

En los 44 casos con resultados negativos por los métodos convencionales y positivos por RCP se deben considerar algunos aspectos que pueden modificar el significado de la positividad de la RCP. En su mayoría estas muestras no procedían del sistema respiratorio y es posible que en estos casos la cantidad de micobacterias presentes no fuera la adecuada para que se detectaran por baciloscopia y cultivo; el menor límite de detección de la RCP, equivalente a 4 o 5 bacilos (8), explicaría la positividad de esta técnica. La

contaminación de las muestras antes, durante o después de la amplificación también podría explicar la positividad de la RCP cuando las pruebas convencionales son negativas; de ahí la importancia de utilizar material de laboratorio libre de ácidos nucleicos y de realizar controles positivos y negativos en la amplificación.

De las 19 muestras negativas por RCP y positivas por baciloscopia o cultivo, 18 fueron positivas para micobacterias no tuberculosas en el cultivo. En estos casos, la discrepancia entre la RCP y las pruebas convencionales se explica por el hecho de que el protocolo de RCP utilizado fuera específico para el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*) y de que tanto la tinción de Ziehl-Neelsen como el cultivo no sean específicos en cuanto a género ni especie. Por otra parte, el resultado falsamente negativo de la RCP en una muestra negativa en la baciloscopia y positiva para *M. tuberculosis* en el cultivo podría explicarse por la presencia de inhibidores del sistema de amplificación en la muestra. En este caso particular, se realizó una segunda amplificación con dos alícuotas de ADN extraído directamente de la muestra, una de las cuales fue contaminada con el control positivo de la amplificación, y en ambos casos el resultado de la RCP fue negativo, lo cual refuerza la hipótesis de la presencia de inhibidores de la RCP en la muestra. Además,

se trataba de una muestra de esputo, y se ha descrito la presencia de inhibidores de la RCP en este tipo de muestras hasta en 8% de los casos (15).

También hay que tener en cuenta que los resultados positivos de la RCP no reflejan necesariamente una infección activa por *M. tuberculosis*, ya que no es posible distinguir una infección previa de la presencia de una cantidad mínima de bacterias que no tenga significado clínico y no requiera tratamiento. Por tanto, cuando el resultado de la RCP es positivo en pacientes asintomáticos, antes de considerarlo falsamente positivo se debe descartar la contaminación de la muestra, analizar la historia clínica del paciente e investigar si se encuentra en tratamiento. Por otra parte, el alto valor predictivo negativo (98,7%) muestra la utilidad de la RCP para descartar la infección, lo cual puede ser de particular importancia en pacientes inmunodeprimidos y en donantes de órganos para trasplante. El valor predictivo positivo de la RCP (52,6%) debe tomarse con cautela, ya que la RCP es capaz de detectar de 4 a 5 micobacterias en una etapa asintomática de la infección o aun cuando estas hayan perdido su viabilidad en los procesos de descontaminación y concentración de muestras, mientras que la sensibilidad de la prueba de referencia (cultivo) se considera baja cuando se analizan muestras biológicas que contienen un número pequeño de microorganismos (5) y requiere necesariamente

que estos sean viables para resultar positiva. Por otro lado, en el presente estudio el único criterio para la selección de las muestras fue la sospecha de tuberculosis en cualquiera de sus formas, por lo que es probable que, si se establecen criterios clínicos más estrictos para que una muestra sea sometida a RCP, aumente la significación de un resultado positivo.

Finalmente, cuando los resultados negativos de la RCP discrepen de otros criterios clínicos o de laboratorio, deben descartarse los resultados falsamente negativos debidos a la presencia de inhibidores en el sistema de amplificación, a la omisión de algún componente básico de la reacción, a la utilización de concentraciones inadecuadas de reactivos, a que no se hayan alcanzado las temperaturas correctas en tubos individuales, etc.

Debido a que el protocolo utilizado en el presente trabajo fue específico para el complejo *M. tuberculosis* y a que no es posible distinguir cada uno de los

miembros de dicho complejo, solo puede ser utilizado como adjunto de un procedimiento convencional, en el que se debe incluir necesariamente el cultivo, ya que, de no ser así, otras micobacterias escaparían a la detección; además, en la actualidad, en la mayoría de los laboratorios de micobacteriología, las pruebas de susceptibilidad y resistencia a antimicobacterianos se llevan a cabo necesariamente en cultivo.

La sensibilidad del protocolo de RCP utilizado en el presente estudio en muestras pulmonares (90,9%) se encuentra dentro de los límites descritos por otros autores para procedimientos similares (74 a 100%) (16).

Cuando se realiza un procedimiento estandarizado (desde el tratamiento de la muestra hasta la extracción, amplificación y detección del ADN) es posible establecer o excluir el diagnóstico molecular de tuberculosis en un tiempo que se reduce de más de tres semanas a tan solo 24 a 48 horas, lo cual es de particular importancia en

aquellos casos en los que es necesario un diagnóstico temprano para establecer el pronóstico del paciente.

La validez de los resultados de la RCP depende no solo de la sensibilidad y especificidad de la técnica particular, sino también del empleo de controles de contaminación paralelos en todos los procesos previos y posteriores a la amplificación, así como de controles positivos y negativos de la misma amplificación.

El beneficio de la utilización de esta técnica será óptimo si los médicos y el personal del laboratorio consideran todos estos factores y, conjuntamente, definen los criterios para seleccionar aquellas muestras que deban ser tamizadas de forma urgente por RCP. En la actualidad, la RCP no puede reemplazar a los métodos tradicionales de laboratorio para el diagnóstico de la tuberculosis y solo debe ser considerada como una técnica sensible y específica que disminuye el tiempo necesario para la detección de *M. tuberculosis*.

REFERENCIAS

1. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Estadísticas Vitales. Capítulo: Mortalidad. Principales causas de mortalidad general, Estados Unidos Mexicanos, 1997 [sitio en internet]. Disponible en <http://cenids.ssa.gob.mx/dgei/vitales/cuadro4.html>. Fecha de acceso: 12 de junio de 2000.
2. Organización Panamericana de la Salud. El control de la tuberculosis en las Américas. Boletín Epidemiológico. OPS. 1998;19(2):1-8.
3. Sommers HM, McClatchy JK. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Morello JA, ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1983.
4. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.
5. Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. pp. 191-196.
6. Kirihara JM, Hillier SL, Coyle MB. Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. J Clin Microbiol 1985;22:841-845.
7. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Levy-Frebault VV. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of *Mycobacteria*. J Clin Microbiol 1992;30:2476-2478.
8. Altamirano M, Kelly MT, Wong A, Bessuille ET, Black WA, Smith JA. Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:2173-2176.
9. Popper HH, Winter E, Höfler G. DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1994;101:738-741.
10. Saboor SA, Johnson NM, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. Lancet 1992;339(8800):1012-1015.
11. Cormican MG, Barry T, Gannon F, Flynn J. Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. J Clin Pathol 1992;45:601-604.
12. Nolte FS, Metchok B, McGowan JE Jr, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993;31:1777-1782.
13. Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnick GK, Tompkins LS, Mickelsen PA. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. J Clin Microbiol 1993;31:1677-1682.
14. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, Wallace RJ Jr. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Weissfeld AS, ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1994.
15. Pfyffer GE, Kissling P, Jhan EMI, Welscher HM, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other non-respiratory, and respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996;34:834-841.
16. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fisher M, Mauch H, et al. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. J Clin Microbiol 1995;33:90-95.

Manuscrito recibido el 12 de octubre de 1999 y aceptado para publicación, tras revisión, el 2 de mayo de 2000.

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* with polymerase chain reaction in a selected population in northwestern Mexico

ABSTRACT

This study compares the detection of *Mycobacterium tuberculosis* through bacilloscopy (Ziehl-Neelsen stain), growth in Lowenstein-Jensen medium, and polymerase chain reaction (PCR) carried out with DNA taken directly from various types of samples. A total of 252 samples were analyzed (114 sputum, 96 urine, 15 cerebrospinal fluid, and 27 of other types) from 160 patients with any form of suspected tuberculosis who came to the Clinical Pathology Laboratory of the Specialties Hospital of the Western National Medical Center of the Mexican Social Security Institute. In all cases Ziehl-Neelsen stains were done, as were also cultures with Lowenstein-Jensen medium and PCR amplification of a segment of 285 base pairs specific to the *M. tuberculosis* complex. Of the 252 samples, with the culture, 18 were positive for nontuberculous mycobacteria. Of the 234 others, 12 (5.1%) were positive with the PCR and the culture, 174 (74.4%) negative in both tests, 47 (20.1%) positive with the PCR and negative with the culture, and 1 (0.4%) negative with the PCR and positive with the culture. Using the culture as the reference test, the PCR provided a sensitivity of 92.3%, a specificity of 78.7%, a positive predictive value of 20.3%, and a negative predictive value of 99.4%. The PCR detection limit with DNA taken from culture was 10 fg, equivalent to four or five mycobacteria. Also in comparison with the culture, the PCR correctly identified the totality of the mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex. Taking the culture as the reference test, when analyzing just the sputum samples, the direct PCR provided a sensitivity of 90.9%, a specificity of 89.5%, a positive predictive value of 52.6%, and a negative predictive value of 98.7%. The PCR is a sensitive and specific technique for detecting the *M. tuberculosis* complex in both positive and negative bacilloscopy samples. A controlled PCR procedure makes it possible to establish or to exclude the diagnosis of tuberculosis in a time that is reduced from more than three weeks to just 24 to 48 hours. This is particularly useful when an early diagnosis is needed to establish a patient's prognosis or in organ transplant cases.
