

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN EDUCACIÓN PARA LA SALUD



**Reacción de cadena de polimerasa y secuencia molecular en
muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de
tuberculosis. Arequipa, junio 2013 - julio 2015**

Tesis presentada por la bachiller:
MARÍA CECILIA MANRIQUE SAM
Para Optar el Grado Académico de
Magíster en Educación para la Salud

Arequipa - Perú
2016

Este trabajo lo quiero dedicar a Dios quien guía mi vida, a mis padres Sixto y María Rosa por enseñarme el valor de la honestidad, responsabilidad, lealtad y por darme siempre su apoyo.

A mis seres queridos que ya no están conmigo Manuela, Fortunata, Olga, Gilberto y Cecilia quienes siempre están presentes en mi corazón.

A mi esposo e hijos Alfredo, Alejandra, Alfredito y Diego por estar siempre conmigo.

A mis hermanos Marco y Sandra por darme su apoyo.

Que Dios los bendiga.

” Solo el conocimiento que llega desde dentro es el verdadero conocimiento”

Sócrates.

“La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia.”

Sócrates.

“Nunca he conocido a nadie tan ignorante que me fuese imposible aprender algo de él.”

Galileo Galilei



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
INTRODUCCION	IX
CAPITULO UNICO: RESULTADOS	1
1. CARACTERISTICAS DE LA POBLACION	2
2. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	8
3. SECUACIANCION MOLECULAR.....	16
4. DISCUSION Y COMENTARIOS.....	24
CONCLUSIONES.....	33
SUGERENCIAS.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	35
ANEXOS.....	38
1. ANEXO N.1 : PROYECTO DE TESIS	
2. ANEXO N. 2 : MATRIZ DE SISTEMATIZACION DE DATOS.	

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo identificar mediante la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de tuberculosis y determinar bacterias asociadas al *Mycobacterium* mediante secuenciación molecular. Se estudiaron 89 muestras de pacientes que llegaron al laboratorio de Biología Molecular con sospecha diagnóstica de tuberculosis. Las muestras fueron sometidas a extracción de ADN mediante el método fenol-cloroformo, la secuencias de inserción usada para la PCR fue IS6110. Los productos de PCR IS6110 se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La tinción de los geles se hizo con Bromuro de Etidio. Se visualizaron las bandas de 123 pb empleando un transiluminador UV. Se realizó la secuenciación de los genomas en el laboratorio Functional Biosciences, Inc en USA. Se muestran resultados mediante estadística descriptiva.

Las muestras obtenidas en casos de sospecha de diagnóstico de tuberculosis procedieron principalmente de biopsias de mama (28.09%), o de hisopado faríngeo (19.10%). En 13.48% de casos fueron muestras de esputo, 12.36% procedieron de muestras de líquido pleural y en 4.49% de líquido ascítico. En la misma proporción se trató de muestras de orina o de suero o plasma sanguíneo, en 3.37% eran de líquido cefalorraquídeo, y en 2.25% de casos de lavado bronquial o de líquido pericárdico. Se identificó que 30.34% de muestras tenían genes correspondientes a *M. tuberculosis*. El 35.29% de muestras de hisopado faríngeo fueron positivas, así como 20% de biopsias de mama, 33.33% de muestras de esputo, 36.36% de muestras de líquido pleural, y 75% de muestras de líquido ascítico, así como en plasma / suero. También lo fueron el 50% de muestras de líquido

pericárdico y la muestra de líquido sinovial (100%). El resto de muestras fueron negativas. La secuenciación genética para identificación de especies bacterianas acompañantes, obtuvo 11 resultados positivos. En las 5 muestras de mama positivas para *M. tuberculosis*, 4 (80%) mostraron presencia de bacterias, entre las que se encuentran *Acinetobacter* sp., *B. cepacia*, *P. chinense* y *S. marcescens*. Dos de las 6 muestras de hisopado faríngeo (33.33%) positivas para *M. tuberculosis* mostraron presencia de *B. paraconglomeratum* y de *R. picketti*. Igualmente en plasma positivo a *M. tuberculosis*, en una muestra (33.33%) se identificó a *Bacillus Niacini*. Y en la única muestra de líquido sinovial, el germen asociado fue *Veillonella* sp.

Se concluye que la positividad del PCR para la detección de tuberculosis es alta, y que existe una diversa microbiota acompañante en diferentes muestras evaluadas

PALABRAS CLAVE: tuberculosis – PCR – flora acompañante – secuenciación genética.

ABSTRACT

The present research aimed to identify using the technique of polymerase chain reaction (PCR) the presence of *Mycobacterium tuberculosis* in patients samples with suspected diagnosis of tuberculosis and determining bacteria associated with molecular sequencing. 89 samples from patients who arrived at the laboratory of Molecular Biology with suspected diagnosis of tuberculosis were studied. Clinical specimens were subjected to DNA extraction using phenol-chloroform method, the insertion sequences used for PCR was IS6110. IS6110 PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gel 2%. The staining of the gels was done with Ethidium bromide. The bands of 123 pb using a UV transilluminator was visualized. The sequencing of genomes was Functional Biosciences, Inc. laboratory in USA. Results through descriptive statistics are shown.

Samples taken in cases of suspicion of diagnosis of tuberculosis came mainly from breast biopsies (28.09%), or pharyngeal swab (19.10%). In 13.48% of cases were samples of sputum, 12.36% came from pleural fluid samples and at 4.49% of ascites fluid. The same proportion sought samples of urine or serum or blood plasma, 3.37% were of cerebrospinal fluid, and 2.25% of cases of bronchial lavage or pericardial fluid. 30.34% of samples had corresponding to *M. tuberculosis* genes. The 35.29% of samples of pharyngeal swab were positive, as well as 20% of breast biopsies, 33.33% of sputum specimens, 36.36% of pleural fluid samples, and 75% of samples of ascites fluid, as well as plasma / serum. There were also 50% of samples of pericardial fluid and the synovial fluid sample (100%). The rest of the samples were negative. Genetic sequencing for bacterial species identification guides, obtained 11 positive results. In the 5 breast specimens positive for *M. tuberculosis*, 4 (80%) showed presence of bacteria, which

include *Acinetobacter* sp., *B. Cepacia*, *P. Chinense* and *S. Marcescens*. Two of the 6 samples of pharyngeal swab (33.33%) positive for *M. tuberculosis* showed presence of *B. paraconglomeratum* and *R. picketti*. Also in plasma positive for *M. tuberculosis*, in a sample (33.33%) identified *Bacillus Niacini*. And in the only sample of synovial fluid, the associate germ was *Veillonella* sp.

It is concluded that the positivity of PCR for the detection of tuberculosis is high, and that there is a different companion microbiota in the different samples evaluated.

KEY WORDS: tuberculosis - PCR - flora companion - genetic sequencing.

PALABRAS CLAVE: tuberculosis – PCR – flora acompañante – secuenciación genética.



INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es actualmente un serio problema de Salud Pública, según cifras de la Organización Mundial de la Salud, un tercio de la población mundial estaría infectado con el *Mycobacterium tuberculosis*.¹ Representa una causa importante de morbilidad y genera grandes costos en salud en todo el mundo.

El diagnóstico laboratorial de tuberculosis se basa en la identificación microscópica de los bacilos ácido-alcohol resistentes, este método de diagnóstico carece de sensibilidad y especificidad, se necesita más de 10 000 bacilos / ml para poder ser identificado, esta sensibilidad, se ve disminuida más aun en casos de tuberculosis pulmonar paucibacilar y extrapulmonar.

El estándar de oro para el diagnóstico de tuberculosis sigue siendo el cultivo con una sensibilidad entre 80 al 96%, esta sensibilidad al igual que en la baciloscopia disminuye en muestras con menor carga bacilar y en muestras de tuberculosis extrapulmonar. Sin embargo uno de los mayores problemas del cultivo es el tiempo que requiere para aislar a la *Mycobacteria* que puede ser entre 8 a 12 semanas.

¹ Wong, Paolo; Puray, Maritza; Gonzales, Arturo; Sevilla, Carlos R. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú Revista Peruana de Epidemiología, vol. 15, núm. 1, abril, 2011, pp. 6-16.

Las limitaciones de estos dos métodos diagnósticos tradicionales han llevado en estas dos últimas décadas a desarrollar nuevas tecnologías para el diagnóstico de Tuberculosis. El desarrollo de pruebas moleculares para el diagnóstico de tuberculosis surge como una buena alternativa. Así tenemos la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) con gran sensibilidad, que en condiciones óptimas puede detectar de 1 a 10 microorganismos, esta prueba se presenta como un método rápido de diagnóstico, con una especificidad cercana 100% y una sensibilidad en muestras respiratorias con baciloscopias positivas (mayor a 95%).²

Las pruebas moleculares nos permiten caracterizar e identificar microorganismos en 24-48 horas, incluyendo microorganismos no cultivables, analizando la secuencia total de nucleótidos de su genoma, resultando útil en la investigación epidemiológica de la tuberculosis.

El diagnóstico de Tuberculosis pulmonar no excluye la posibilidad de coexistir con otras enfermedades infectocontagiosas, estos casos de coinfección son fuentes de contagio para el personal de la Salud, la identificación de estos microorganismos patógenos coexistentes pueden ser diagnosticados mediante pruebas moleculares.³

² Selman B. Carolina, Poggi M. Helena, Román Juan C., García C. Patricia y Lagos. L. Marcela. Análisis Retrospectivo del Rendimiento de Amplicor-PCR® para la detección de Mycobacterium tuberculosis en muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa. Rev. Chil. Infect. 2009; 26 (6): 495-498

³ Marín Ortiz Cristina, Aristizábal Beatriz Helena, Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis, Medicina U.P.B. Julio-Diciembre 2013. 32(2) 144-150 pág.

Se presenta en el capítulo uno los resultados de la investigación; se analizaron 89 muestras, el mayor porcentaje de muestras recepcionadas corresponden al sexo femenino (60.67%), el porcentaje de muestras positivas para el diagnóstico de tuberculosis mediante la Reacción de Cadena de Polimerasa fue de 30.34%. La secuenciación molecular identificó a 8 bacterias asociadas al *Mycobacterium Tuberculosis* (38.10%). Se realiza la discusión de los hallazgos, seguido de las conclusiones a las que se arribó con la investigación.



CAPÍTULO ÚNICO.
RESULTADOS



1. Características de la Población de las muestras analizadas

Tabla 1

Distribución de los pacientes evaluados según sexo

Sexo	N°	%
Varones	35	39.33%
Mujeres	54	60.67%
Total	89	100.00%

Se analizaron 89 muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de tuberculosis que llegaron al laboratorio de Biología Molecular, la distribución de las muestras obtenidas según el sexo de los pacientes fue, el 60.67% de casos fueron mujeres y el 39.33% varones. Estos porcentajes concuerdan con diferentes datos obtenidos en diferentes estudios realizados, en los que se evidencia que el sexo femenino acude más a los centros de salud en comparación al sexo masculino, según los resultados esto puede deberse a que las mujeres son más conscientes del cuidado de su salud y su familia.

Gráfico 1

Distribución de los pacientes evaluados según sexo

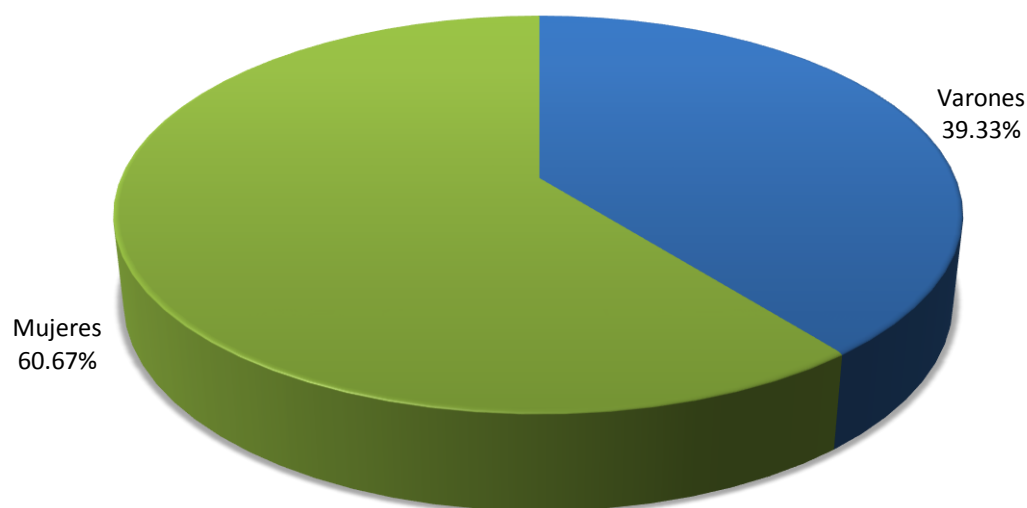


Tabla 2
Distribución de muestras evaluadas

Muestra	N°	%
Biopsia de mama	25	28.09%
Hisopado faríngeo	17	19.10%
Espujo	12	13.48%
Líquido Pleural	11	12.36%
Líquido ascítico	4	4.49%
Orina	4	4.49%
Líquido Céfal Raquídeo	3	3.37%
Suero / Plasma	4	4.49%
Lavado bronquial	2	2.25%
Líquido Pericárdico	2	2.25%
Aspirado de nódulo	1	1.12%
Líquido Sinovial	1	1.12%
Líquido tumoración	1	1.12%
Secreción Fístula	1	1.12%
Secreción Tumoración	1	1.12%
Total	89	100.00%

Las muestras recepcionadas en casos de sospecha de diagnóstico de tuberculosis, principalmente provienen de biopsias de mama (28.09%), o de hisopado faríngeo (19.10%). En 13.48% de casos fueron muestras de esputo, 12.36% procedieron de muestras de líquido pleural y en 4.49% de líquido ascítico. A diferencia de otros estudios donde se encontró que el mayor porcentaje de muestras de origen extrapulmonar fueron de sangre y de orina.

Gráfico 2

Distribución de muestras evaluadas

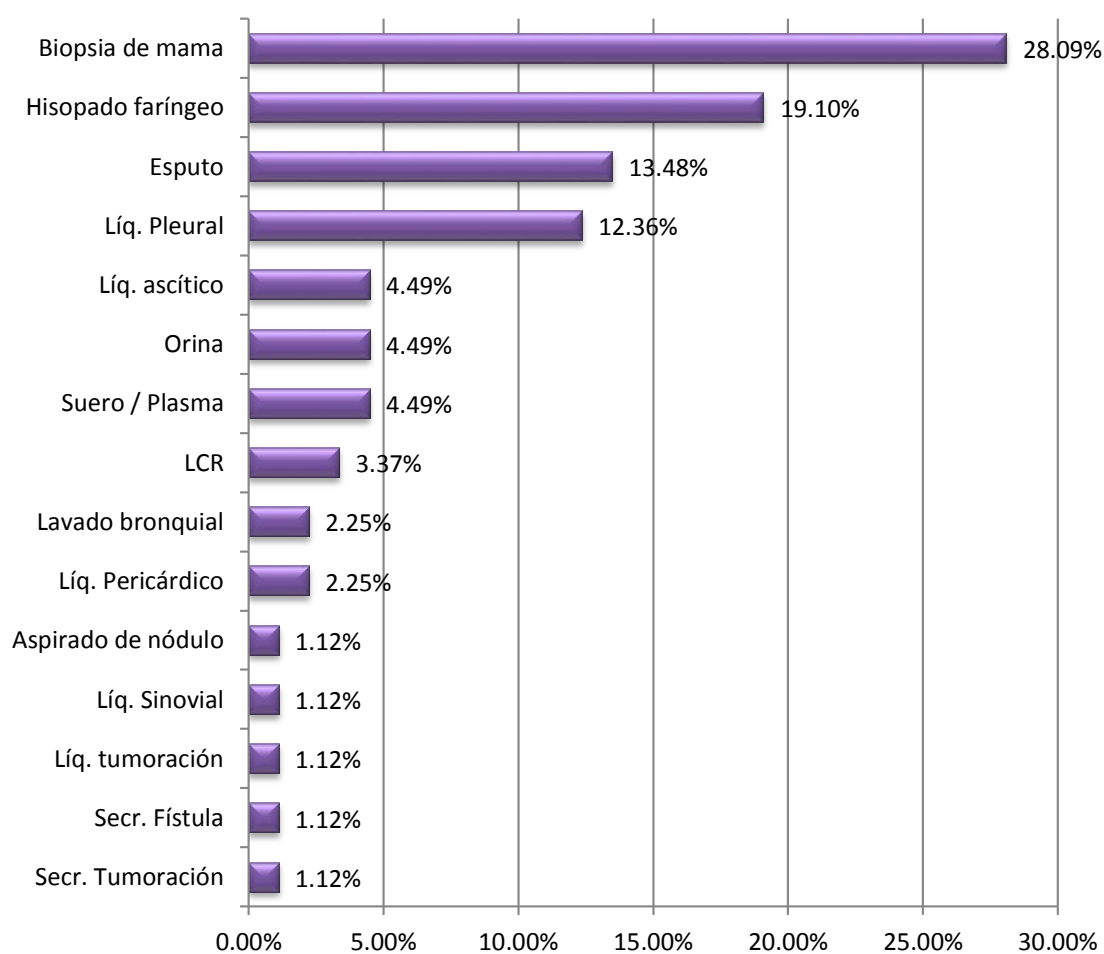


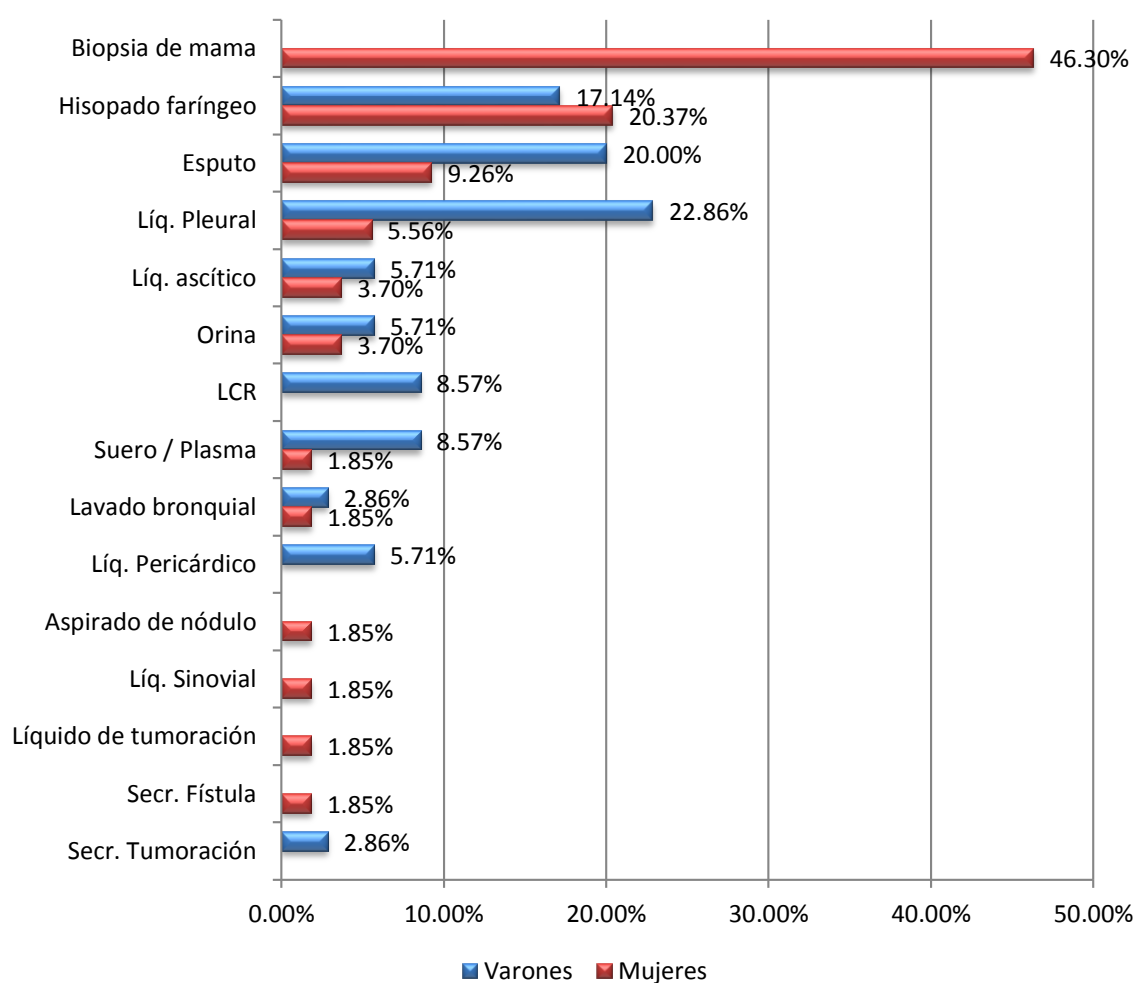
Tabla 3
Distribución de muestras evaluadas según sexo de los pacientes

Muestra	Varones		Mujeres		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
Biopsia de mama	0	0.00%	25	46.30%	25	28.09%
Hisopado faríngeo	6	17.14%	11	20.37%	17	19.10%
Espujo	7	20.00%	5	9.26%	12	13.48%
Líquido Pleural	8	22.86%	3	5.56%	11	12.36%
Líquido ascítico	2	5.71%	2	3.70%	4	4.49%
Orina	2	5.71%	2	3.70%	4	4.49%
Líquido Céfal Raquídeo	3	8.57%	0	0.00%	3	3.37%
Suero / Plasma	3	8.57%	1	1.85%	4	4.49%
Lavado bronquial	1	2.86%	1	1.85%	2	2.25%
Líq. Pericárdico	2	5.71%	0	0.00%	2	2.25%
Aspirado de nódulo	0	0.00%	1	1.85%	1	1.12%
Líquido Sinovial	0	0.00%	1	1.85%	1	1.12%
Líquido tumoración	0	0.00%	1	1.85%	1	1.12%
Secreción Fístula	0	0.00%	1	1.85%	1	1.12%
Secreción Tumoración	1	2.86%	0	0.00%	1	1.12%
Total	35	100.00%	54	100.00%	89	100.00%

La procedencia de las muestras según el sexo de los pacientes; en varones las muestras provinieron sobre todo de líquido pleural (22.86%), y esputo (20%). Entre las mujeres, el 46.30% de muestras eran de biopsia mama, seguidas de 20.37% de hisopado faríngeo, entre otras. La tuberculosis de mama es una patología rara y se presenta con poca frecuencia.

Gráfico 3

Distribución de muestras evaluadas según sexo de los pacientes



2. Reacción en Cadena de Polimerasa

Tabla 4

**Positividad de la Reacción de Cadena de Polimerasa en la identificación de
Micobacterium tuberculosis en los pacientes evaluados**

	N°	%
Positivo	27	30.34%
Negativo	62	69.66%
Total	89	100.00%

De un total de 89 muestras recepcionadas que llegaron al Laboratorio de Biología Molecular, 30.34% fueron positivas para Mycobacterium Tuberculosis, mediante la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR).

Gráfico 4

**Positividad de la Reacción de Cadena de Polimerasa en la identificación de
Micobacterium tuberculosis en las muestras evaluados**

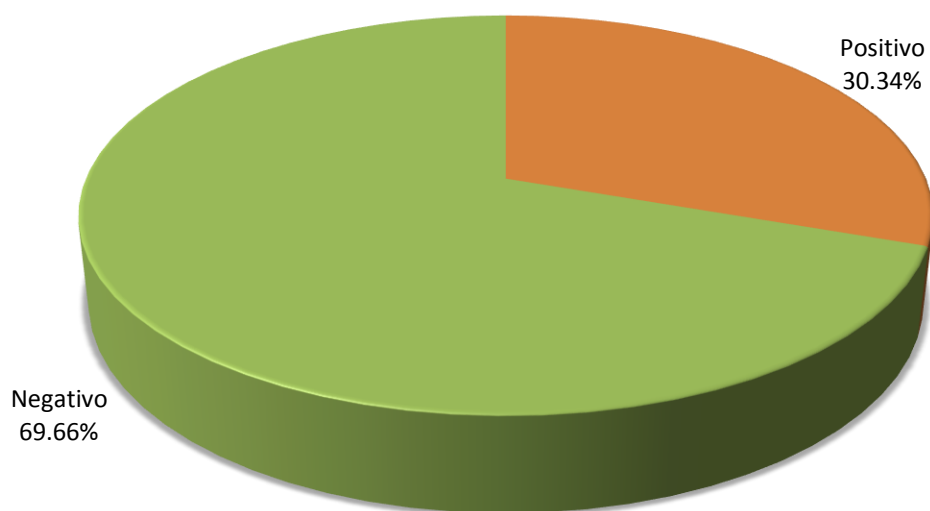


Tabla 5

**Positividad de la Reacción de Cadena de Polimerasa para la detección de
Micobacterium tuberculosis sexo masculino**

	N°	%
Positivo	13	37.15%
Negativo	22	62.857%
Total	35	100.00%

El sexo masculino presentó 13 casos positivos con un porcentaje del 37.15%, la tuberculosis, según la Organización Mundial de la Salud se diagnostica más en hombres que en mujeres, esto puede deberse a diferencias epidemiológicas, como riesgo de infección, exposición.⁴

⁴ www.who.int/tb/challenges/gender/page_1/es/

Grafico 5

Positividad del Reacción de Cadena de Polimerasa para la detección de *M. tuberculosis* sexo masculino

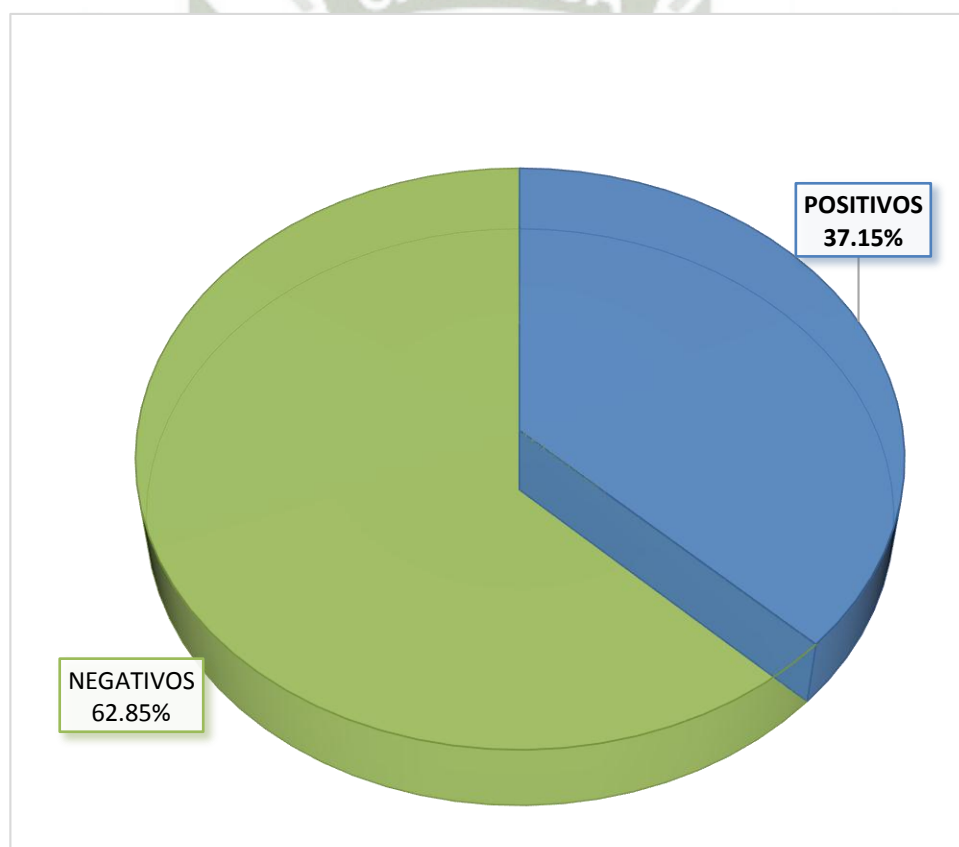


Tabla 6

**Positividad de la Reacción de Cadena de Polimerasa para la detección de
Mycobacterium tuberculosis sexo femenino**

	N°	%
Positivo	14	25.92%
Negativo	40	74.07%
Total	54	100.00%

El 25.92% de muestras correspondientes al sexo femenino fueron positivas, porcentaje menor que el presentado en el sexo masculino, según la Organización Mundial de la Salud, la tuberculosis es menos frecuente en mujeres que en hombres, sin embargo es una de las infecciones que más mortalidad femenina acarrea.⁵

⁵ www.who.int/tb/challenges/gender/page_1/es/

Grafico 6

Positividad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de *M. tuberculosis* sexo femenino

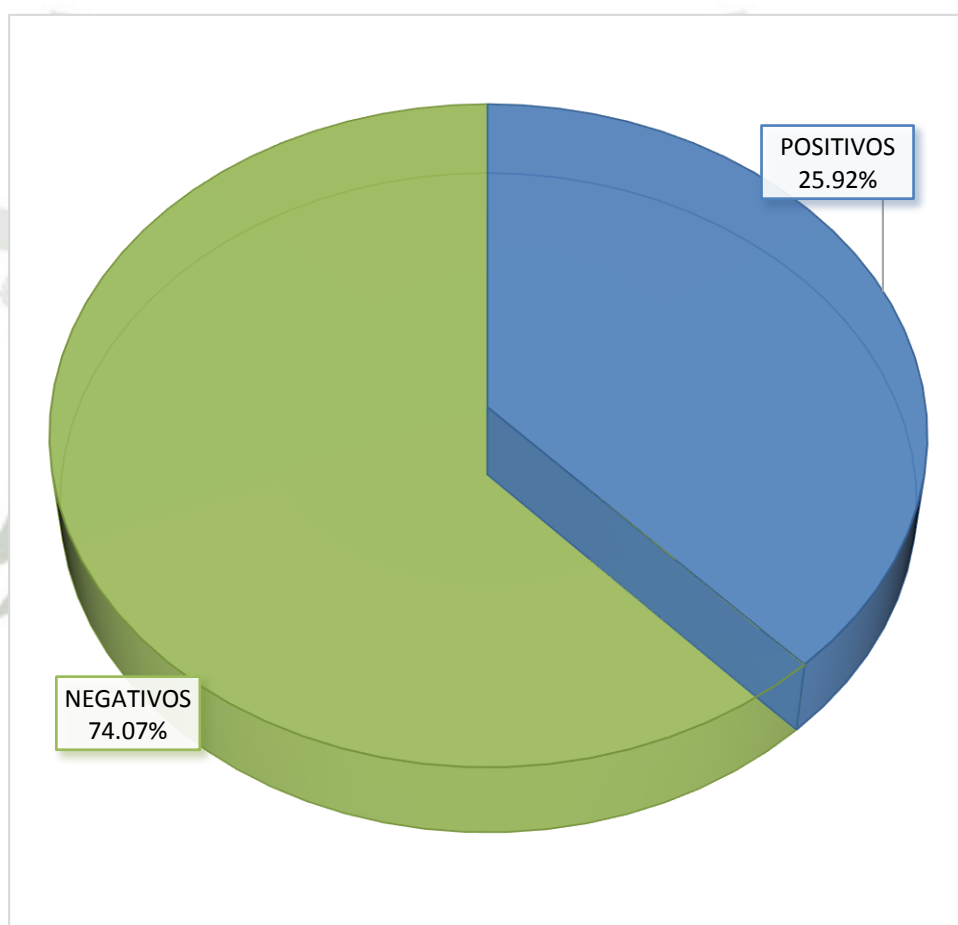


Tabla 7

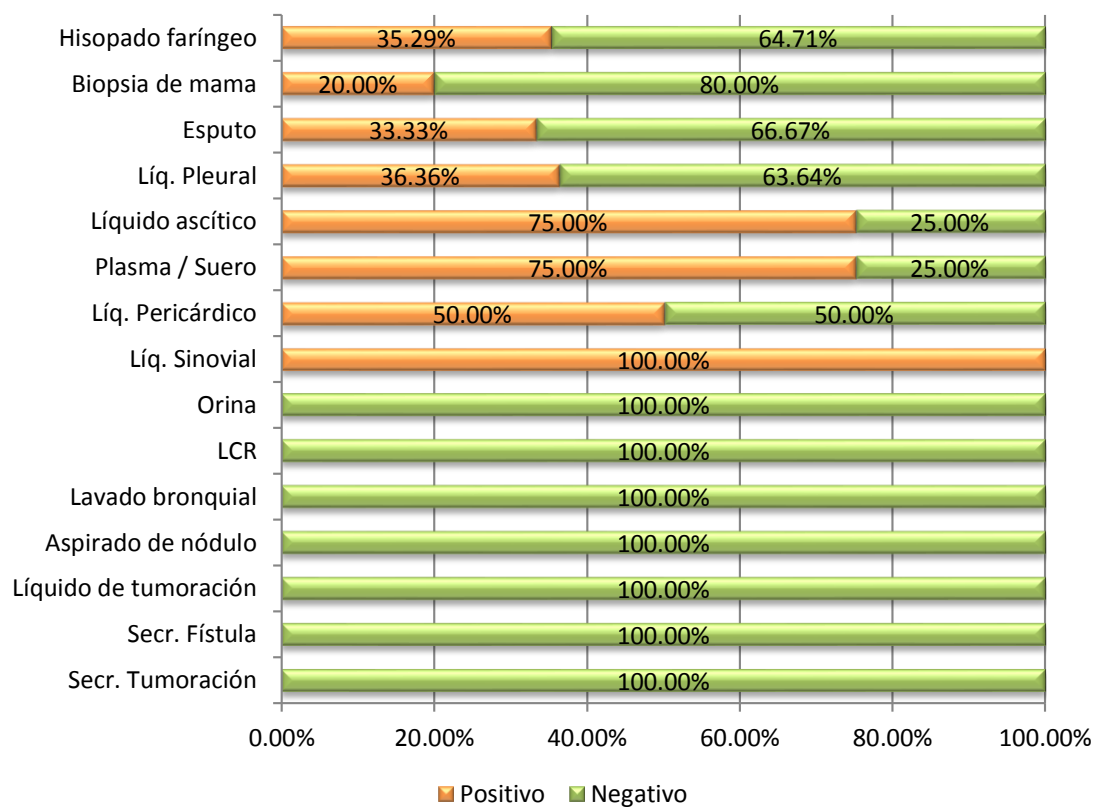
Positividad de la Reacción de Cadena de Polimerasa para la detección de *M. tuberculosis* según muestra evaluada

Muestra	Total	Positivo		Negativo	
		Nº	%	Nº	%
Hisopado faríngeo	17	6	35.29%	11	64.71%
Biopsia de mama	25	5	20.00%	20	80.00%
Espujo	12	4	33.33%	8	66.67%
Líquido Pleural	11	4	36.36%	7	63.64%
Líquido ascítico	4	3	75.00%	1	25.00%
Plasma / Suero	4	3	75.00%	1	25.00%
Líquido Pericárdico	2	1	50.00%	1	50.00%
Líquido Sinovial	1	1	100.00%	0	0.00%
Orina	4	0	0.00%	4	100.00%
Líquido Céfalorraquídeo	3	0	0.00%	3	100.00%
Lavado bronquial	2	0	0.00%	2	100.00%
Aspirado de nódulo	1	0	0.00%	1	100.00%
Líquido de tumoración	1	0	0.00%	1	100.00%
Secreción Fístula	1	0	0.00%	1	100.00%
Secreción Tumoración	1	0	0.00%	1	100.00%

El 35.29% de muestras de hisopado faríngeo fueron positivas, así como 20% de biopsias de mama, 33.33% de muestras de esputo, 36.36% de muestras de líquido pleural. La Tuberculosis de mama es poco frecuente, su incidencia aumenta en zonas endémicas y en pacientes inmunodeprimidos.

Gráfico 7

Positividad del PCR para la detección de *M. tuberculosis* según muestra evaluada



3. Secuenciación Molecular

Tabla 8

Presencia de especies bacterianas en muestras positivas para Mycobacterium Tuberculoso por Reacción de Cadena de la Polimerasa.

	N°	%
Positivo	8	38.10%
Negativo	13	61.90%
Total	21	100.00%

En el 38.10% de las muestras recepcionadas positivas para Mycobacterium tuberculoso, se lograron aislar bacterias asociadas a este. La presencia de otras bacterias en muestras de pacientes con diagnóstico de tuberculosis se ha reportado en otros estudios.

Gráfico 8

**Presencia de especies bacterianas en muestras positivas para Mycobacterium
Tuberculosis por Reacción de Cadena de la Polimerasa.**

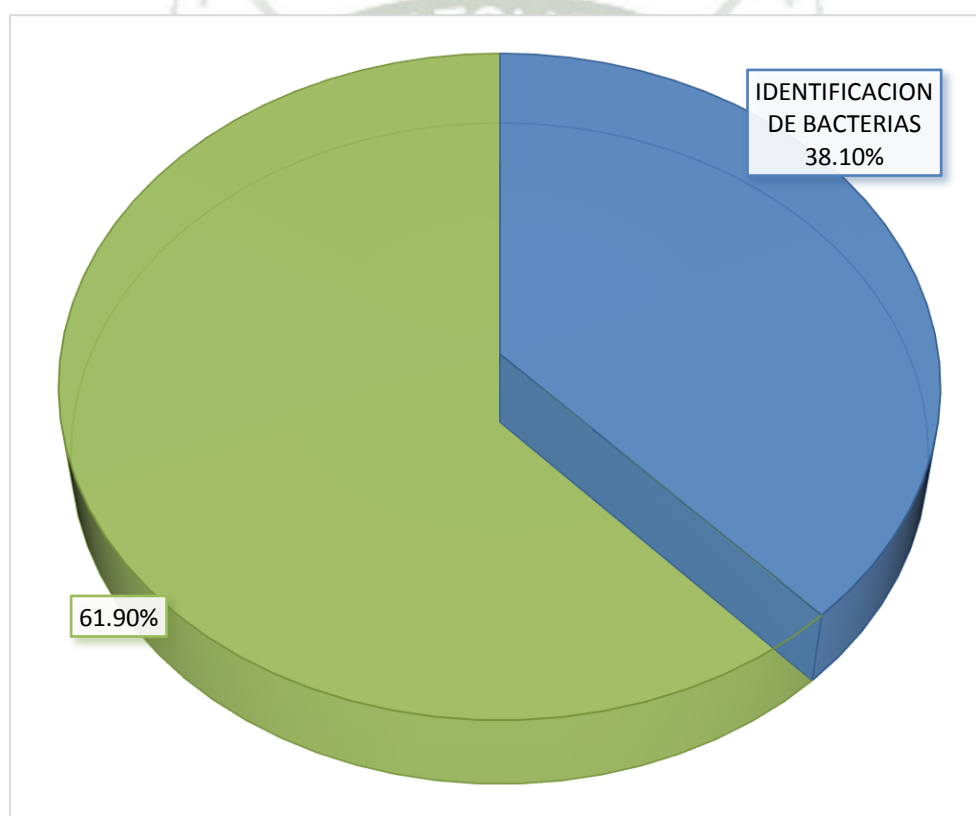


Tabla 9

**Presencia de especies bacterianas en muestras negativas para Mycobacterium
Tuberculoso por Reacción de Cadena de la Polimerasa.**

	N°	%
Positivo	3	9.52%
Negativo	19	90.48%
Total	21	100.00%

La presencia de bacterias asociadas a muestras de pacientes con resultado negativo a la Reacción de Cadena de Polimerasa, solo fue positiva en 3 de las muestras de estudio.

Gráfico 9

**Presencia de especies bacterianas en muestras negativas para Mycobacterium
Tuberculosis por Reacción de Cadena de la Polimerasa.**

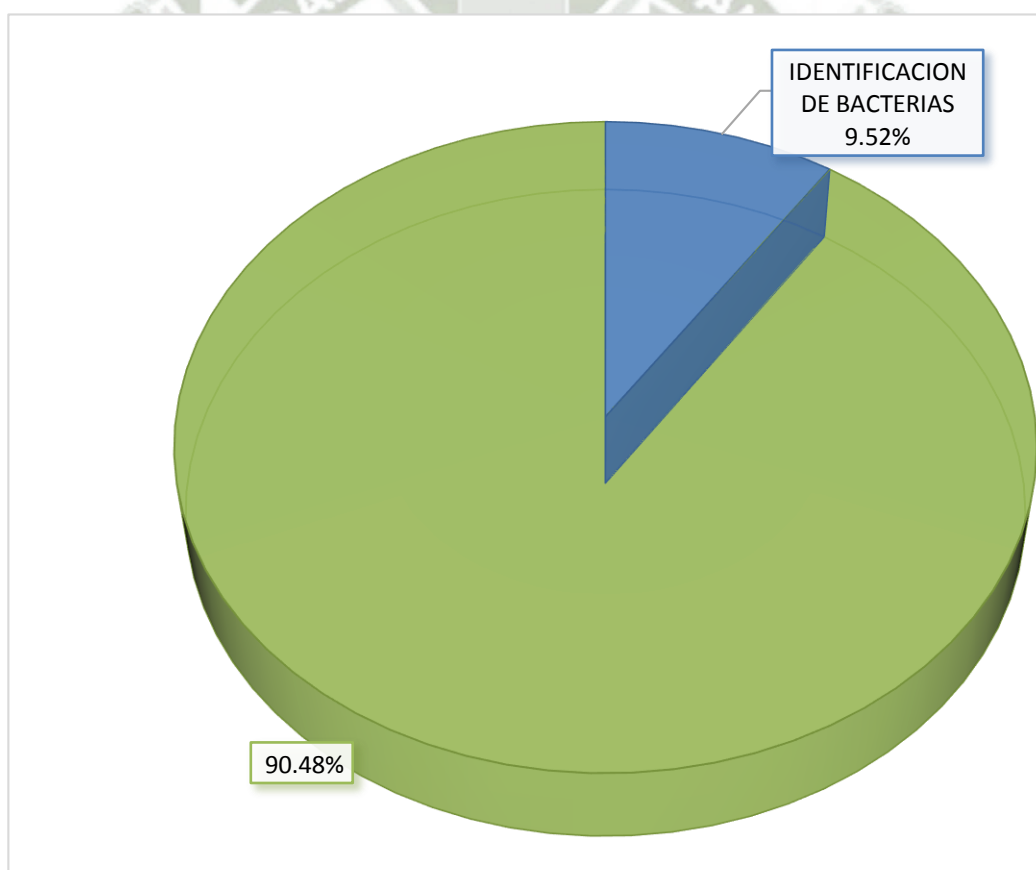


Tabla 10

**Resultados de la identificación de especies en muestras positivas y negativas para
Mycobacterium Tuberculoso.**

	N°
PCR (+)	
(n = 8)	Acinetobacter sp. 1
	Bacillus niacini 1
	Brachybacterium paraconglomeratum 1
	Burkholderia cepacia 1
	Plaomicrobium chinense 1
	Ralstonia picketti 1
	Serratia marcescens 1
	Veillonella sp. 1
PCR (-)	
(n = 3)	Bacillus pumilus 1
	Delftia sp. 1
	Brevundimonas bullata 1
Total	11

La tabla número 10 nos muestra las bacterias aisladas mediante la secuenciación molecular tanto en muestras positivas para tuberculosis mediante la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa como en muestras negativas. Las bacterias aisladas fueron muy variadas y se presentaron en mayor número en muestras positivas.

Gráfico 10

**Resultados de la identificación de especies en muestras positivas y negativas para
Mycobacterium Tuberculosis.**

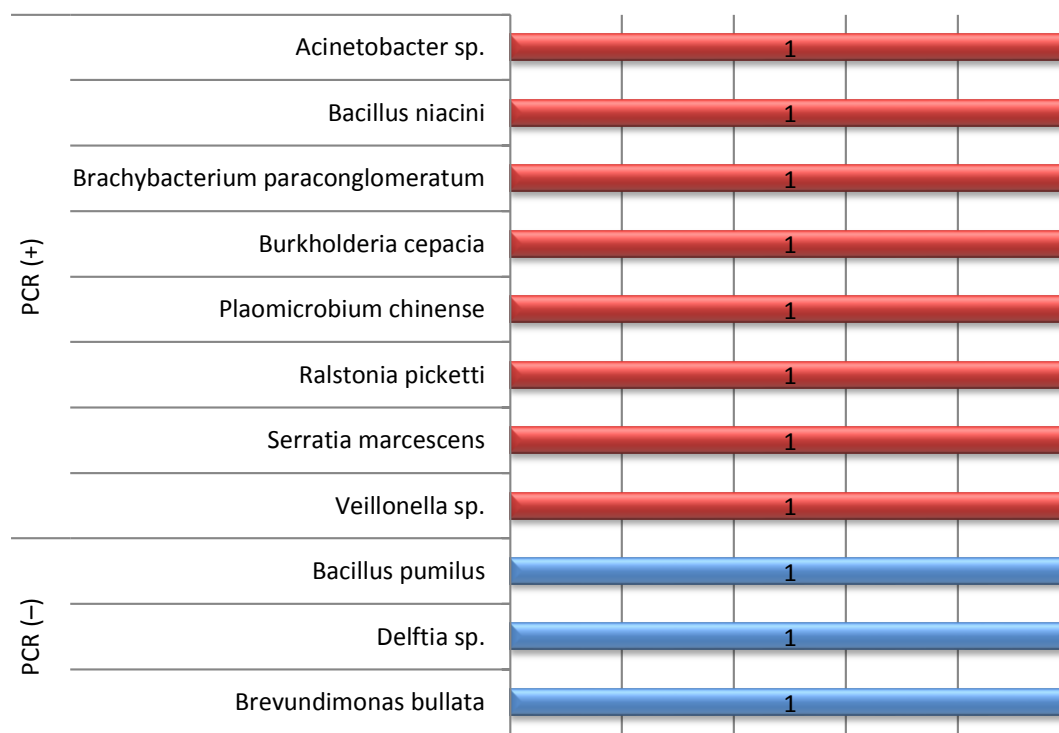


Tabla 11

Presencia de especies bacterianas en muestras positivas para *M. tuberculosis* por muestras procesadas

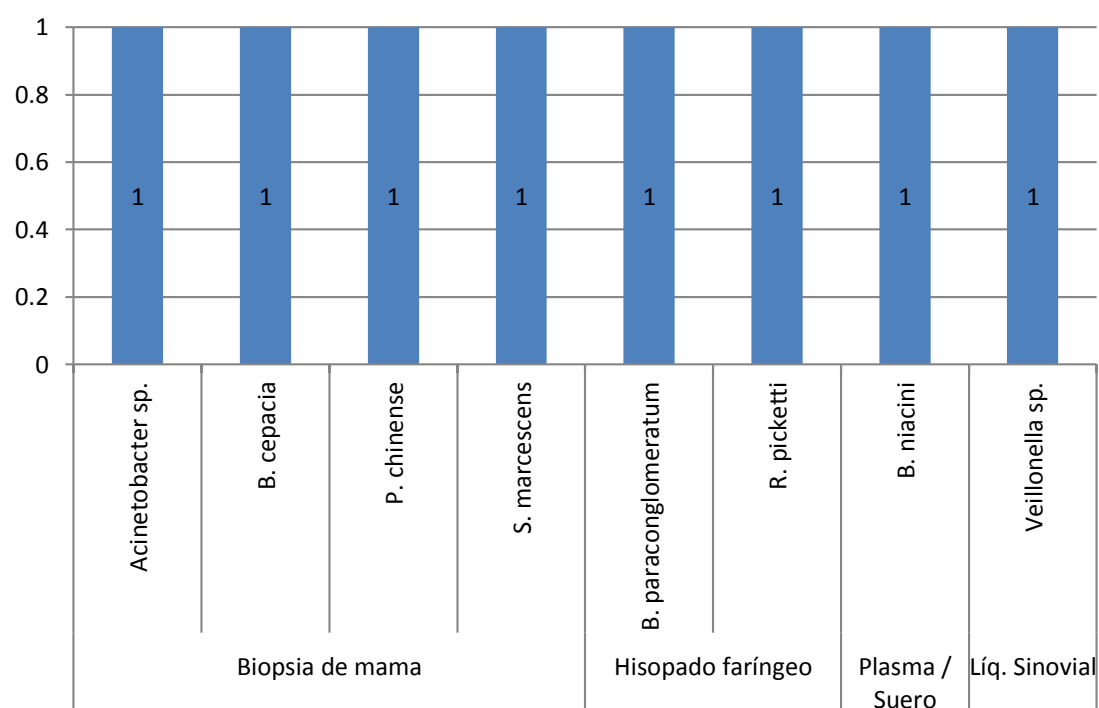
	Bacteria	N°
Biopsia de mama (n = 5)	Acinetobacter sp.	1
	Burkholderia cepacia	1
	Planomicrobium chinense	1
	Serratia marcescens	1
	Ninguna	1
Hisopado faríngeo (n = 6)	Brachybacterium paraconglomeratum	1
	Ralstonia picketti	1
	Ninguna	4
Plasma / Suero (n = 3)	Bacillus niacini	1
	Ninguna	2
Líqu. Sinovial (n = 1)	Veillonella sp.	1

El mayor número de bacterias asociadas al diagnóstico de tuberculosis se aislaron en muestras de biopsias de mama. Seguidas por las muestra de hisopado faríngeo.

Acinetobacter sp. Burkholderia Cepacia, Serratia Marcescens y la Ralstonia Picketti son bacilos gran negativos que pueden comportarse como patógenos oportunistas. La Veillonella es un anaerobio estricto que pueden comportarse también como patógeno oportunistas en pacientes inmunocomprometidos.

Gráfico 11

Presencia de especies bacterianas en muestras positivas para *M. tuberculosis* por muestras procesadas.



4. Discusión y Comentarios.

Según el informe regional de la Organización Panamericana de la Salud publicado en el año 2013 el Perú ocupó el primer lugar de casos nuevos registrados de tuberculosis en los países Andinos de América del Sur en el año 2011. También registró el mayor número de casos de tuberculosis multidrogoresistente.⁶

Una de las principales limitaciones de las pruebas convencionales para el diagnóstico de tuberculosis es su baja sensibilidad y especificidad, en los últimos años las técnicas moleculares en el diagnóstico de tuberculosis se han aplicado como una alternativa. Se han realizado diferentes estudios que demuestran la utilidad de la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa en la identificación *Mycobacterium tuberculosis*.

La finalidad del presente estudio es conocer los resultados obtenidos en el Laboratorio de Biología Molecular Uchumayo para el diagnóstico molecular del *Mycobacterium Tuberculosis* mediante la Reacción de Cadena de Polimerasa en pacientes con sospecha diagnóstica de tuberculosis y determinar si existen otras bacterias asociadas al diagnóstico de esta enfermedad mediante secuenciación molecular.

Se analizaron 89 muestras que llegaron al laboratorio de Biología Molecular entre Junio del 2013 a Julio del 2015 solicitando diagnóstico por Reacción en Cadena de Polimerasa para la identificación del *Mycobacterium Tuberculosis*. El laboratorio de

⁶ Tuberculosis en la región de las Américas Informe Regional 2012.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22954&Itemid=

Biología Molecular Uchumayo (Arequipa), recibe muestras del Hospital Regional Honorio Delgado, IREN Sur, de laboratorios particulares de las ciudades de Arequipa, Tacna, Cusco. Se analizaron muestras de esputo, hisopado faríngeo, biopsias de mama, liquido pleural, liquido ascítico, liquido pericárdico entre otras.

Para la extracción de ADN, se utilizó el método fenol-cloroformo, la secuencia de inserción usada para la Reacción de Cadena de Polimerasa fue IS6110 y se realizó según el método descrito por Eisenach et al 1990 y Nandagopal B. et al 2010. El ADN purificado de 21 muestras positivas y negativas para Mycobacterium Tuberculosis fue enviado al Laborataorio Functional Biosciences, Inc. en Wisconsin USA para su secuenciación y las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos Gen Bank.

De las 89 muestras recepcionadas, 54 correspondían a mujeres (60.67%). Este mayor porcentaje de muestras, correspondientes al sexo femenino, concuerdan con los resultados obtenidos en un estudio publicado en la Revista Infectio 2007 por Puerto Gloria y col. Se evaluaron 57 muestras mediante la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa para diagnóstico de Tuberculosis extrapulmonar y micobacteriosis, porcentaje de muestras procesadas correspondieron al sexo femenino⁷.

Esto podría deberse según lo publicado en la revista peruana de Medicina Experimental y de Salud Pública, sobre el “Uso de los Establecimientos de salud del Ministerio de Salud del Perú, 2009-2011”; en el que se evidenció que el sexo femenino acudió significativamente más a los centros de salud en comparación al sexo masculino

⁷ Puerto Gloria, Castro M. Claudia, Ribon Wellman. Reaccion en Cadena de la Polimerasa: contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. Asociación Colombiana de Infectología. Infectio 2007; 11(2):87-94

($p < 0,01$). Los resultados obtenidos, pueden deberse a que las mujeres son más conscientes del cuidado de su salud y su familia; asimismo sugieren evaluar otros factores que pudieran estar asociados, como la ocupación de las personas, debido a que en algunas oportunidades las personas podrían dejar de asistir a los servicios de salud porque están trabajando. Otro factor a investigar es la relación entre la percepción de enfermedad entre pobladores del sexo masculino y femenino, que podría estar influenciado por factores socioculturales.⁸

Los tipos muestras que se analizaron procedieron principalmente de biopsias de mama (28.09%) y de hisopado faríngeo (19.10%). En 13.48% de casos fueron muestras de esputo, 12.36% procedieron de muestras de líquido pleural y en 4.49% de líquido ascítico.

En la misma proporción se trató de muestras de orina o de suero o plasma sanguíneo, en 3.37% eran de líquido cefalorraquídeo, y en 2.25% de casos de lavado bronquial o de líquido pericárdico.

En casos aislados (1.12%) se trató de muestras de aspirado de nódulo, de líquido sinovial, de líquido de tumoración, de secreción de fístula o de una tumoración de brazo (Tabla y Gráfico 2). Los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con resultados realizados en diferentes estudios en los que se utilizó la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de Tuberculosis. Como se puede observar en el siguiente cuadro resumen.

⁸ Curioso Walter H., Pardo Karim, Valeriano Luis, Uso de los establecimientos de salud del Ministerio de Salud del Perú, 2009-2011 lima, Perú revista peruana de medicina experimental y salud pública. volumen 30 número 2 abril - junio 2013 pág. 175 - 180

PAIS	INSTITUCION	NUMERO DE MUESTRAS	TIPO DE MUESTRA	%
MÉXICO Rev. Panamericana de Salud Publica año 2000 ⁹	Instituto Mexicano del Seguro Social	252 muestras sospecha diagnóstica de TBC	Esputo Orina LCR L. Pleural	45% 38% 6% 2%
COLOMBIA Revista Infectio 2007 ¹⁰	Instituto Nacional de Salud de Bogotá.	57 muestras Sospecha diagnóstica TBC extra pulmonar	LCR Biopsia piel Esputo l. Pleural	46% 28% 7% 5%
BOLIVIA Revista de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. 2013 ¹¹	SELADIS	3771 muestras Dx TBC extrapulmonar.	Sangre Orina L. ascítico L. Pleural	60% 20% 7% 6%
Nuestro estudio. Arequipa 2016	Laboratorio de Biología Molecular Uchumayo	89 muestras de pacientes para el diagnóstico de Tuberculosis por PCR	Biopsia de mama Hisopado faríngeo Esputo Líquido Pleural	28% 19% 13% 11%

En todos los estudios de aplico la Reacción en Cadena de Polimerasa para la identificación del Mycobacterium Tuberculosis. Como se mencionó, los resultados obtenidos en nuestro estudio no concuerdan con los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados esto puede deberse a las características de la población de los diferentes estudios.

⁹ Moran Moguel María Cristina y Col. Detección de Mycobacterium Tuberculosis mediante la reacción de cadena de la polimerasa en una población seleccionada al noroccidente de México. Rev. Panamericana de Salud Pública 7 (6) 2000. Pág. 389 – 394.

¹⁰ Puerto Gloria, Castro M. Claudia, Ribon Wellman. Reacción en Cadena de la Polimerasa: contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. Asociación Colombiana de Infectología. Infectio 2007; 11(2):87-94

¹¹ Revollo Zepita, Susana; Taborga Manrique, Ximena; Diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Rev.Cs.Farm. Y Bioq. V.1 n.1 La Paz oct. 2013

La procedencia de las muestras en nuestro estudio según sexo; en varones las muestras provinieron sobre todo de líquido pleural (22.86%), de esputo (20%) y de hisopado faríngeo (17.14%). En las mujeres, el 46.30% de muestras eran de biopsia de mama, seguidas de 20.37% de hisopado faríngeo. (Tabla y Gráfico 3). En un estudio realizado por Puerto y Colb., en el que se procesaron 57 muestras, analizadas por Reacción de Cadena de la Polimerasa para el Diagnóstico de Tuberculosis Extra pulmonar, las muestras clínicas provinieron en mayor número para ambos sexos de líquido Céfalorraquídeo.¹²

Las pruebas de diagnóstico molecular de la TBC se basan en la amplificación de material genético bacilar¹³, estas pruebas en comparación con los métodos tradicionales permiten resultados más rápidos. Estos métodos no solo contribuyen con el diagnóstico, tipifican al *Micobacterium tuberculosis* y detectan la resistencia a drogas en estudios de tuberculosis.¹⁴.

El uso de la secuencia de inserción IS6110 y el gen *hsp65* pueden identificar cepas de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas^{15, 16}.

¹² Puerto Gloria, Castro M. Claudia, Ribon Wellman. Reacción en Cadena de la Polimerasa: contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. Asociación Colombiana de Infectología. Infectio 2007; 11(2):87-94

¹³ Instituto Vaccarenzza (Argentina). Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. 2010

¹⁴ Wong P, Puray M, Gonzales A, Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú Revista Peruana de Epidemiología, 2011; 15 (1): 6-16

¹⁵ Puerto G, Castro CM, Ribón W. Reacción en cadena de la polimerasa: una contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. Infectio 2007; 11(2): 87-94

¹⁶ Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P y cols. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiological Research, 2010; 165:211—220. doi:10.1016/j.micres.2009.05.001

En nuestro estudio como mencionamos se usó la secuencia de inserción IS6110, la extracción de ADN y la amplificación específica mediante la reacción en Cadena de la Polimerasa identificó que 30.34% de muestras fueron positivas para *Mycobacterium tuberculosis* (Tabla y Gráfico 4). Trece casos de 35 muestras de estudio fueron positivas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el sexo masculino 37.15% (tabla y Gráfico 5), en el sexo femenino el porcentaje de casos positivos es menor 25.92% (Tabla y Gráfico 6).

La proporción de positividad en las muestras estudiadas, que se observan en la Tabla y Gráfico 7 muestran que un 35.29% son muestras de hisopado faríngeo fueron positivas, así como 20% de biopsias de mama, 33.33% de muestras de esputo, 36.36% de muestras de líquido pleural.

Llama la atención el número de muestras de mama que se recibieron. La tuberculosis mamaria es una patología poco frecuente, la incidencia de tuberculosis mamaria en el mundo es baja 0.1 y 0.52% esta incidencia aumenta en zonas endémicas y en mujeres con el virus de Inmunodeficiencia adquirida. En el Perú representa un 2% del total de casos de tuberculosis extra pulmonar¹⁷. El Perú es uno de los países con mayor incidencia de Tuberculosis en América del Sur.¹⁸ En tal sentido uno de los países en con mayor riesgo a desarrollar tuberculosis mamaria. Gonzales (2013) cita el estudio realizado por Verde y Ormerod, se estudiaron a 436 pacientes con diagnóstico de tuberculosis, 10 de ellos fueron diagnosticados con tuberculosis mamaria, de estos, 3

¹⁷ Gonzales Muro Denys Janet, Campos Siccha, Ramírez Gutiérrez Raulins; Características Clínicas de la Tuberculosis Mamaria en Pacientes atendidas en un Servicio de Ginecoobstetricia 2002 – 2011. Revista Peruana de Ginecoobstetricia 2013; 59:107- 113

¹⁸ Tuberculosis en la región de las Américas Informe Regional 2012. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22954&Itemid=

tenían diagnóstico de sospecha clínica de tuberculosis y los otros 7, diagnóstico de cáncer de mama. Una de las recomendaciones dada por los autores, es incluir a la tuberculosis como parte del diagnóstico diferencial en patologías de mama.⁶ Las pruebas diagnósticas convencionales para tuberculosis no tienen un buen rendimiento en el diagnóstico de tuberculosis de mama, el cultivo es positivo en el 26% de las biopsias y la baciloscopia es positiva en un 12 %. Siendo las pruebas moleculares de mucha utilidad para estos casos.¹⁹

La otra técnica molecular que se utilizó en el presente estudio fue la secuenciación molecular, se secuencio el ADN de 21 muestras positivas y 21 muestras negativas según los resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para diagnóstico de la tuberculosis. Estas muestras fueron enviadas al Laboratorio Funcional Biosciences, Inc. En Wisconsin USA para su secuenciación. Los resultados de las secuencias de nucleótidos se compararon con las secuencias de las bases de datos Gen Bank con el objetivo de identificar bacterias asociadas al Mycobacterium Tuberculosis.

En las muestras positivas a tuberculosis 8 de las 21 muestras secuenciadas (38.10%) mostraron gérmenes asociados, entre las cuales se encuentran *Acinetobacter* sp., *Bacillus niacini*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Burkholderia cepacia*, *Plaomicrobium chinense*, *Ralstonia picketti*, *Serratia marcescens* y *Veillonella* sp. Sólo 3 de las 21 muestras negativas (9.52%) mostraron presencia de bacterias, con *Bacillus pumilus*, *Delftia* sp. y *Brevundimonas bullata*. (Tabla y Grafico 8, 9 y 10)

¹⁹ Cuervo Sonia Isabel, Bonilla Diego Andrés, Murcia Martha Isabel, Hernández Johana, Gómez Julio Cesar. Mastitis Tuberculosa. Presentación de Casos Clínico. Biomédica (online) 2013, vol. 33, n1 pp 36-41.

En la Tabla y Gráfico 10 se muestra la identificación de bacterias en muestras positivas en el PCR para *M. tuberculosis*; en las 5 muestras de mama, 4 (80%) mostraron presencia de bacterias, entre las que se encuentran *Acinetobacter* sp., *B. cepacia*, *P. chinense* y *S. marcescens*. Dos de las 6 muestras de hisopado faríngeo (33.33%) mostraron presencia de *B. paraconglomeratum* y de *R. picketti*. Igualmente en plasma positivo a *M. tuberculosis*, en una muestra (33.33%) se identificó a *Bacillus niacini*. Y en la única muestra de líquido sinovial, el germen asociado fue *Veillonella* sp.

En muestras obtenidas de esputo en tuberculosis pulmonar, se describe la presencia de una microbiota compleja; en un estudio realizado por Cui y cols ²⁰. Empleando secuenciación por el método 454 pyro-sequencing en 71928 amplicones de PCR de 31 muestras clínicas de esputo de pacientes con TBC pulmonar y 24 pacientes sanos, se demostró que la microbiota de esputo de pacientes con TBC pulmonar fue más diversa que en participantes sanos ($p < 0.05$). Muchas bacterias extrañas, como *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Thermus*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Diaphorobacter*, *Comamonas*, y *Mobilicoccus*, fueron exclusivas de pacientes con tuberculosis pulmonar.

Bernal Cardero y Colb realizaron un estudio transversal estudiaron 21 muestras de pacientes venezolanos y bolivianos con el Diagnóstico de Tuberculosis pulmonar. El objetivo era determinar la presencia de otras enfermedades infectocontagiosas en estos

²⁰ Cui Z, Zhou Y, Li H, Zhang Y, Zhang S y cols. Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis. BMC Microbiology 2012, 12:276

pacientes. Se concluyó que el diagnóstico de tuberculosis pulmonar no excluye la posibilidad de coexistir con otras enfermedades infecciosas.²¹



²¹ Bernal Cardero Migdalia Elena, Mora Paz Santiago, Tamayo Carbonel Dania Bárbara, Cardet Escalona Mauro Ramón; Asociación de tuberculosis pulmonar con otras enfermedades infecto contagiosas. Med Cient Holg 2008; 12(5).

CONCLUSIONES

- Primera.** Mediante la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa se identificó la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en 30.43% de pacientes con sospecha diagnóstica de Tuberculosis.
- Segunda.** Se identificó la presencia de bacterias asociadas a *Mycobacterium tuberculosis* en el 38.10% de muestras positivas mediante la técnica de Secuencia Molecular.

SUGERENCIAS

- 1) Se recomienda el uso de la Reacción en Cadena de Polimerasa en pacientes con sospecha diagnóstica de tuberculosis extrapulmonar y en niños, además de los métodos tradicionales de diagnóstico.
- 2) Se sugiere por los resultados obtenidos sobre todo en pacientes inmunocomprometidos descartar la presencia de otras bacterias que pudieran causar enfermedades infectocontagiosas asociadas.
- 3) Se sugiere realizar estudios epidemiológicos moleculares con el fin de contribuir al conocimiento de la tuberculosis.
- 4) Se sugiere direccionar los recursos financieros en investigación en temas prioritarios de salud como Tuberculosis, VIH, desnutrición infantil, esto contribuirá a obtener datos para un mejor control y manejo de estas patologías.
- 5) Se sugiere elaborar programas de divulgación sobre tuberculosis por grupos socio culturales con el fin de generar nuevos conocimientos en prevención, formas de contagio y nuevos métodos de diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P y cols. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of Mycobacterium tuberculosis complex. Microbiological Research, 2010; 165:211—220. doi:10.1016/j.micres.2009.05.001
2. Bernal Cardero Migdalia Elena, Mora Paz Santiago, Tamayo Carbonel Dania Bárbara, Cardet Escalona Mauro Ramón; Asociación de tuberculosis pulmonar con otras enfermedades infecto contagiosas. Corr Med Cient Holg 2008; 12(5). Cuervo Sonia Isabel, Bonilla Diego Andrés, Murcia Martha Isabel, Hernández Johana, Gomez Julio Cesar. Mastitis Tuberculosa. Presentación de Casos Clínico. Biomédica (online) 2013, vol 33, n1 pp 36-41.
3. Cui Z, Zhou Y, Li H, Zhang Y, Zhang S y cols. Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis. BMC Microbiology 2012, 12:276
4. Curioso Walter H., Pardo Karim, Valeriano Luis, Uso de los establecimientos de salud del Ministerio de Salud del Perú, 2009-2011 lima, Perú revista peruana de medicina experimental y salud pública. volumen 30 número 2 abril - junio 2013 pág. 175 - 180
5. Gonzales Muro Denys Janet, Campos Siccha, Ramírez Gutiérrez Raulins; Características Clínicas de la Tuberculosis Mamaria en Pacientes atendidas en un Servicio de Ginecoobstetricia 2002 – 2011. Revista Peruana de Ginecoobstetricia 2013; 59:107- 113

6. Instituto Vaccarenzza (Argentina). Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. 2010
7. Marín Ortiz Cristina, Aristizábal Beatriz Helena, Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis, Medicina U.P.B. Julio-Diciembre 2013. 32(2) 144-150 pág.
8. Moran Moguel María Cristina y Col. Detección de Mycobacterium Tuberculosis mediante la reacción de cadena de la polimerasa en una población seleccionada al noroccidente de México. Rev. Panamericana de Salud Pública7 (6) 2000. Pág. 389 – 394
9. Puerto Gloria, Castro M. Claudia, Ribon Wellman. Reacción en Cadena de la Polimerasa: contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extra pulmonar y de las micobacteriosis. Asociación Colombiana de Infectología. Infectio 2007; 11(2):87-94
10. Revollo Zepita, Susana; Taborga Manrique, Ximena; Diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Rev.Cs.Farm. Y Bioq. V.1 n.1 La Paz oct. 2013
11. Selman B. Carolina, Poggi M. Helena, Román Juan C., García C. Patricia y Lagos. L. Marcela. Análisis Retrospectivo del Rendimiento de Amplicor-PCR® para la detección de Mycobacterium tuberculosis en muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa. Rev. Chil. Infect. 2009; 26 (6): 495-498

12. Tuberculosis en la región de las Américas Informe Regional 2012.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22954&Itemid=
13. Wong, Paolo; Puray, Maritza; Gonzales, Arturo; Sevilla, Carlos R. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú Revista Peruana de Epidemiología, vol. 15, núm. 1, abril, 2011, pp. 6-16.
14. www.who.int/tb/challenges/gender/page_1/es/





ANEXO N° 1: PROYECTO DE TESIS



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ESCUELA DE POST GRADO

MAESTRIA EN EDUCACION PARA LA SALUD



**“REACCION DE CADENA DE POLIMERASA Y SECUENCIA
MOLECULAR EN MUESTRAS DE PACIENTES CON SOSPECHA
DIAGNOSTICA DE TUBERCULOSIS JUNIO 2013 - JULIO 2015
AREQUIPA”**

**PROYECTO DE TESIS PRESENTADO
POR LA BACHILLER:**

María Cecilia Manrique Sam

**PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO
DE MAGISTER EN EDUCACION PARA LA
SALUD.**

**AREQUIPA – PERÚ
2015**

I. Preámbulo

La tuberculosis es actualmente un serio problema de Salud Pública, según cifras de la Organización Mundial de la Salud, un tercio de la población mundial estaría infectado con el *Mycobacterium tuberculosis*.²² Representa una causa importante de morbilidad y genera grandes costos en salud en todo el mundo.

El diagnóstico laboratorial de tuberculosis se basa en la identificación microscópica de los bacilos ácido-alcohol resistentes, este método de diagnóstico carece de sensibilidad y especificidad, se necesita más de 10 000 bacilos / mL para poder ser identificado, esta sensibilidad, se ve disminuida más aun en casos de tuberculosis pulmonar paucibacilar y extrapulmonar.

El estándar de oro para el diagnóstico de tuberculosis sigue siendo el cultivo con una sensibilidad entre 80 al 96%, esta sensibilidad al igual que en la baciloscopia disminuye en muestras con menor carga bacilar y en muestras de tuberculosis extrapulmonar. Sin embargo uno de los mayores problemas del cultivo es el tiempo que requiere para aislar a la *Mycobacteria* que puede ser entre 8 a 12 semanas.

Las limitaciones de estos dos métodos diagnósticos tradicionales han llevado en estas dos últimas décadas a desarrollar nuevas tecnologías para el diagnóstico de Tuberculosis. El desarrollo de pruebas moleculares para el diagnóstico de

²² Wong, Paolo; Puray, Maritza; Gonzales, Arturo; Sevilla, Carlos R. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú Revista Peruana de Epidemiología, vol. 15, núm. 1, abril, 2011, pp. 6-16.

tuberculosis surge como una buena alternativa. Así tenemos la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa con gran sensibilidad, que en condiciones óptimas puede detectar de 1 a 10 microorganismos, esta prueba se presenta como un método rápido de diagnóstico, con una especificidad cercana 100% y una sensibilidad en muestras respiratorias con baciloscopias positivas (mayor a 95%).²³

Las pruebas moleculares nos permiten caracterizar e identificar microorganismos en 24-48 horas, incluyendo microorganismos no cultivables, analizando la secuencia total de nucleótidos de su genoma, resultando útil en la investigación epidemiológica de la tuberculosis.

El diagnóstico de Tuberculosis pulmonar no excluye la posibilidad de coexistir con otras enfermedades infectocontagiosas, estos casos de coinfección son fuentes de contagio para el personal de la Salud, la identificación de estos microorganismos patógenos coexistentes pueden ser diagnosticados mediante pruebas moleculares.²⁴

²³ Selman B. Carolina, Poggi M. Helena, Román Juan C., García C. Patricia y Lagos. L. Marcela. Análisis Retrospectivo del Rendimiento de Amplicor-PCR® para la detección de Mycobacterium tuberculosis en muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa. Rev. Chil. Infect. 2009; 26 (6): 495-498

²⁴ Marín Ortiz Cristina, Aristizábal Beatriz Helena, Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis, Medicina U.P.B. Julio-Diciembre 2013. 32(2) 144-150 pág.

II. Planteamiento Teórico

1. Problema de investigación

1.1. Enunciado del problema

Reacción de Cadena de Polimerasa y Secuencia Molecular en muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de Tuberculosis. Junio 2013 a Julio 2015 Arequipa.

1.2. Descripción del problema

1.2.1 Campo, Área y Línea de Investigación:

Campo: Ciencias de la Salud
Área : Salud Pública
Línea : Diagnóstico Molecular

1.2.2 Análisis de las Variables

Variable	Indicadores	Sub-Indicadores
Diagnóstico Molecular	Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR)	Presencia de Banda Ausencia de Banda
	Secuenciación Molecular	Bacteria Aislada Complejo de Bacterias Negativo

1.2.3 Interrogantes Básicas

¿Cuáles son los resultados obtenidos a través de la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa en muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de Tuberculosis?

¿Cuáles son los resultados obtenidos a través de la técnica de secuencia molecular en muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de Tuberculosis?

1.2.4 Tipo y Nivel de Investigación:

Tipo: Laboratorio

Nivel: Descriptivo

1.3. Justificación del problema

En nuestro medio no existen reportes sobre la aplicación de pruebas moleculares en el diagnóstico de pacientes con sospecha de Tuberculosis ni trabajos que reporten agentes patógenos asociados al *Micobacterium tuberculosis*. La Tuberculosis sigue siendo un problema de Salud Pública Mundial y la dificultad en el diagnóstico temprano es una de las causas principales.

El presente estudio pretende describir las características clínicas de los resultados obtenidos al aplicar la técnica molecular de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) en pacientes con sospecha diagnóstica tuberculosis así como utilizar la secuenciación molecular con el propósito de identificar otros microorganismos que pudieran estar asociados con mayor frecuencia al *Micobacterium Tuberculosis*.

Los datos obtenidos aportaran al conocimiento epidemiológico de esta enfermedad, así como contribuir a la toma de decisiones en cuanto al manejo, diagnóstico y a la instauración oportuna de tratamientos adecuados, mejorando la calidad de vida de los pacientes.



2. Marco Conceptual

2.1. Tuberculosis

2.1.1. Generalidades

La segunda causa de mortalidad después del SIDA a nivel mundial producida por un agente infeccioso es la tuberculosis.

En el año 2013, aproximadamente 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta enfermedad.

El mayor porcentaje de muertes por tuberculosis ocurren en países de bajos recursos, causa el 25% de fallecimientos en personas infectadas por el VIH convirtiéndola en este grupo la causa principal de muerte.²⁵

2.1.2. Agente Etiológico

La tuberculosis es causada por las micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. Caneti*, *M. Bovis*, *M. Africanum*, *M. Microti*, *M. Caprae*) son bacilos ácido-alcohol resistentes, aerobios estrictos, no esporulados, inmóviles, estas bacterias afectan principalmente a los pulmones.²⁶

²⁵ OMS. Tuberculosis. Nota Descriptiva N. 102 Marzo 2015.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>

²⁶ Araujo Gonzales Jesús Ángel, Martínez Martínez Alejandro, Métodos Tradicionales y de Vanguardia por Laboratorio para el Diagnóstico de Tuberculosis. Artículo de Revisión. Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ, Vol. VIII, Núm. 2, 2010 Págs. 13-19.

2.1.3. Patogenia

El Mycobacterium Tuberculosis se transmite de persona a persona a través de la inhalación de secreciones respiratorias que contienen micobacterias y que son expulsadas al toser, estornudar o hablar y por medio de la respiración. Como la mayor parte del aire inspirado se distribuye en las zonas media e inferior de los pulmones, estas áreas pulmonares a menudo se afectan con tuberculosis primaria. Después de la infección inicial (foco de Ghon) suele aparecer una lesión periférica que con lleva adenopatías miliares o para traqueales transitorias que pueden pasar inadvertidas en la radiografía de tórax. En la mayor parte de los casos la lesión cura de manera espontánea y se manifiesta en la forma de un pequeño nódulo calcificado. También es frecuente la reacción pleural supra yacente que cubre a un foco sub pleural. El foco de Ghon, con reacción pleural supra yacente o sin ella, engrosamiento y linfadenopatía regional, es conocido como complejo de Ghon.²⁷

Los microorganismos latentes pueden reactivarse en casos en los que se produce disminución de las defensas inmunológicas. Esta reactivación puede tener lugar en órganos distintos del pulmón y si la disminución de las defensas es severa, producir una infección generalizada denominada Tuberculosis Miliar. La enfermedad

²⁷ Harrison. Principios de Medicina Interna. 18 a Edición. 2012 Vol.1 1340-1358 pág.

tuberculosa en pacientes con SIDA suele ser consecuencia de la reactivación del M. Tuberculosis.

La mayoría de los casos de tuberculosis clínica ocurren en los dos primeros años después de la primo infección. El principal sistema defensivo contra la Micobacteria tuberculosa es la inmunidad celular, que se pone de manifiesto mediante la prueba de la reactividad cutánea a la tuberculina. Hay que tener presente que una prueba positiva para tuberculina se traduce como la existencia de inmunidad cutánea frente a la infección, la cual puede ser adquirida por una infección previa que no presenta sintomatología clínica o mediante vacunación.

2.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico microbiológico de la Tuberculosis se ha fundamentado en la baciloscopia, el cultivo y la identificación fenotípica. Si bien el método más rápido, sencillo y económico disponible es la baciloscopia, su escasa sensibilidad (del 40 al 60% de los cultivos positivos) ha limitado su utilidad, especialmente en las zonas geográficas de menor incidencia de la enfermedad y en las formas extrapulmonares, la baciloscopia tiene un valor predictivo positivo bajo (entre el 50 y el 80%).²⁸

El cultivo es el método de referencia por su sensibilidad y por permitir acceder a estudios posteriores con el aislado micobacteriano (identificación, sensibilidad y tipificación epidemiológica). Sin

²⁸ Harrison. Principios de Medicina Interna. 18 a Edición Vol. 1340-1358 pág.

embargo, la lentitud de crecimiento del bacilo tuberculoso representa el mayor inconveniente para un diagnóstico rápido de la enfermedad. En las 2 últimas décadas, el cultivo ha tenido un desarrollo espectacular mediante los nuevos medios y sistemas semi-automatizados, como el Bactec 460TB[®] (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, EE. UU.), MB Bact/AlerT[®] (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, Francia), MGIT 960[®] (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, EE. UU.) y VersaTREK[®] (Trek Diagnostic System, Westlake, EE. UU.). A pesar del gran avance de estos sistemas de cultivo, aún se requieren varias semanas para alcanzar la confirmación microbiológica definitiva, y más aún con los procedimientos de identificación fenotípicos. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico rápido de la TB activa, y los moleculares o genotípicos son la mejor alternativa.

2.2. Diagnóstico Molecular

Actualmente se han desarrollado múltiples técnicas moleculares y la aplicación de estas en el campo de la microbiología es muy diversa. Los métodos moleculares en general se pueden dividir en dos grupos:

- a) Métodos que se llevan a cabo con o sin amplificación genética.
- b) Métodos que se realizan a partir de cultivos de microorganismo o directamente de muestras.

Este conocimiento es fundamental para poder entender cuáles son las pruebas a utilizar de acuerdo al estudio a desarrollar y poder comprender los alcances

y limitaciones de estas técnicas moleculares y hacer una interpretación adecuada de los resultados obtenidos.

2.2.1. PCR específica para *Micobacterium Tuberculosis*

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es una técnica que nos permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN. El tiempo de duración de esta técnica es de 24 a 48 horas. La mayor parte de los investigadores que utilizan esta técnica en el diagnóstico de Tuberculosis utilizan la secuencia de inserción IS6110 del ADN del *Mycobacterium tuberculosis*, esta secuencia distingue en forma confiable el Complejo de *Mycobacterium Tuberculosis*,²⁹ esto debido a que esta secuencia IS6110 solo se encuentra en genomas de este complejo.

La Técnica de PCR tiene una sensibilidad alta puede detectar en condiciones adecuadas de 1 a 10 microorganismos, y esta identificación puede ser en cualquier muestra biológica.

2.2.2. Secuenciación Molecular

La **secuenciación del ADN** es un método molecular cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable que forman la base de los programas de

²⁹ Toro Rueda Carlos Y Amor Aramendía Aránzazu. Diagnóstico molecular en tuberculosis: presente y futuro. Medicina respiratoria 2010,3 (3):53-60

desarrollo de los seres vivos (de procariotas, de eucariotas en el núcleo celular, y en los plásmidos, en la mitocondria y en cloroplastos de las plantas). Así pues, determinar la secuencia de ADN es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en campos aplicados, como la investigación forense. Además, se puede utilizar la secuenciación del ADN para conocer las mutaciones somáticas, como las sustituciones de bases, generadas entre distintos organismos. El desarrollo de la secuenciación del ADN ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos en biología. Las técnicas actuales permiten realizar esta secuenciación a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala como el Proyecto Genoma Humano. Otros proyectos relacionados, en ocasiones fruto de la colaboración investigadora a escala mundial, han establecido la secuencia completa de ADN de muchos genomas de animales, plantas y microorganismos.

3. Análisis de antecedentes investigativos.

3.1 Institucionales.

No se han realizado en nuestro medio trabajos investigación relacionados con diagnóstico molecular de Tuberculosis

3.2 Nacionales

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN BIOPSIAS PLEURALES EMBEBIDAS EN PARAFINA.

Resumen Objetivo: Determinar la sensibilidad de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa frente a la tinción de fluorocromo auramina en muestras histológicas de biopsias pleurales embebidas en parafina, en el diagnóstico de tuberculosis pleural. Materiales y Métodos: Se usó 48 bloques de parafina obtenidos de los archivos de Patología del Hospital San José del Callao y del INEN, 30 de los cuales tenían diagnóstico clínico de tuberculosis y 18 presentaron diagnóstico diferente de tuberculosis. Resultados: De los 30 casos con diagnóstico clínico de tuberculosis, 29 resultaron ser TB-PCR positivos. Los 18 casos negativos para tuberculosis resultaron también negativos para TB-PCR. La sensibilidad y el valor predictivo negativo para TB-PCR fueron 96,7% y 94,7%. La sensibilidad y el valor predictivo negativo para AFB-auramina fueron 58,6% y 56,7%. En ambos casos, el valor predictivo positivo fue de 100%. Conclusión: TB-PCR ha resultado ser un método muy

sensible en el diagnóstico de tuberculosis en muestras histológicas embebidas en parafina.³⁰

PRUEBA MOLECULAR GENOTYPE® MTBDRplus, UNA ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE

Luis Asencios^{1,a}, Marco Galarza^{1,b}, Neyda Quispe^{1,c}, Lucy Vásquez^{1,c}, Elena Leo^{1,c}, Eddy Valencia^{1,c}, Juan Ramírez^{1,c}, Margoth Acurio^{1,c}, Rosario Salazar^{1,c}, Alberto Mendoza -Ticona^{2,d}, Omar Cáceres^{3,b}

RESUMEN: La prueba molecular Genotype®MTBDRplus, es un método que permite identificar las mutaciones más frecuentes asociadas con la resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea: isoniacida (INH) y rifampicina (RIF). El objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de la prueba molecular con cultivos y muestras de esputo con baciloscopia positiva. Se evaluó 95 cultivos y 100 esputos con perfiles de resistencia previamente determinados por el método de referencia “proporciones agar en placa” (APP). La prueba molecular a partir de cultivos mostró una sensibilidad de 100%; 97,5% y 96,9% para RIF, INH y multidrogoresistente (MDR) respectivamente; mientras que para esputo la sensibilidad fue de 95,7%; 96,8% y 95,2% para RIF, INH y MDR respectivamente. Se concluye que Genotype®MTBDRplus es una herramienta muy útil para la detección rápida de la resistencia a INH y

³⁰ Barrón Heli, Monteghirfo Mario, Rivera Nelson, Diagnóstico Molecular de Mycobacterium Tuberculosis en biopsias pleurales embebidas en parafina. An Fac Med Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2006 Págs. 11-18

RIF simultáneamente (MDR) en un máximo de 72 h a partir de esputo o de cultivo.³¹

UTILIDAD DE LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA EN LA TUBERCULOSIS DE DIFÍCIL DIAGNÓSTICO. REPORTE DE CASO Y REVISIÓN DE LITERATURA

Eliseo Chirinos Marroquín . Fernanda C. Santis Moya . Luis Antonio Silva Basadur . Nélica Huaman López .

RESUMEN Se presenta el caso de una paciente de 23 años con síndrome consuntivo de etiología difícil de determinar, en la que se utilizó la prueba de Reaccion en Cadena de Polimerasa (PCR) para apoyar a la sospecha clínica de tuberculosis e iniciar tratamiento específico. La evolución posterior al inicio del tratamiento fue favorable, con reversión de la sintomatología. Palabras Clave: Tuberculosis extrapulmonar, Reacción en cadena de polimerasa, Ascitis tuberculosa.

Es importante notar que la combinación de estas pruebas tiene su mayor utilidad en pacientes con alta sospecha clínica de tuberculosis (probabilidad post test cercana al 100%), pero incluso en pacientes con una sospecha clínica baja el tener ambas pruebas positivas puede ayudar en la toma de decisiones tan importantes como el inicio del tratamiento específico para este bacilo (probabilidad post test 70%).⁸, este hecho nos sugiere que en casos similares

³¹Asencios Luis, Galarza Marco, Quispe Neyda y colb., Prueba molecular Genotype® MTBRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogoresistente, Rev. Perú Med Exp Salud Pública. 2012; 29(1):92-98 pág.

al presentado, con difícil diagnóstico y ausencia de hallazgos microbiológicos se podría utilizar para ayudar en las decisiones diagnósticas y terapéuticas.³²

3.3 Internacionales

ASOCIACIÓN DE TUBERCULOSIS PULMONAR CON OTRAS ENFERMEDADES INFECTO CONTAGIOSAS.

Migdalia Elena Bernal Cardero, Rolando Mora Paz, Santiago Badia González, Dania Bárbara Tamayo Carbonel, Mauro Ramón Cardet Escalona. Cuba 2008

RESUMEN Se realizó un estudio transversal en el Hospital Clínico Quirúrgico “Lucía Iníguez Landin” utilizando como muestra 21 pacientes bolivianos y venezolanos con el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, admitidos en la Unidad de Cuidados Intensivos Especiales Latinoamericanos en el período comprendido del 1ero de octubre de 2005 hasta el 30 de abril de 2008, con el objetivo de determinar si existía asociación de ésta con otras enfermedades infecto contagiosas, en un mismo paciente. Se concluyó que el diagnóstico de tuberculosis pulmonar no excluyó la posibilidad de coexistir otras enfermedades infectocontagiosas con sintomatología respiratoria en un mismo paciente como citrobacter amalonaticus, ancylostomidium duodenal, leishmaniasis cutánea recidivante y enfermedad de chagas, entre otros, lo cual nos llevó a utilizar esquemas de tratamientos independientes para cada una de

³² http://www.clinicainternacional.com.pe/pdf/revista-interciencia/5/Mejora_Calidad.pdf

las afecciones en si. Se recomendó realizar pesquizaje de otras enfermedades infectocontagiosas en los enfermos de tuberculosis pulmonar.³³

CERVICAL ABSCESES DUE TO CO-INFECTION WITH BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI, SALMONELLA ENTERICA SEROVAR STANLEY AND MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN A PATIENT WITH DIABETES MELLITUS.

Sulaiman H, Ponnampalavanar S, Mun KS, Italiano CM. 2013 Nov

Infecciones por Mycobacterium tuberculosis, Burkholderia pseudomallei y Salmonella no tífica causan significativa morbilidad y mortalidad en el mundo. Estos patógenos intracelulares comparten algunos factores predisponentes comunes y características clínicas. Se ha reportado Co-infección con dos de estos organismos, pero, a nuestro entender, esta es la primera vez que se reporta en una sola persona a tres microorganismos.

CASO CLINICO

En agosto de 2010, un hombre diabético de 58 años de edad, de Malasia presentó fiebre y una masa fluctuante en el lado derecho de su cuello. Se aisló B. Pseudomallei. La recurrencia de los síntomas clínicos en los meses siguientes impulsó además de la aspiración y biopsia del absceso cervical obtener muestras de los nódulos linfáticos subyacentes. Salmonella Enterica Sero var Stanley y luego M. tuberculosis fueron identificadas a partir estas

³³ Bernal Cardero Migdalia Elena, Mora Paz Santiago, Tamayo Carbonel Dania Bárbara, Cardet Escalona Mauro Ramón; Asociación de tuberculosis pulmonar con otras enfermedades infecto contagiosas. Corr Med Cient Holg 2008; 12(5).

muestras mediante cultivo y métodos moleculares. El paciente respondió al tratamiento médico específico de cada una de las infecciones.³⁴

REAL TIME PCR IN CHILDHOOD TUBERCULOSIS: A VALUABLE DIAGNOSTIC TOOL.

Dayal R, Kashyap H, Pounikar G, Kamal R, Yadav NK, Singh MK, Chauhan DS, Goyal A, Indian J Pediatr 2015

El presente estudio se llevó a cabo para detectar y cuantificar *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de fluidos corporales mediante la técnica de PCR en tiempo real y comparar los resultados con el técnica y la PCR convencional. Ciento quince niños (<18 años) con tuberculosis (diagnosticado según Directrices IAP) y 32 controles emparejados del Departamento de Pediatría. Diferentes líquidos corporales (LCR, aspirado gástrico, líquido pleural, líquido ascítico y aspirado nodular) se sometieron a cultivo, para la PCR convencional la secuencia de inserción fue 1S6110 y PCR en tiempo real dirigido ARNr 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. PCR en tiempo real mostro significativamente mejores resultados el cultivo de todos los líquidos corporales ($p < 0,05$). Fue superior a la PCR convencional en el LCR ($p < 0,05$), pero mostró resultados comparables en el aspirado gástrico, líquido pleural, líquido ascítico y aspirado de ganglio linfático ($p > 0,05$). Por lo tanto, la PCR en tiempo real es una

³⁴ Sulaiman H, Ponnampalavanar S, Mun KS, Italiano CM. Cervical abscesses due to co-infection with *Burkholderia pseudomallei*, *Salmonella enterica* serovar Stanley and *Mycobacterium tuberculosis* in a patient with diabetes mellitus. BMC Infect Dis. 2013 Nov 9;13:527. doi: 10.1186/1471-2334-13-527.

herramienta de diagnóstico para la tuberculosis prometedora Niñez, la meningitis tuberculosa en particular.³⁵



³⁵ Dayal R, Kashyap H, Pounikar G, Kamal R, Yadav NK, Singh MK, Chauhan DS, Goyal A. Real time PCR in childhood tuberculosis: a valuable diagnostic tool. Indian J Pediatr. 2015 Feb;82(2):189-91Págs

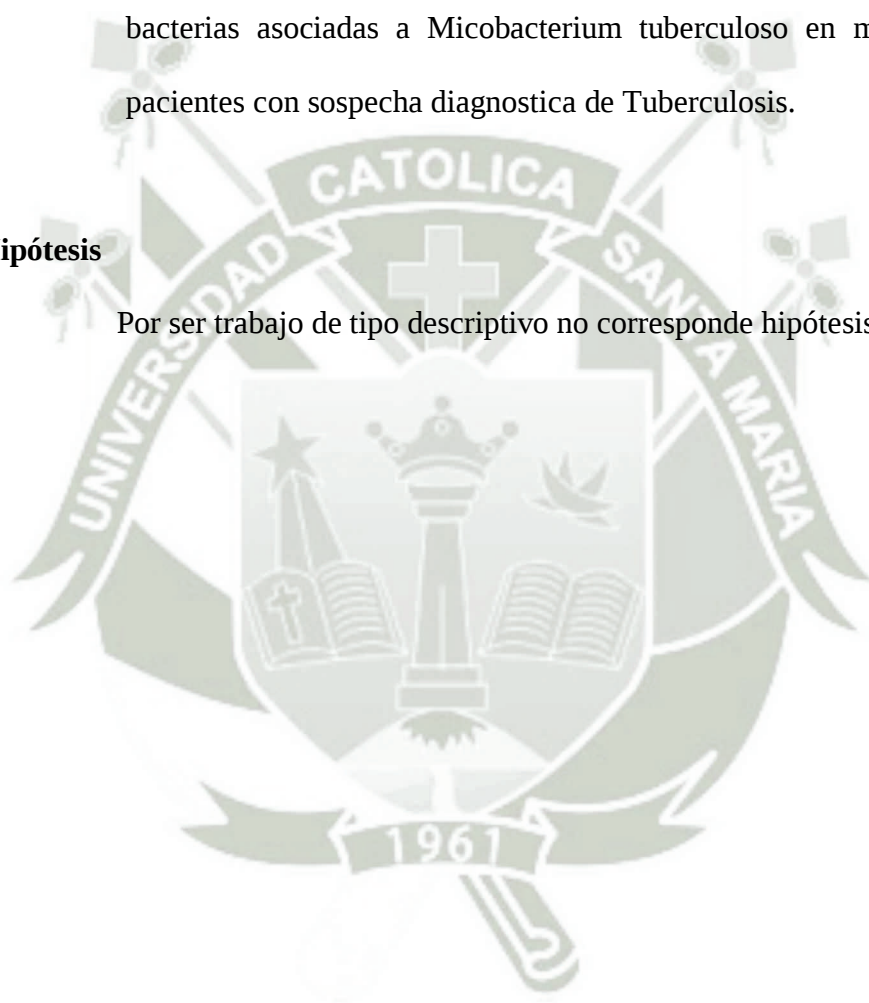
4. Objetivos

Identificar mediante la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de Tuberculosis

Identificar mediante la técnica de Secuencia Molecular la presencia de bacterias asociadas a *Micobacterium tuberculosis* en muestras de pacientes con sospecha diagnóstica de Tuberculosis.

5. Hipótesis

Por ser trabajo de tipo descriptivo no corresponde hipótesis.



III. Planteamiento operacional

1. Técnicas, instrumentos y materiales:

1.1 Técnicas.

Observación de Laboratorio

1.2 Instrumento

Ficha de Observación

1.3 Modelo de laboratorio

a) Extracción de ADN

Se utiliza el metodo fenol-cloroformo.

1.-Colocar la muestra en un tubo eppendorff, Con una pipeta tomar 500 ul de buffer TE.

2.-A este tubo , agregarle micro perlas, llevar a vortex por 5 minutos

3.- El sobrenadante pasarlo a un nuevo eppendorf y agregarle 600 ul de Fenol-cloroformo-alcohol isoamilico. Agitar por inversión unos segundos

4.- Centrifugar por 5 minutos a 13 000 rpm , se obtendrán 3 fases.

5.- Retirar la fase superior a un nuevo tubo, agregarle 800 ul de isopropanol frio y mezclar por inversión

6.- Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos

7.- Eliminar el isopropanol por decantación

8.- Agregar 500 ul de Etanol 75° y centrifugar nuevamente a 13 000 rpm de 1 – 2 minutos

9.- Eliminar el Etanol y dejar secar los tubos en un termoblock a 65° por unos minutos (tubos abiertos)

10.- Una vez que se evaporo todo el Etanol, resuspender en ADN en 100 ul de Agua ultrapura e incubar en calor de 3 – 4 minutos y congelar hasta su uso.

11.- Rotular cada tubo con la fecha y el nombre del paciente.

b) Reacción de Cadena de Polimerasa para Mycobacterium Tuberculoso

Para la amplificación de las secuencias de inserción IS6110, se utilizara 5 uL de las muestras de ADN de Mycobacterium obtenidos en el paso anterior. La amplificación Reacción de Cadena de la Polimerasa IS6110 se realizara según el método descrito por Eisenach et al 1990 y Nandagopal B. et al 2010. Los productos de PCR IS6110 serán analizados mediante electroforesis en agarosa al 2%. La tinción de los geles se realizara con bromuro de etidio. Se visualizó las bandas de 123 pb empleando un transiluminador UV.

c) Secuencia Molecular:

Las muestras serán amplificadas con el primer RNAr 16S , purificados y enviado para la secuenciación automática al Laboratorio Functional Biosciences, Inc. En Wisconsin USA.

d) Análisis de secuencias: Las secuencias de nucleótidos obtenidas serán comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank.

1.4 Prototipo de la Ficha

numero	sexo	Lugar solicitud de la muestra	Resultado de la PCR	Secuenciación molecular	bacteria

2. Campo de Verificación:

2.1 Ubicación Espacial:

Laboratorio de Biología Molecular de Uchumayo recibe muestras del Hospital Regional Honorio Delgado, IREN Sur, Laboratorios particulares de las ciudades de Arequipa, Camana, Cusco y Tacna.

2.2 Ubicación Temporal:

De acuerdo a la cronología de investigación el trabajo es estructural Junio del 2013 hasta Julio del 2015.

2.3 Unidades de estudio

Universo: Muestras de pacientes que llegaron al Laboratorio de Biología Molecular Uchumayo con sospecha de Tuberculosis entre junio del 2013 hasta Junio del 2015.

N.	AÑO	NUMERO DE MUESTRAS
1	2013	20
2	2014	49
3	2015	20
	TOTAL	89

- **Para el Análisis de Datos de la Prueba de Reaccion en Cadena de la Polimerasa para Tuberculosis:** Se incluirán en el presente estudio todas las muestras.
- **Para la Secuencia Molecular:** Se escogerán al azar simple 21 muestras positivas y 21 muestras negativas. Tomando como referencia el resultado de la Reacción de Cadena de Polimerasa para Mycobacterium Tuberculoso.

3. Estrategia de recolección de datos:

3.1. Organización

- Se coordinara con el representante del Laboratorio de Biología Molecular Uchumayo.
- Se realizara el ajuste del instrumento.
- Se realizara la investigación a través fichas.

3.2. Recursos

1. Recursos Económicos

Propios del investigador

2. Recursos Humanos

Investigador: María Cecilia Manrique Sam

3. Recursos Físicos e Institucionales

Instituto de Biología Molecular Uchumayo

Escuela de Post Grado Universidad Católica Santa María

Materiales y Equipos:

- Muestras
- Marcador de peso molecular
- Cámara de electroforesis
- Gel de agarosa
- Tubos
- Micropipeta
- Guantes

3.3 Validación del Modelo de Laboratorio.

Para la Técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa se tomara como referencia el modelo desarrollado por Eisenach et al 1990 y Nandagopal B et al. 2010 . La Reacción de Cadena de la Polimerasa se desarrolla usando

primers específicos para la secuencia IS6110 para Micobacterium
Tuberculosis.

IV. Cronograma de trabajo

Tiempo Actividades	Mes Agosto				Mes Septiembre				Mes Octubre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. Recolección de datos				X								
2. Estructuración de resultados.					X	X	X					
3. Informe final.								X	X	X		

BIBLIOGRAFIA

1. Araujo Gonzales Jesús Ángel, Martínez Martínez Alejandro, Métodos Tradicionales y de Vanguardia por Laboratorio para el Diagnostico de Tuberculosis. Artículo de Revisión. Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ, Vol. VIII, Núm. 2, 2010 Págs. 13-19.
2. Asencios Luis, Galarza Marco, Quispe Neyda y colb., Prueba molecular Genotype® MTBRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogoresistente, Rev. Perú Med Exp Salud Pública. 2012; 29(1):92-98 pág.
3. Barrón Heli, Monteghirfo Mario, Rivera Nelson, Diagnóstico Molecular de Mycobacterium Tuberculosis en biopsias pleurales embebidas en parafina. An Fac Med Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2006 Págs. 11-18
4. Bernal Cardero Migdalia Elena, Mora Paz Santiago, Tamayo Carbonel Dania Bárbara, Cardet Escalona Mauro Ramón; Asociación de tuberculosis pulmonar con otras enfermedades infectas contagiosas. Corr Med Cient Holg 2008; 12(5).
5. Dayal R, Kashyap H, Pounikar G, Kamal R, Yadav NK, Singh MK, Chauhan DS, Goyal A. Real time PCR in childhood tuberculosis: a valuable diagnostic tool. Indian J Pediatr. 2015 Feb;82(2):189-91Págs
6. Harrison. Principios de Medicina Interna. 18 a Edición. 2012 Vol.1 1340-1358 pág.
7. Marín Ortiz Cristina, Aristizábal Beatriz Helena, Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis, Medicina U.P.B. Julio-Diciembre 2013. 32(2) 144-150 pág.
8. OMS. Tuberculosis. Nota Descriptiva N. 102 Marzo 2015.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>

9. Selman B. Carolina, Poggi M. Helena, Román Juan C., García C. Patricia y Lagos. L. Marcela. Análisis Retrospectivo del Rendimiento de Amplicor-PCR® para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa. Rev. Chil. Infect. 2009; 26 (6): 495-498
10. Sulaiman H, Ponnampalavanar S, Mun KS, Italiano CM. Cervical abscesses due to co-infection with *Burkholderia pseudomallei*, *Salmonella enterica* serovar Stanley and *Mycobacterium tuberculosis* in a patient with diabetes mellitus. BMC Infect Dis. 2013 Nov 9;13:527. doi: 10.1186/1471-2334-13-527.
11. http://www.clinicainternacional.com.pe/pdf/revistanterciencia/5/Mejora_Calidad .
12. Wong, Paolo; Puray, Maritza; Gonzales, Arturo; Sevilla, Carlos R. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú Revista Peruana de Epidemiología, vol. 15, núm. 1, abril, 2011, pp. 6-16.



ANEXO N° 2:

MATRIZ DE SISTEMATIZACIÓN DE DATOS

FEHCA	SEXO	MUESTRA	PCR	SECUENCIACION
17/05/2013	MASCULINO	ESPUTO	POSITIVO	
27/09/2013	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
16/10/2013	FEMENINO	SECRESION DE FISTULA	NEGATIVO	
16/10/2013	FEMENINO	LIQUIDO PLEURAL	NEGATIVO	
18/10/2013	MASCULINO	LIQUIDO PERICARDICO	POSITIVO	
17/10/2013	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
28/10/2013	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	POSITIVO	
06/11/2013	FEMENINO	SEDIMENTO DE ORINA	NEGATIVO	
13/11/2013	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	POSITIVO	BURKHOLDERIA CEPACIA
21/11/2013	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	POSITIVO	SERRATIA MARCENCES
18/11/2013	MASCULINO	ESPUTO	NEGATIVO	
25/11/2013	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	POSITIVO	
28/11/2013	MASCULINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
29/11/2013	MASCULINO	ESPUTO	POSITIVO	
03/12/2013	MASCULINO	HISOPADO FARINGEO	POSITIVO	
02/12/2013	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	POSITIVO	
05/12/2013	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	MYCOPLANA SP BREVUNDINOMAS BULLATA
10/12/2013	FEMENINO	LIQUIDO SINOVIAl	POSITIVO	VEILLONELA SP
23/12/2013	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	POSITIVO	RASTONIA PICKETTII
23/12/2013	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	BACILLUS PUMILUS
02/01/2014	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	NEGATIVO	
13/01/2014	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	NEGATIVO	
05/02/2014	FEMENINO	ASPIRADO NODULO	NEGATIVO	
07/02/2014	FEMENINO	ESPUTO	POSITIVO	
24/01/2014	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
24/01/2014	FEMENINO	ESPUTO	POSITIVO	
12/03/2014	MASCULINO	ESPUTO	NEGATIVO	
27/03/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
28/03/2014	MASCULINO	LAVADO BRONQUIAL	NEGATIVO	
04/04/2014	MASCULINO	ESPUTO	NEGATIVO	

04/04/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
02/04/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
02/04/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
02/05/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
03/06/2014	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	POSITIVO	
09/06/2014	MASCULINO	HISOPADO FARINGEO	POSITIVO	BRACHYBACTERIUM PARACONGLOMERATUM
17/06/2014	MASCULINO	LCR	NEGATIVO	
21/06/2014	FEMENINO	LIQUIDO PLEURAL	POSITIVO	
30/06/2014	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	POSITIVO	
04/07/2014	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
11/07/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
16/07/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	POSITIVO	PLAOMICROBIUM CHINENSE
24/07/2014	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	NEGATIVO	
24/07/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
26/07/2014	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	NEGATIVO	
26/07/2014	MASCULINO	ESPUTO	NEGATIVO	
01/08/2014	MASCULINO	LIQUIDO PERICARDICO	NEGATIVO	
01/08/2014	FEMENINO	LAVADO BRONQUIAL	NEGATIVO	
07/08/2014	FEMENINO	LIQUIDO DE TUMORACION ABDOMINAL	NEGATIVO	
01/09/2014	MASCULINO	HISOPADO FARINGEO 10	NEGATIVO	
01/09/2014	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
01/09/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
01/09/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
04/09/2014	MASCULINO	SEDIMENTO DE ORINA	NEGATIVO	
04/09/2014	MASCULINO	LIQUIDO ASCITICO	POSITIVO	
05/09/2014	FEMENINO	SEDIMENTO DE ORINA	NEGATIVO	
10/09/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
12/09/2014	FEMENINO	ESPUTO	NEGATIVO	
17/09/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
30/09/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
16/10/2014	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
16/10/2014	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
16/10/2014	MASCULINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
20/10/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
22/10/2014	MASCULINO	SEDIMENTO DE ORINA	NEGATIVO	

05/11/2014	MASCULINO	LCR	NEGATIVO	
07/11/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
07/11/2014	FEMENINO	LIQUIDO PLEURAL	NEGATIVO	
21/11/2014	MASCULINO	LIQUIDO ASCITICO	POSITIVO	
25/11/2014	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
16/12/2014	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	POSITIVO	
06/01/2015	MASCULINO	LCR	NEGATIVO	DELFTIA
06/01/2015	MASCULINO	LIQUIDO PLEURAL	NEGATIVO	
14/01/2015	FEMENINO	HISOPADO FARINGEO	NEGATIVO	
23/01/2015	FEMENINO	ESPUTO	NEGATIVO	
23/01/2015	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
23/01/2015	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
23/01/2015	FEMENINO	ESPUTO	NEGATIVO	
30/01/2015	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	NEGATIVO	
24/02/2015	MASCULINO	PLASMA	POSITIVO	
27/02/2015	FEMENINO	BIOPSIA MAMA	POSITIVO	ACINETOBACTER
05/03/2015	FEMENINO	LIQUIDO ASCITICO	NEGATIVO	
05/03/2015	MASCULINO	HISOPADO FARINGEO	POSITIVO	
11/05/2015	MASCULINO	SUERO	NEGATIVO	
21/05/2015	FEMENINO	LIQUIDO ASCITICO	POSITIVO	
19/06/2015	FEMENINO	SUERO	POSITIVO	BACILLUS NIACINI
23/06/2015	MASCULINO	SUERO	POSITIVO	
07/07/2015	MASCULINO	SECRESION TUMOR BRAZO	NEGATIVO	
18/07/2015	MASCULINO	ESPUTO	NEGATIVO	