

Validación de la reacción en cadena de la polimerasa basada en generador universal de heterodúplex para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina y multirresistente en Lima, Perú

Róger I. Calderón-Espinoza^a, Luis Asencios-Solís^b, Neyda Quispe-Torres^b, Gloria Yale-Cajahuancá^c, Carmen Suárez-Nole^d, Leonid Lecca-García^e y Luis F. Llanos-Zavalaga^f

^aLaboratorio de Biotecnología y Biología Molecular. Instituto Nacional de Salud. ^bLaboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias. Instituto Nacional de Salud. ^cLaboratorio de Salud Pública Lima Ciudad. Dirección Regional de Salud V. ^dLaboratorio de Referencia Regional de Lima Este. Dirección Regional de Salud IV. ^eProyecto VIGIA (MINSA/USAID). ^fFacultad de Salud Pública y Administración. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

OBJETIVO. Validar el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa basada en generador universal de heterodúplex (PCR UHG-Rif) para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina y multirresistente (MDR, resistente a isoniazida y rifampicina) en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar procedentes de comunidades de elevada incidencia de tuberculosis resistente en Lima, Perú.
DISEÑO. Comparar la determinación de la sensibilidad a fármacos antituberculosos mediante el método de las proporciones y el PCR UHG-Rif a partir de muestras clínicas, y en función de eso, analizar la capacidad diagnóstica del ensayo de PCR UHG-Rif.

RESULTADOS. La concordancia en la identificación de la sensibilidad a fármacos antituberculosos fue 0,95 ($\kappa = 0,899$; $p < 0,05$) mostrando una sensibilidad y especificidad del 0,973 y 0,922 ($p < 0,05$), respectivamente. El valor predictivo positivo fue 0,939 (IC 95%: 0,879-0,970) y el valor predictivo negativo fue 0,965 (IC 95%: 0,902-0,988). Sin embargo, la posibilidad de predicción de MDR fue 0,981 ($p < 0,05$). Este método permite la detección de poblaciones mixtas y las discordancias pueden explicarse por la presencia de mutaciones silenciosas y no incluidas en la región “caliente” del gen *rpoB* asociada a la resistencia a rifampicina.

CONCLUSIÓN. El ensayo de PCR UHG-Rif detectó mutaciones en el gen *rpoB* y mostraba sensibilidad y especificidad excelente y adecuados valores predictivos en comparación con el método estándar en la determinación de la sensibilidad a fármacos antituberculosos. Por lo tanto, este ensayo puede ser considerado como una excelente herramienta cuya aplicación contribuirá al control de la tuberculosis, identificando correcta y oportunamente a los pacientes infectados con bacilos resistentes y MDR,

permitiendo la reducción de casos de tuberculosis y tuberculosis resistente.

Palabras clave: Tuberculosis. Multirresistencia. Resistencia a rifampicina. PCR UHG-Rif.

Validation of the PCR-based universal heteroduplex generator assay for identification of rifampicin-resistant and multidrug-resistant (MDR, resistant to isoniazid and rifampin) *Mycobacterium tuberculosis* in patients with pulmonary tuberculosis from communities in Lima (Peru) with a high incidence of resistant tuberculosis.

OBJECTIVE. To validate the polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator (PCR UHG-Rif) assay for identifying rifampin-resistant and multidrug-resistant (MDR, resistant to isoniazid and rifampin) *Mycobacterium tuberculosis* in patients with pulmonary tuberculosis from communities in Lima (Peru) with a high incidence of resistant tuberculosis.

DESIGN. To compare the results of antituberculosis drug susceptibility testing in clinical samples performed by the proportion method with those obtained by the PCR UHG-Rif assay, with the aim of analyzing the diagnostic capability of PCR UHG-Rif.

RESULTS. Concordance for the identification of antituberculosis drug susceptibility was 0.95 ($\kappa = 0.899$; $P < .05$), with a sensitivity and specificity of 0.973 and 0.922 ($P < .05$), respectively. The positive predictive value was 0.939 (95% CI: 0.879-0.970) and the negative predictive value was 0.965 (95% CI: 0.902-0.988). Nevertheless, the probability for MDR prediction was 0.981 ($P < .05$). PCR UHG-Rif allows the detection of mixed populations; discordant results can be explained by the presence of point mutations, missense mutations and mutations outside the *rpoB* “hot” region associated with rifampin-resistance.

CONCLUSIONS. The PCR UHG-Rif assay detects mutations in the *rpoB* gene with excellent sensitivity and specificity, and suitable predictive values when compared with the standard method for determining susceptibility to

Correspondencia: Dr. R.I. Calderón-Espinoza.
 Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular. Instituto Nacional de Salud.
 Avda. Defensores del Morro, 2268. Chorrillos. Lima 9. Perú.
 Correo electrónico: rcalderon@ins.gob.pe

Manuscrito recibido el 20-6-2005; aceptado el 13-7-2005.

antituberculosis drugs. This test can be considered an excellent tool that can contribute to tuberculosis control by correctly identifying patients infected with resistant and MDR bacilli, leading to a reduction in the cases of tuberculosis and resistant tuberculosis.

Key words: Tuberculosis. Multidrug resistance. Rifampin resistance. PCR UHG-Rif.

Introducción

La tuberculosis multirresistente (TB MDR), definida como resistencia a isoniazida y rifampicina, es un grave problema de salud pública en el Perú y en el mundo, con cerca de 3 millones de muertes anuales. La expansión de esta enfermedad está favorecida principalmente por la diseminación del VIH-sida y la inmigración de personas desde áreas de alta incidencia¹.

Según el último estudio nacional de Vigilancia de la resistencia antituberculosa en Perú (del año 1999), la TB MDR adquirida alcanzó niveles elevados, sobre todo en zonas de la capital del país: en las Direcciones de Salud Lima Ciudad y Lima Este se informaron de niveles del 10,6 y 41,6%, respectivamente².

Dado este panorama, existe la necesidad de contar con métodos que permitan la detección oportuna de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* resistente a drogas o multirresistentes, sobre todo porque estos casos, muchas veces, presentan una baja tasa de curación al ser tratados con esquemas empíricos (sin contar con un perfil de sensibilidad al inicio del tratamiento)³.

En Perú, por lo general, los pacientes con sospecha de diagnóstico de tuberculosis pulmonar inician el tratamiento convencional, comúnmente conocido como esquema I (combinación de isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol), salvo casos particulares a los que se les indica otros esquemas terapéuticos. En algunos casos, o cuando el tratamiento inicial ha fracasado, se solicita un perfil de sensibilidad antibiótica, prueba que se realiza por el método de proporciones, lo que retrasa en varias semanas la disponibilidad del resultado, y esto a su vez también puede retrasar el empleo de tratamientos efectivos.

Debido a la demora en la obtención de resultados con los métodos convencionales de detección de resistencia a fármacos antituberculosos, es necesario evaluar nuevos sistemas para la identificación precoz de los pacientes infectados con bacilos resistentes; estos métodos deben ser sensibles, específicos y fiables.

La resistencia a rifampicina está principalmente asociada (~96%) a la presencia de mutaciones en el gen *rpoB*^{4,5} y, puede ser considerada como un excelente marcador de multirresistencia, debido a que la mayoría de los aislamientos resistentes a rifampicina son también resistentes a isoniazida⁶.

Para evaluar la utilidad de una técnica de diagnóstico temprano, que ofrezca tanto sensibilidad y especificidad como valores predictivos adecuados, en el presente trabajo se validó el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa basada en generador universal de heterodíplex (PCR UHG-Rif) para determinar la sensibilidad a rifampicina en *M. tuberculosis*⁷. En este ensayo, se amplificó un frag-

mento de 193 pb del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* a partir de una muestra de esputo, y se hibridó con otro fragmento denominado generador universal de heterodíplex (*universal heteroduplex generator* [UHG]) del mismo gen, revelando la existencia o ausencia de mutaciones. La existencia de mutaciones se estableció tomando como referencia los resultados con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (cuyo fenotipo y genotipo son sensibles). Los resultados fueron comparados finalmente con el método de las proporciones (patrón estándar).

Materiales y métodos

Diseño experimental

Se realizó un estudio prospectivo y doble ciego, para determinar la validez de la PCR UHG-Rif para la identificación de *M. tuberculosis* resistente a rifampicina en comparación con el método de proporciones de Canetti et al variante económica⁸ (método estándar empleado en Perú para el diagnóstico de sensibilidad a fármacos antituberculosos). Tanto el método estándar como el método a evaluar (PCR UHG-Rif) fueron realizados por investigadores diferentes, quienes trabajaron de forma independiente y desconociendo los resultados de sus pares.

Las muestras clínicas fueron obtenidas en los Laboratorios de Referencia de las Direcciones Regionales de Lima Este y de Lima Ciudad. Los procedimientos de cultivo y sensibilidad a fármacos antituberculosos fueron realizados en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias; mientras que la PCR UHG-Rif fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.

Pacientes y muestras clínicas

Los pacientes de quienes se obtuvieron las muestras empleadas en este estudio procedían de dos localidades de Lima, en cuyos registros indicaron una elevada tasa de tuberculosis resistente. Los casos incluidos fueron pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar con baciloscopía positiva, diagnosticados en diversos establecimientos de las dos zonas seleccionadas. Se incluyeron pacientes que nunca habían sido tratados pero que tenían el antecedente de contacto con pacientes con infección por *M. tuberculosis* resistente, o pacientes que habían sido tratados pero en los que se observó recaída, fracaso o abandono del tratamiento. Fueron excluidos los casos paucibacilares, los que contaban con un estudio bacteriológico de tuberculosis incompleto y los que no consintieron su participación en el estudio.

En total y en el período de marzo a septiembre de 2003, en la DISA Lima Este se obtuvieron 114 muestras clínicas, mientras que en la DISA Lima Ciudad se obtuvieron 129 muestras.

El estudio contó con la aprobación del comité de ética en investigación del Instituto Nacional de Salud de Lima, y se solicitó el consentimiento y/o asentimiento verbal de los participantes, según correspondiese.

Estudios microbiológicos

Los procedimientos de preparación, lectura e informe de resultados para la baciloscopía, cultivo y prueba de sensibilidad a fármacos antituberculosos por método de proporciones de Canetti et al variante económica, fueron realizados de acuerdo con los métodos descritos previamente⁸.

El ensayo de PCR UHG-Rif fue realizado mediante el siguiente procedimiento: un volumen de 3 ml de cada muestra de esputo fue descontaminado con NaOH/N-acetil-L-cisteína, neutralizado y resuspendido en tampón fosfato⁹; una tercera parte fue separada e inactivada por calentamiento a 95 °C durante 15 min. Posteriormente, para asegurar una máxima pureza y conservación (para otros estudios), el ADN genómico fue purificado mediante el protocolo para lisados celulares usando el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

Se amplificó una región de 193 pb del gen *rpoB* mediante una "nested" PCR¹⁰. La primera reacción fue realizada en un volumen

final de 25 μ L, incluyendo 200 μ M de cada desoxinucleótido fosfato; 1,5 mM de MgCl₂; 1 pmol del oligonucleótido rpo105 (5'-CGTGGAGG CGATCACACCGCAGACGT-3'); 0,125 pmol del oligonucleótido rpo293 (5'-AGTGCACGGGT GCACGTCGCGGACCT-3'), 0,5 U de enzima Taq ADN polimerasa y 3 μ L de ADN genómico purificado de cada muestra clínica. La amplificación fue realizada mediante 25 ciclos de 95 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min y, posteriormente, una extensión final de 72 °C durante 10 min. La segunda reacción realizada en un volumen final de 100 μ L, estuvo constituida por 150 μ M de cada desoxinucleótido fosfato; 1,125 mM de MgCl₂; 2 pmol de los oligonucleótidos rpo105 y rpo273 (5'-GACCTCCAGCCCCGCACGCT-CA CGT-3') y 1 U de enzima Taq ADN polimerasa. Al final se añadieron los 25 μ L de la primera reacción. La amplificación fue realizada mediante 35 ciclos de 95 °C durante 30 s y 74 °C durante 1 min y, después, una extensión final de 72 °C durante 10 min. La amplificación de la secuencia UHG fue realizada siguiendo el proceso de la segunda reacción en un volumen final de 100 μ L usando 200 μ M de desoxinucleótidos fosfato; 1,375 mM de MgCl₂; 2 pmol de los oligonucleótido rpo105 y rpo273 y 1 U de enzima Taq ADN polimerasa.

Con posterioridad, se mezclaron 5 μ L del producto de amplificación del UHG-Rif y 15 μ L del producto de amplificación de cada muestra de esputo, y se realizó la generación de heterodíplex en un termociclador, mediante el siguiente método: 95 °C durante 5 min y disminución posterior de la temperatura hasta 25 °C usando un ciclo de un programa de 7 pasos (un ramp de 2 min y un hold de 30 s para cada disminución de 10 °C).

Los perfiles fueron evidenciados mediante electroforesis no desnaturizante en poliacrilamida al 10%, en tampón TBE 0,6 X durante 2 h a 150 V y posterior revelado mediante tinción con plata¹¹.

La sensibilidad a rifampicina fue determinada por comparación del perfil de heterodíplex formado a partir de cada muestra problema con el perfil de *M. tuberculosis* H37Rv^{7,11} sensible a rifampicina (véase fig. 1).

Análisis de concordancia

Los resultados fueron incorporados a una base de datos en Microsoft Excel y luego analizados usando el software SPSS v. 10 para Windows.

Se determinaron la sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice Kappa de concordancia entre los resultados de la prueba estándar (método de proporciones) y el método molecular (PCR UHG-Rif).

Resultados

De las 243 muestras de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar obtenidas desde marzo a septiembre de 2003 sólo fueron analizadas aquellas en las cuales se obtuvieron resultados de cultivo positivo y en las que pudieron completarse los exámenes de sensibilidad. Con estos criterios se incluyeron, finalmente, 200 muestras (115 de la DISA Lima Ciudad y 85 de la DISA Lima Este), 153 pertenecientes a pacientes tratados previamente y 47 correspondientes a pacientes que no habían sido tratados pero con antecedente de contacto con casos de tuberculosis resistente o multirresistente.

En cada una de las muestras se obtuvo un resultado satisfactorio de amplificación.

En la tabla 1 se muestra el perfil de sensibilidad a fármacos antituberculosos en los aislamientos procedentes de los pacientes de Lima Ciudad y Lima Este. El PCR UHG-Rif fue completado en el total de las muestras evaluadas en el estudio, detectando 83 de los 90 sensibles (0,922 de especificidad) y 107 de los 110 resistentes (0,973 de sensibilidad) a rifampicina, con un valor predictivo de 0,939 (IC

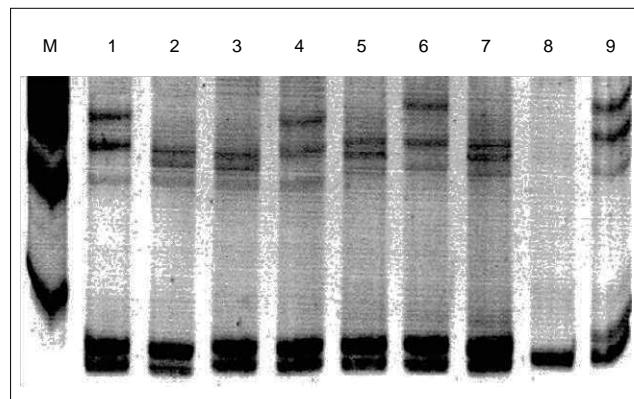


Figura 1. Detección de la resistencia a rifampicina mediante PCR UHG-Rif. Perfiles de PCR UHG-Rif obtenidos a partir de productos de PCR del gen *rpoB* (191 pb) hibridados con el *universal heteroduplex generator* (UHG) a partir de ADN de muestras de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar obtenidos para la determinación de la sensibilidad a rifampicina. Calle M: Escalera de 100 pb. Calle N° 1 MTB H37Rv (S). Calle N° 2 MTB (R). Calle N° 3 MTB (R). Calle N° 4 MTB (S). Calle N° 5 MTB (R). Calle N° 6 MTB (S). Calle N° 7 MTB (R). Calle N° 8 Control Negativo. Calle N° 9: MTB (S). S: sensible; R: resistente.

TABLA 1. Perfiles de resistencia a los principales fármacos antituberculosos encontrados en los aislamientos de los pacientes procedentes de Lima Ciudad y Lima Este en el año 2003

Patrón de resistencia	Total		Nunca tratados		Antes tratados	
	N	%	N	%	N	%
A un medicamento (cuálquiera)	131	65,5	18	38,3	113	73,9
A isoniazida	116	55,0	10	21,3	100	65,4
A rifampicina	110	58,0	13	27,7	97	63,4
A estreptomicina	104	51,0	16	19,1	88	60,8
MDR	106	53,0	13	27,7	93	60,8
Sensibles	69	34,5	29	61,7	40	26,1
Total	200	100	47	23,5	153	76,5

MDR: multirresistente.

95%: 0,879-0,970) y un valor predictivo negativo de 0,965 (IC 95%: 0,902-0,988). La posibilidad de predicción de MDR fue 0,981 ($p < 0,05$). De acuerdo con los resultados de sensibilidad a isoniazida y rifampicina, la detección molecular con PCR UHG-Rif para TB-MDR presentó una concordancia de 0,981 con la detección convencional de la resistencia de estos antimicrobianos ($p < 0,05$).

Por otro lado, la PCR UHG-Rif fue capaz de determinar perfiles que presentaban simultáneamente el genotipo sensible y resistente (mixtos), revelando la heterogeneidad de la población de bacilos infectantes tanto en los pacientes nunca tratados como en los tratados previamente.

Discusión

En este trabajo se han mostrado adecuados niveles de sensibilidad, especificidad y de valores predictivos para la identificación de *M. tuberculosis* resistente a rifampicina mediante el ensayo de PCR UHG-Rif. Tomando como pa-

trón el método de las proporciones, la especificidad fue del 0,922 ($p < 0,05$) y la sensibilidad del 0,973 ($p < 0,05$). Previamente, en un pequeño estudio similar con este método en nuestro laboratorio, con 31 muestras de esputo baciloscopía positiva procedentes de la Dirección de Salud Lima Norte¹¹, se obtuvo una concordancia y especificidad del 100%, pero una sensibilidad de sólo el 80%. En otro estudio sobre la aplicabilidad de la PCR UHG-Rif para el diagnóstico de la resistencia a rifampicina se obtuvo una sensibilidad del 0,971 y una especificidad de 0,982, al considerar como método de referencia el ensayo de Alamar azul en microplacas¹².

La identificación oportuna de los casos de multirresistencia es completamente necesaria¹³. Mediante la aplicación de este método fueron detectados el 98,1% de los casos de TB-MDR (determinados por el método de las proporciones). Obviamente con esta rapidez y oportunidad diagnóstica se podría dirigir un tratamiento óptimo a cada uno de estos casos particulares, disminuyendo así el riesgo de la diseminación persistente de esta enfermedad, especialmente en pacientes con elevado riesgo de contraer TB-MDR e influyendo eficazmente en la disminución de la morbilidad de la tuberculosis en Perú.

Creemos que es importante resaltar la capacidad de este ensayo para determinar perfiles mixtos a partir de una misma muestra. Esto es muy conveniente para la identificación de poblaciones mixtas (sensibles y resistentes) de bacilos tuberculosos infectantes en pacientes que pueden encontrarse en el inicio de un fracaso terapéutico y en aquellos que muestren resistencia antituberculosa de bajo nivel.

La existencia de mutaciones fuera de la región "caliente" de 81 pb en el gen *rpoB* (encontradas en una muy baja frecuencia¹⁴) puede explicar la existencia de falsos sensibles o falsos negativos determinados por la PCR UHG-Rif. Por su parte, la presencia de mutaciones silenciosas y aquellas que causan resistencia a bajo nivel, pueden ser responsables de los falsos resistentes o falsos positivos^{14,15}. Sería adecuado investigar estas discrepancias, considerando la exacta correlación entre la presencia de mutaciones y el fenotipo de resistencia en aislamientos peruanos de *M. tuberculosis* procedente de regiones geográficas representativas; esto ayudaría a conocer la verdadera aplicabilidad de esta metodología en la detección de la resistencia a fármacos antituberculosos.

En resumen, la determinación molecular de la sensibilidad a rifampicina mediante la PCR UHG-Rif es una excelente alternativa a los métodos basados en cultivo o crecimiento bacteriano, debido a que con este método basado en la PCR puede disponerse de resultados en aproximadamente 48 h. Este método puede considerarse una herramienta de diagnóstico temprano útil para la toma de decisiones clínicas o para el seguimiento de pacientes en tratamiento, sobre todo en aquéllos con elevado riesgo de resistencia o potenciales fracasos. Esto podría evitar, predecir o monitorizar el fracaso terapéutico, y escoger alternativa y oportunamente antimicrobianos de segunda línea para el tratamiento, al tiempo que evitaría una exposición inadecuada a fármacos antituberculosos.

Finalmente, mediante este trabajo se ha demostrado la utilidad del ensayo de PCR UHG-Rif en la identificación de pacientes con TB MDR en laboratorios de países en desarrollo, donde el problema presenta un gran impacto y

tanto los recursos económicos como de equipamiento son limitados. En una institución pública de Perú, como el Instituto Nacional de Salud, el precio de cada ensayo correspondiente a una muestra se encuentra en aproximadamente \$ 4,00 (excluyendo el *kit* de extracción de ADN, costos de equipamiento y servicios varios). Este coste sumado a los adecuados valores de especificidad, sensibilidad y predictivos en la detección de la resistencia a rifampicina en pacientes con baciloscopía positiva, colocan a este ensayo en una posición prometedora como herramienta de laboratorio aplicada al diagnóstico de TB resistente. Su implementación podría permitir la correcta identificación y diagnóstico de TB MDR en pacientes con alta sospecha de tuberculosis resistente en la comunidad, tales como los pacientes antes tratados y contactos de pacientes con tuberculosis resistente que provengan de algunas zonas de los distritos de Lima y Callao, donde se hayan ubicado las principales bolsas de TB y TB-resistente; también sería útil en aquellos pacientes hospitalizados, presidarios, VIH positivos¹⁶, que constituyen reconocidos grupos de riesgo para TB MDR. Así se favorece la oportunidad de recibir un tratamiento óptimo que permita la disminución de la transmisión de la enfermedad en Perú y en otros países en desarrollo.

Agradecimientos

A Diana L. Williams *Ph D.*, del Molecular Biology Research Department, G. W. Long Hansen's Disease Center, en Louisiana State University, EE.UU.; por facilitarnos el *generador universal de heterodíplex*, protocolos, comentarios y el esclarecimiento de nuestras dudas metodológicas. Al personal de los centros de salud participantes de las DISA Lima Ciudad y Lima Este, y al tec. lab. David García Neyra del Instituto Nacional de Salud, por su excelente realización de electroforesis y tinción de geles con plata.

Bibliografía

1. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(2):195-209.
2. Vásquez-Campos L, Asencios-Solis L, Leo-Hurtado E, Quispe-Torres N, Salazar-Lindo E, Bayona J, et al. Drug resistance trends among previously treated tuberculosis patients in a national registry in Peru, 1994-2001. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(4):465-72.
3. Farmer P, Shin S, Bayona J, Kim J, Furin J, Brenner J. Making DOTS Plus work. En: Multidrug-resistant tuberculosis. Bastian I, Portaels F, editors. Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers; 2000.
4. Ramaswamy S, Musser J. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc and Lung Dis*. 1998;79:3-29.
5. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:836-71.
6. Cole S, Telenti A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Res J*. 1995;20:701-13.
7. Williams DL, Limbers C, Spring L, Jayachandra S, Gillis T. PCR/Heteroduplex detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. En: PCR protocol for emerging infectious diseases. Persing D, editor. ASM; 1994. p. 122-9.
8. Strong B, Kubica G. Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory. Atlanta, GA: DHHS, Centers for Disease Control; 1981.
9. Williams DL, Gillis TP, Dupree WG. Ethanol fixation of sputum sediments for DNA-based detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1558-61.
10. Whelen AC, Felmlee TA, Hunt JM, Williams DL, Roberts GD, Stockman L, et al. Direct genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:556-61.
11. Calderón R, Asencios L, Quispe N, Custodio W, Montoya Y. Detección rápida de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-SSCP

- y PCR-heterodíplex. Rev Peruana Med Exp Salud Pública. 2003;20:65-71 (Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v20n2/a02v20n2.pdf>).
12. Mayta H, Gilman R, Arenas F, Valencia T, Caviedes L, Montenegro S, et al. Evaluation of a PCR-Based Universal Heteroduplex Generator Assay as a Tool for Rapid Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. J Clin Microbiol. 2003;41:5774-7.
 13. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2001;14:836-71.
 14. Heep M, Brandstatter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rusch-Gerdes S, et al. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 2001;39:107-10.
 15. Kiepiela P, Bishop K, Kormuth E, Roux L, York DF. Comparison of PCR-heteroduplex characterization by automated DNA sequencing and line probe assay for the detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu-Natal, South Africa. Microb Drug Resist. 1998;4: 263-9.
 16. Campos P, Suárez P, Sánchez J, Zavala D, Arévalo J, Ticona E, et al. Multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-Infected Persons, Peru. Emerg Infect Dis. 2003;9:1571-8.