

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en heces de
niños del Instituto Nacional de Salud del Niño
mediante la reacción en cadena de la polimerasa**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Angie Kelly Velarde García

ASESOR

Amparo Iris Zavaleta Pesantes

Patricia Sheen Cortavarría

Lima - Perú

2017

DEDICATORIA

A mi madre Gloria, gracias a ella soy la profesional que soy ahora, ella fue, es y será siempre mi mayor inspiración, gracias a su trabajo y su arduo esfuerzo pude iniciar y culminar mi formación profesional y es la persona a la que le debo todos mis logros profesionales y personales.

A mi mamita Golla y mi Papito Jorge[†], que me cuidaron y me apoyaron en todo momento. Siempre estarán en mi corazón, gracias por todos los años de sacrificio, la paciencia y el amor impartidos cada día.

A mi papa Giovanni por trabajar duro siempre para sacarnos adelante, y a mis hermanos Giovanni, Renzo y Pierina por su apoyo sincero e incondicional

A mi Tío Ángel por animarme siempre a perseguir mis sueños y nunca desfallecer pase lo que pase, a mi tía Charo y mis primos, por el cariño, confianza y apoyo desde siempre.

A mi esposo y compañero de vida, Christian, con quien estude todos los años de la carrera y siempre estuvo para apoyarme en lo que fuera necesario, con quien me case y seguimos escribiendo el libro de nuestra vida juntos; gracias por su apoyo incondicional y paciencia en los retos y en los momentos felices, a lo largo de todos estos años. Gracias por animarme y darme la fortaleza para culminar este proyecto. Gracias a sus padres Raúl y Rebeca que con mucho esfuerzo y ahínco nos ayudaron a salir adelante.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

- A la Dra. Amparo Zavaleta, por ser mi mentora, por todas las enseñanzas impartidas a lo largo de todos estos años y por ser mi asesora en este trabajo.
- A mis maestros de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por todas las enseñanzas, anécdotas y ejemplos de éxito, es una gran labor la enseñanza que imparten día a día. Todo lo que cada uno me enseñó en su momento fue y es valorado en el campo profesional, gracias por enseñarme a querer mi carrera y por mostrarme que ser Químico Farmacéutico de esta casa de estudios fue la mejor decisión de mi vida.
- A mi Co-Asesora de tesis Patricia Sheen Cortavarría y Al área de Biología Molecular del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas del LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo). Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias y Filosofía – Universidad Peruana Cayetano Heredia, quienes me permitieron desarrollar este proyecto y me ayudaron en todo momento.
- A mi amiga y mentora Melissa Méndez, por su apoyo, paciencia y por compartir conmigo sus conocimientos y *expertise* en biología molecular y técnicas moleculares.
- A las madres, padres y niños del Instituto Nacional de Salud del Niño que fueron los sujetos que donaron su muestra y permitieron que se desarrolle esta investigación.
- A mis amigos de la universidad, gracias por los lindos momentos, los llevare conmigo por siempre.
- A mi gran amiga Ely por todo el apoyo a lo largo de todos estos años, y es gracias a ella que aprendí la importancia de culminar los proyectos y a perseverar en la vida.
- A los miembros del jurado examinador y calificador, por sus sugerencias, consejos y todo el apoyo brindado en la culminación del presente trabajo de tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO ESPECIAL.....	VI
ÍNDICE.....	VII
SUMMARY	X
1. INTRODUCCIÓN	11
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVO GENERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. HIPÓTESIS.....	17
4. GENERALIDADES	18
4.1. TUBERCULOSIS PULMONAR	18
4.2. PATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR	19
4.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	23
4.4. EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS EN PERÚ	24
4.5. EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS INFANTIL EN EL PERÚ	30
4.6. TUBERCULOSIS PEDIÁTRICA.....	31
4.7. DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS PEDIÁTRICA.....	32
4.8. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	36
4.8.1. <i>Métodos de identificación por observación microscópica</i>	36
4.8.2. <i>Métodos de cultivo de micobacterias</i>	37
4.9. UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	38
4.10. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	41
4.10.1. <i>Etapas de la PCR</i>	41
4.10.2. <i>Ventajas de la PCR (30)</i>	43
4.10.3. <i>Componentes de la PCR (30)</i>	45
4.10.4. <i>Adyuvantes de la PCR</i>	47
4.10.5. <i>Iniciadores, cebadores o primers</i>	47
4.10.6. <i>PCR anidado o Nested</i>	48
4.11. SECUENCIA DE INSERCIÓN IS6110	49
4.12. NATURALEZA DE LA MUESTRA A USARSE EN EL ESTUDIO:	51
4.13. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO EN HECES:	51
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	53
5.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:	53
5.2. CONTROLES NEGATIVOS:	53
5.3. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	54
5.4. ASPIRADO GÁSTRICO Y NASOFARÍNGEO.....	54

5.5.	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO MÉTODOS UTILIZADOS:	55
5.5.1.	Método de extracción <i>FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene)</i>	55
5.5.2.	Método de extracción “ <i>Chelex 100</i> ”	56
	Descontaminación de la muestra (<i>Fase I</i>)	56
	Extracción del ADN (<i>Fase II</i>)	57
5.6.	VISUALIZACIÓN DEL ADN GENÓMICO TOTAL:	57
5.7.	ESTANDARIZACIÓN DE LA <i>HEMI-NESTED - PCR</i>	57
5.7.1.	Primera fase: Volumen de reacción (<i>Outer</i>)	58
5.7.2.	Segunda Fase: Volumen de reacción (<i>Inner</i>)	58
5.8.	CEBADORES ESPECÍFICOS	58
5.9.	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN	59
5.10.	ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	60
6.	RESULTADOS	62
6.1.	CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS Y POBLACIÓN UTILIZADA:	62
6.1.1.	Característica de edad de la población utilizada:	62
6.1.2.	Score de los criterios de Stegen y Toledo en los 16 pacientes con sospecha clínica: ..	62
6.1.3.	Característica de los controles negativos:	63
6.2.	ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN	63
6.3.	ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE PCR <i>HEMI-NESTED – PCR</i>)	64
6.4.	ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	65
6.4.1.	Extracción de ADN genómico por el método “ <i>FastDNA® SPIN Kit for Soil</i> ” (<i>Qbiogene</i>)	65
6.4.2.	Extracción de ADN genómico por método “ <i>Chelex 100</i> ”	65
7.	DISCUSIÓN	67
8.	CONCLUSIONES	72
9.	RECOMENDACIONES	73
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
11.	ANEXOS.....	78
	<i>ANEXO 1: GLOSARIO DE TÉRMINOS RELACIONADOS CON LA TUBERCULOSIS (43)</i>	78
	<i>ANEXO 2: DATOS ESTADÍSTICOS (44)</i>	83
	<i>ANEXO 3: Perfil de tuberculosis en el Perú- country Profile en la web site del OMS</i> <i>www.who.int/tb/data (4)</i>	88

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo detectar *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de heces de niños del Instituto Nacional de Salud del Niño, mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se tomaron muestras biológicas de heces de 236 niños menores de 12 años de edad pertenecientes al Instituto Nacional de Salud del Niño, estas muestras fueron sometidas a dos métodos de extracción de ADN una denominado “FastDNA® SPIN Kit for Soil” (Qbiogene) y el otro “Chelex 100”. Luego se aplicó la técnica molecular de *Hemi-Nested* PCR. Se utilizaron los cebadores PT8, PT9 y TB290 dando como resultado un fragmento de 360 pb (amplificaciones del gen IS6110) para detección del *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos comparados con la prueba de referencia (cultivo microbiológico) mostraron 37,5% de sensibilidad y 100% de especificidad utilizando “FastDNA® SPIN Kit for Soil” (Qbiogene) y 31.25% de sensibilidad y 100% de especificidad para “Chelex 100”. Este trabajo demostró que se puede estandarizar la técnica de PCR para detección de *M. tuberculosis* en muestras de heces, y sus posibles aplicaciones como método rápido de diagnóstico, en una población en donde la naturaleza paucibacilar de las muestras convencionales no permite la detección inmediata del bacilo.

Palabras claves: *M. tuberculosis*, reacción en cadena de la polimerasa, pacientes pediátricos, “FastDNA® SPIN Kit for Soil”, “Chelex 100”.

SUMMARY

The present study objective is to detect *Mycobacterium tuberculosis* in children feces samples obtained from the *National Institute of Children's Health* using the polymerase chain reaction molecular technique (PCR). Feces biological samples were taken from 236 children under the age of 12 years old treated at the *National Institute of Children's Health*, such samples underwent two DNA extraction methods, the first one being FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene) and the second one was Chelex 100 to subsequently use the PCR variation *Hemi-Nested* PCR. Primers PT8, PT9 and TB290 were used resulting in a 360 pb amplified fragment (IS6110 gene amplification) to detect *M. tuberculosis*. The results were compared to the reference test (microbiological culture) and showed 37.5% of sensitivity and 100% specificity using the FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene) and 31.25% of sensitivity and 100% of specificity using Chelex 100 method. This study showed that the PCR technique can be standardized for the detection of *M. tuberculosis* in feces samples and its potential use as a fast diagnosis method in a population where the paucibacillary nature of conventional samples does not allow the immediate detection of the bacillus.

Key words: *M. tuberculosis*, polymerase chain reaction, pediatric patients, FastDNA® SPIN Kit for Soil, Chelex 100.

1. INTRODUCCIÓN

M. tuberculosis es el agente etiológico de la tuberculosis (TB), las estadísticas más recientes reportadas por la Organización Mundial de la Salud (WHO- *World Health Organization*) en el “*Global Tuberculosis Report*” publicado en el 2016, indican que en el 2015 el número mundial estimado de nuevos casos (incidentes) de TB fue 10,4 millones, de los cuales 5,9 millones (56%) fueron en hombres, 3,5 millones (34%) en mujeres y 1 millón (10%) en niños. Las personas VIH-positivas representaron 1,2 millones (11%) de todos los casos nuevos de TB. El 60 % de los casos nuevos se dieron en seis países: India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. Los progresos que se den en el mundo dependen de los avances fundamentales en la prevención, diagnóstico y la atención de la TB que se produzcan en estos países (1).

En el reporte global de tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud del 2014, se reporta que de las enfermedades infecciosas, la tuberculosis (TB) es la segunda causa de mortalidad, después del SIDA. Así, 9,0 millones de personas presentaron tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta enfermedad en el 2013, este reporte incluye la información de 202 países de los cuales el 56% de pacientes con tuberculosis proviene de países del sud-este asiático y de regiones del pacífico occidental. En el 2013, Se estimó que había 3,3 millones de nuevos casos de tuberculosis y 510 mil muertes por esta enfermedad ocurrieron en mujeres. Además, cifras de este mismo año indican que 550 mil niños enfermaron de tuberculosis y 80 mil niños murieron por tuberculosis siendo VIH negativos. Las estimaciones de morbilidad y mortalidad por TB entre los niños son ligeramente superiores a los publicados en el informe mundial de la tuberculosis del 2013,

que refleja el uso de un enfoque de conjunto para combinar diferentes métodos utilizados para producir estas estimaciones y obtener así más detalles sobre los datos proporcionados en el 2013 (2).

En el reporte global de tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud del 2015, se estimaron 9,6 millones de nuevos casos de los cuales 1 millón correspondían a niños. El informe mundial sobre la tuberculosis del 2015 se basa en datos recopilados en las rondas anuales de recopilación de datos de países y territorios, incluidos 194 estados miembros de la Organización Mundial de la Salud, mediante un sistema basado en la web <https://extranet.who.int/Tme>, que se abrió para la presentación de informes a mediados de marzo de ese año (3). Este reporte es obligatorio para todos los estados miembros, por lo que nuestro país no está exento, teniendo como último reporte a la fecha toda la información del 2015 (4), en el que indican como total casos notificados en el 2015 a 30,988 casos de tuberculosis solo en nuestro País (más detalles, ver anexo Perfil de tuberculosis en el Perú (4)).

En el 2015, la prevalencia de la tuberculosis se incrementó a nivel mundial debido al deterioro y falta de efectividad en los servicios de salud, aumento del número de personas sin hogar, o que viven hacinadas en condiciones higiénicas deficientes; la desnutrición, la afluencia de inmigrantes desde zonas en donde la tuberculosis es endémica, la propagación del VIH/SIDA y otras situaciones de inmunosupresión. Además, el incremento de la Tuberculosis Multi-Drogo-Resistente (TB-MDR) y Tuberculosis Extremadamente Resistente (TB-XDR) es un serio problema en los últimos años (5), por

lo que si bien las muertes por TB disminuyeron en un 22% entre 2000 y 2015, la TB continuó siendo una de las diez principales causas mundiales de muerte en 2015 (1).

En el reporte global de tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud publicado el 2016 indica que las Naciones Unidas adoptaron en el 2015 los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para el 2030; una de sus metas es poner fin a la epidemia mundial de tuberculosis (TB). En la estrategia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) “Fin a la Tuberculosis”, aprobada por la Asamblea Mundial de la Salud en 2014, se pide una reducción del 90% de las muertes por TB y una reducción del 80% en su tasa de incidencia para el año 2030, en comparación con 2015 (1).

La tasa de reducción de la incidencia mundial de la TB de 2014 a 2015 se mantuvo en tan solo un 1,5%, y es necesario aumentarlo al 4-5% anual para el 2020 si se quieren alcanzar los primeros hitos de la estrategia “Fin a la Tuberculosis”.

Frente a estas estadísticas y tomando en cuenta que la tuberculosis afecta alrededor de 10 al 15 % de casos por año, la identificación de mejores técnicas de diagnóstico para la tuberculosis ha sido determinado como una prioridad de investigación global, ya que confirmar el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en niños es retador, y muchas veces permanece sin reportarse o sin reconocerse (6).

En la tuberculosis pulmonar los datos clínicos y radiológicos tienen valor de sospecha que en ocasiones se justifica y es significativa. Sin embargo, el hallazgo del bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR) en la muestra clínica es un diagnóstico definitivo. En consecuencia, la microscopía y el cultivo son las pruebas tradicionales para el diagnóstico de infecciones por micobacterias. Por lo que se considera al cultivo microbiológico como Gold Standard (estándar de oro) (7).

La principal muestra clínica para el aislamiento de bacilos de lesiones pulmonares es el esputo expectorado espontáneamente; cuando los pacientes no expectoran libremente, se utilizan métodos de inducción del esputo. En caso de no obtener éste por los procedimientos señalados anteriormente, se puede recurrir al lavado gástrico o a una muestra obtenida por broncoscopia; tal es el caso del diagnóstico de la tuberculosis pediátrica, la cual se ve afectada por la dificultad en la obtención de esputo, así como la naturaleza pauci-bacilar del *Mycobacterium tuberculosis* (denominado en adelante como *M. tuberculosis*). Así mismo, el aislamiento de *M. tuberculosis* requiere medios de cultivo, zonas de bioseguridad alta y tiempo. Este último genera incertidumbre e impaciencia en aquellos pacientes que esperan un diagnóstico (8).

En la tuberculosis infantil la morbilidad y mortalidad están asociadas ya que la tuberculosis en niños es de rápida progresión, además de diseminarse a lugares extra pulmonares con mayor facilidad. Por otro lado, la presencia de tuberculosis infantil en una comunidad es un indicador de transmisión activa de la enfermedad; esto sumado a la baja sensibilidad de las pruebas de laboratorio estándar, es un obstáculo para el diagnóstico de la tuberculosis en niños, debido a que la carga bacteriana es generalmente menor que la de los adultos, llegando en las mejores condiciones a aislar al *Mycobacterium tuberculosis* en el 50% de los casos pediátricos con sospecha clínica (9). Por otro lado, los síntomas de la infección por *M. tuberculosis* son a menudo inespecíficos o ausentes en niños afectados. Además las muestras clínicas para el diagnóstico son a menudo difíciles de obtener.

En el ámbito clínico para el diagnóstico de tuberculosis se necesita la confirmación microbiológica por cultivo del organismo o demostración de la presencia del bacilo, pero en la práctica, esto rara vez es logrado. En primer lugar, es difícil obtener porque los

niños pequeños suelen ser incapaces de producir expectoración y los sitios extrapulmonares en donde pueden desarrollar TB pueden ser menos accesibles para la obtención de la muestra. Segundo, porque la formación de la cavidad pulmonar de la enfermedad es inusual en los niños más pequeños, la microscopía de frotis es a menudo negativa, requiriéndose el cultivo microbiológico (6).

En la práctica rutinaria, los médicos rara vez esperan a que los resultados del cultivo estén disponibles antes de comenzar la terapia de tuberculosis en un niño con sospecha de TB. Esto se debe a una reluctancia en retrasar la terapia en niños, ya que pueden tener progresión rápida de la enfermedad y también porque la sensibilidad del cultivo para el diagnóstico de tuberculosis en niños es pobre. Por lo tanto, un resultado de cultivo negativo no puede utilizarse como una prueba de exclusión (6).

Por esta razón, los esfuerzos de un mejor método existente o la propuesta de nuevos métodos ayudarán al diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pediátrica de forma oportuna, eficiente y eficaz.

Así, Russell en el 2001, realizando un estudio en niños sudafricanos VIH positivos y negativos tomando muestras de esputo inducido y aspirado gástrico, realizó la detección de *M. tuberculosis* obteniendo resultados de alta sensibilidad en ambos tipos de muestra (10).

Otros estudios afirman que la detección de este microorganismo en aspirado gástrico oscila en un rango de 20 a 40 % de sensibilidad. A la vez, el esputo inducido es incómodo para el niño y requiere de mucho cuidado para evitar la contaminación por aerosoles al personal médico, así como a otros pacientes (11).

En la búsqueda de pruebas no invasivas a ser empleados en pacientes pediátricos encontramos en un estudio que el *M. tuberculosis* puede sobrevivir en el fluido gástrico (demostrado por Vandal et al., 2008), por lo que al ser tragados podrían ser detectados en las muestras de heces (12).

El presente estudio propone la detección de *M. tuberculosis* en muestras de heces de niños menores de 12 años del Instituto Nacional de Salud del Niño con sospecha de tuberculosis pulmonar; mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando ADN genómico extraído por dos métodos: “Chelex 100” y “FastDNA® SPIN Kit for Soil” con el fin de contar con pruebas alternativas no invasivas de diagnóstico rápido.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- ✓ Detectar *M. tuberculosis* en muestras de heces de niños del Instituto Nacional de Salud del Niño, mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Estandarizar la extracción de ADN genómico total a partir de muestras de heces usando los métodos de FastDNA for soil® (Qbiogene) y Chelex 100.
- ✓ Estandarizar la técnica de PCR para la identificación de *M. tuberculosis* usando ADN genómico a partir de muestras de heces.
- ✓ Determinar la especificidad y sensibilidad de la PCR como prueba alternativa no invasiva para el diagnóstico de tuberculosis.

3. HIPÓTESIS

Detección de *M. tuberculosis* en ADN genómico total extraído de muestras de heces de niños mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

4. GENERALIDADES

4.1. Tuberculosis Pulmonar

Con el nombre de tuberculosis se designa la enfermedad infecciosa causada por bacilos del género *Mycobacterium*, incluidos en el denominado *Complejo Mycobacterium tuberculosis* y por otras especies de micobacterias oportunistas potencialmente patógenas para el hombre (13).

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, de distribución mundial que generalmente afecta a los pulmones, pero que puede causar lesiones en cualquier otro órgano o tejido del cuerpo humano. Desencadena la formación de granulomas en los tejidos infectados y una hipersensibilidad mediada por células (7).

M. tuberculosis, también denominado “Bacilo de Koch” (en honor a su descubridor), pertenece a una de las más de 100 especies de micobacterias reconocidas, las cuales son bacilos aerobios que no forman esporas y son inmóviles, de 0,2 a 0,6 µm de ancho y de 1,0 a 10 µm de largo, ligeramente curvos o rectos, que a veces se ramifican o forman filamentos (14).

El desarrollo y perfeccionamiento del cultivo, de las pruebas bioquímicas y, más recientemente, de métodos de biología molecular, han permitido clasificar las micobacterias. Tres especies tienen una gran identidad genética con el *M. tuberculosis*, por lo cual han sido agrupadas en el Complejo *M. tuberculosis*, el cual incluye: *M. tuberculosis* propiamente dicho, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. Las micobacterias patógenas no incluidas en este complejo son *M. leprae* y las micobacterias atípicas, mejor denominadas no tuberculosas. Ver tabla de micobacterias patógenas en tabla N°1 (7).

Tabla N° 1.- *Micobacterias Patógenas (7)*

Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>M. tuberculosis</i>	
<i>M. bovis (incluido BCG*)</i>	
<i>M. africanum</i>	
<i>M. microti</i>	
*Bacilo de Calmette-Guerin	
<i>Mycobacterium leprae</i>	
Micobacterias no tuberculosas (atípicas)	
De crecimiento lento	
No cromógenas	<i>Complejo M. avium</i>
Fotocromógenas	<i>M. kansasii</i>
Escotocromógenas	<i>M. scrofulaceum</i>
De crecimiento rápido	
<i>M. fortuitum, M. chelonae</i>	

4.2. Patogénesis de la tuberculosis pulmonar

El hombre adquiere la infección de *M. tuberculosis* por vía aérea, mediante la aspiración de partículas muy finas que contienen de 1 a 3 bacilos, los cuales entran a los espacios alveolares. Una vez que los bacilos han entrado en contacto con los alvéolos pulmonares, la enfermedad puede presentar 5 estadios (Figura N° 1) (7) (10).

- En el **estadio 1**, generalmente los bacilos son destruidos o inhibidos por los macrófagos alveolares residentes. Si éstos no son destruidos, se multiplican y destruyen a los macrófagos.
- En el **estadio 2**, aparece un estado de simbiosis, en el que el bacilo crece en forma logarítmica dentro de macrófagos inmaduros (no activados) de la lesión en desarrollo, que se denomina tubérculo. Estos macrófagos provienen de la corriente sanguínea, estadio que se le conoce como simbiótico por dos razones:
 - a) Los bacilos se multiplican dentro de los macrófagos sin causar un daño aparente al hospedero y
 - b) Los macrófagos se acumulan y se dividen.
- En el **estadio 3**, ocurre por primera vez la necrosis caseosa; el número de bacilos viables se estabiliza, porque su crecimiento es inhibido por la respuesta inmune a los antígenos parecidos a tuberculina (*tuberculin-like-antigen*). En este estadio la respuesta inmune es principalmente del tipo de hipersensibilidad retardada. Los macrófagos cargados con bacilos son destruidos. La lesión ahora tiene un centro caseoso sólido, dentro del cual los bacilos, ahora libres (extracelulares), no se multiplican. Rodeando a este centro caseoso se encuentran macrófagos inmaduros (no activados) que permiten la multiplicación intracelular de los bacilos y macrófagos parcialmente activados.
- El **estadio 4**, es el que determina si la enfermedad se hará aparente desde el punto de vista clínico. En este caso la respuesta inmune celular juega un papel determinante. Si se desarrolla una respuesta celular pobre, los bacilos escapan del borde del foco caseoso y de nuevo se multiplican en macrófagos no-activados y en los parcialmente activados que se encuentran en la periferia del foco caseoso.

De nuevo, los macrófagos conteniendo a los bacilos son destruidos por el sistema inmune, lo que causa el crecimiento del centro caseoso y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, si se desarrolla una buena respuesta inmune celular el centro caseoso es rodeado por macrófagos activados, y esos macrófagos ingieren y destruyen o inactivan a los bacilos libres, lo cual detiene la evolución de la lesión, dejándola en un estado subclínico.

- En el **estadio 5**, se observa licuefacción del centro caseoso. Este estadio ocurre cuando el bacilo evade la respuesta inmune del hospedero, y cuando esto ocurre, los bacilos se multiplican en el medio extracelular y suelen alcanzar un enorme número. A tal grado que a pesar de que se desarrolle una adecuada respuesta inmune celular ésta no es suficiente para controlar la infección. Además, la alta concentración de productos *tuberculin-like* producidos por estos bacilos causa una respuesta del tipo de hipersensibilidad tardía que erosiona la pared bronquial y forma una cavidad. Entonces, las micobacterias invaden el árbol bronquial y se dispersan por otras partes del pulmón, tracto respiratorio inferior (TRI) y también en el medio ambiente, principalmente expelidas por la tos del paciente. Ver a continuación en Figura N° 1 la representación esquemática de los cinco estadios de la tuberculosis pulmonar causada por la infección de *M. tuberculosis* (7) (10).

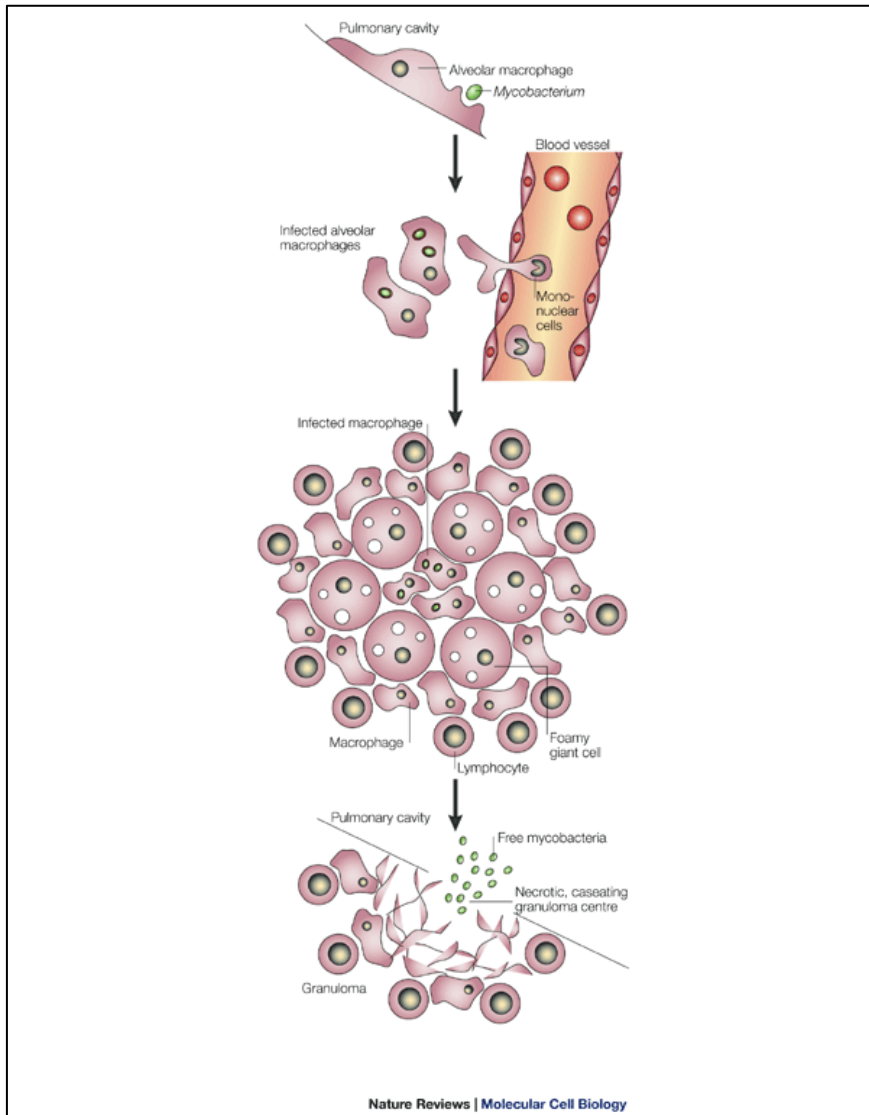


Figura N° 1.- Estadios de la tuberculosis pulmonar (10)

M. tuberculosis infecta las áreas pulmonares en estadios tempranos y se disemina a lo largo del tracto respiratorio inferior conforme avanza la enfermedad, ver Figura N° 2.

(15)

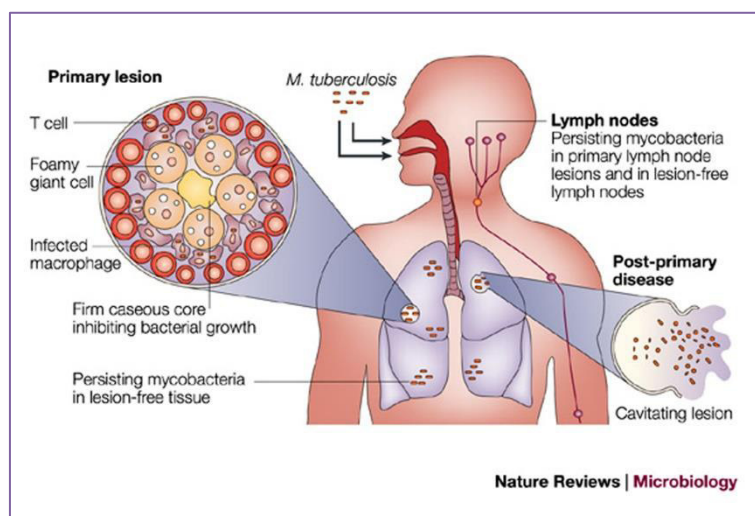


Figura N° 2.-Patogénesis de la Tuberculosis (15)

4.3. Manifestaciones Clínicas

La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunitario actúa formando una barrera alrededor de la bacteria. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. El comienzo de la tuberculosis pulmonar suele ser insidioso, sin que el paciente se sienta enfermo durante algún tiempo. De hecho, la tuberculosis pulmonar suele tardar unas semanas en alcanzar su pleno desarrollo. Si no se trata, la tuberculosis pulmonar sigue en curso crónico y progresivo. Aproximadamente una tercera parte de los enfermos vivirá mucho tiempo alternando su enfermedad crónica con períodos de bienestar relativo. Pero en la mayoría de los casos estos lapsos de tiempo van seguidos de agravamiento, con afección cada vez mayor del parénquima pulmonar. La mortalidad global de la tuberculosis pulmonar no tratada se acerca al 60%, y la evolución hacia la muerte se produce en unos dos años y medio. El bacilo de la tuberculosis tiene predilección por las partes altas del pulmón,

donde hay una mayor concentración de oxígeno intra-alveolar (16).

El grado de extensión de la enfermedad varía desde infiltrados mínimos, que transcurren sin síntomas y que apenas son visibles en la radiografía de tórax, hasta una afección masiva, con cavitación (formación de cavernas pulmonares) extensa y con síntomas respiratorios y generales debilitantes. Al empeorar las lesiones pulmonares, aparecen necrosis central con desarrollo de caseificación, así llamada porque el material necrótico tiene aspecto de queso. Simultáneamente, crecen lesiones satélites visibles en la radiografía de tórax. El material necrótico puede vaciarse en los bronquios, produciéndose la cavitación de la lesión. Con el avance de la tuberculosis, se pierde la estructura pulmonar normal; son típicas la fibrosis, la pérdida de volumen y la retracción (16).

4.4. Epidemiología de la Tuberculosis en Perú

En 1993 la tuberculosis fue declarada como Emergencia Global por la Organización Mundial de la Salud, mientras en Perú la tuberculosis pulmonar es la principal enfermedad social totalmente curable que afecta a la población económicamente activa, siendo los niños, adolescentes y adultos mayores la tercera parte de los casos. Se puede observar que del 100% de incidencia de esta enfermedad en el país, más del 50% se encuentra en los departamentos de Lima y Callao, mientras que en el interior del país no es uniforme siendo Loreto, Ucayali, Madre de Dios, Ica y Tacna, los departamentos que reportan el mayor número de casos (17) (18).

En Perú en el año 2010 se diagnosticaron 32,477 casos de Tuberculosis (Tuberculosis en todas sus formas), de los cuales 28,297 fueron casos nuevos, correspondiendo de ellos 17,264 a casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopía positiva, cifras que traducidas

en termino de tasas (por 100,000 habitantes) correspondieron respectivamente a morbilidad total (110.2%), incidencia total (96.1%) e incidencia tuberculosis pulmonar Bk (+) 58.6 %. A pesar de los esfuerzos, Perú no ha podido detener el ingreso de nuevas amenazas surgidas en el mundo, como lo son la TB- MDR y la TB XDR. Referente a la Tuberculosis MDR, demostradas por Prueba de Sensibilidad en el periodo 1997 al 2010 correspondieron a: 44 y 1094 casos respectivamente, observándose que desde el año 1997 al 2005 hubo un incremento sostenido para luego mostrar una tendencia de meseta y en el 2010 un inicio de descenso, es importante considerar que en el mismo periodo de tiempo las Pruebas de Sensibilidad, examen de laboratorio indispensable para el diagnóstico de TB-MDR, ha presentado una tendencia permanente al incremento, siendo más notorio en el periodo 2009 – 2010. Referente a la tuberculosis TB-XDR, demostrados por Prueba de sensibilidad de primera y segunda Línea, en el periodo 1999 al 2010 se tienen 315 casos acumulados, estimándose un incremento de casos TB-XDR al año 2011, también para el diagnóstico de la TB-XDR es indispensable disponer de resultados de Pruebas de Sensibilidad de primera y segunda línea. Se observa que desde el año 2005 al 2010 hay un incremento permanente de las Pruebas de Sensibilidad de 2da Línea al registrar 1356 pruebas de Sensibilidad en el año 2005 y 5687 en el año 2010. Por otro parte, existe una estrecha relación entre el SIDA y la tuberculosis. Por lo tanto, la propagación de la infección por VIH entre la población con una elevada prevalencia de infección de tuberculosis, está teniendo como consecuencia un aumento considerable de ésta. El Perú no es ajeno a ello, por lo que en el año 2007 la asociación VIH-SIDA-Tuberculosis, notificada por el Ministerio de Salud, representó el 2,49% de la morbilidad general por tuberculosis, observándose que la letalidad de esta enfermedad es alta en los pacientes co-infectados probablemente debido a complicaciones asociadas con

el SIDA o un diagnóstico tardío de tuberculosis (19).

En el 2016, el Ministerio de Salud hizo un análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú en el 2015, en donde indican que los estudios nacionales para estimar el riesgo anual de infección por tuberculosis (RAIT), realizados en nuestro país durante los últimos 30 años, reportaron cambios importantes en los patrones de transmisión de *M. tuberculosis*. En los años 1994-1995, en Lima y Callao el RAIT estimado fue 1.5% y en otras ciudades del país fue 7 veces menor (0.2%); para los años 2004- 2005 se estimó un RAIT muy similar tanto para Lima-Callao (0.83%) y el resto de ciudades del país (0.76%), pero que comparado con el periodo anterior, En Lima- Callao se observó una reducción de casi la mitad y, para el resto de provincias un incremento de 4 veces; la estimación para los años 2008 y 2009 el RAIT fue muy similar al periodo anterior. Desde el fortalecimiento del programa de control de la tuberculosis en la década de los 90 hasta el año 2003, en el país se observó una disminución sostenida en la incidencia de TB mayor al 8% anual. Posterior a esta época la tendencia se mantuvo casi estacionaria, observándose una disminución promedio anual de 2%. Para el año 2014 se reportaron en nuestro país alrededor de 27350 casos nuevos de TB y la incidencia de TB reportada fue de 88.8 casos nuevos por cada 100 mil habitantes. En los últimos 2 años (2013 al 2014) cinco departamentos (Madre de Dios, Ucayali, Loreto, Lima, e Ica) presentaron incidencia de TB por encima del nivel nacional, estos departamentos reportaron el 72% de los casos nuevos notificados en el país, ver tabla N° 2 incidencia de TB en el año 2013 y 2014 en nuestro país (20).

Lima es el departamento que más casos de tuberculosis concentra en el país (60%) y, es el tercer departamento con la incidencia más alta; el mayor porcentaje de casos se concentran en la provincia metropolitana de Lima, y en sus distritos de San Juan de

Lurigancho, Rímac, La Victoria, El Agustino, Ate, Santa Anita y Barranco. El promedio de edad fue 35 años con un rango entre 21 y 48 años. La mediana de la edad por género fue similar tanto en el grupo de hombres como en el de mujeres. El mayor porcentaje de afectados por TB fueron personas sin empleo, jubilados, preescolares (33.2%) y estudiantes (19.3%). El 82% de los casos de TB notificados en los años 2013 y 2014 afectaron principalmente a los pulmones. El 77% de los casos con TB pulmonar se diagnosticaron con baciloscopía positiva y casi el 40% con baciloscopías con una carga bacilar alta (2 a 3 cruces). Se reportó casi un 18% de casos de tuberculosis extra pulmonar y el mayor porcentaje tuvieron localización pleural (54%), ganglionar (11.1%) y meníngea/sistema nervioso (9%). El promedio de sintomáticos respiratorios identificados (SRI) en los establecimientos de salud del país en el periodo del 2011 al 2014 superó el millón y medio de SRI por año a nivel nacional. En los últimos 10 años, se identificaron en promedio alrededor de 3 contactos por cada caso y, se llegaron a examinar en promedio al 82% de los mismos (20).

En cuanto a la tuberculosis MDR en el reporte del 2016 indican que desde el año 1997 hasta el año 2014 se han detectado en nuestro país, más de 15 mil casos de TB MDR. El mayor número de casos de TB MDR se han reportado en los últimos 10 años (del 2005 en adelante) donde, el promedio reportado por año superó los 1100 casos de TB MDR, con una tendencia creciente en los últimos 4 años. El mayor porcentaje de los casos de TB MDR, han sido reportados en departamentos de la costa, Lima con el 83,1% y un 12% en otros departamentos de la costa. Ver figura N° 3 con el mapa del Perú y los reportes de casos de TB MDR en el 2005, 2009 y 2014 de acuerdo a las regiones (20).

Desde la detección del primer caso con TB XDR (1999) hasta el año 2014, se han diagnosticado más de 600 casos de TB XDR. En los últimos 7 años (2008-2014) se han

detectado el 80% de los casos de TB XDR. La proporción de los casos de TB XDR entre los casos de MDR, se ha incrementado de manera acelerada, de menos de 2 casos de TB XDR por cada 100 casos de TB MDR antes del 2005, a 6 para el año 2014.

Antes del 2005 la TB XDR era un problema centrado en algunos distritos de la provincia de Lima Metropolitana y el Callao, para el año 2009 se reportaron casos en otros 9 departamentos, para el año 2014 se diagnosticaron al menos un caso de TB XDR en más de la mitad de los departamentos del país. El mayor número de casos de TB XDR del país se han detectado en los distritos de Lima metropolitana y el Callao, principalmente en San Juan de Lurigancho, El Agustino, Ate, Santa Anita, La Victoria, San Martín de Porras y Lima Cercado. Para el año 2014 en el país se desarrollaron 27929 pruebas rápidas fenotípicas y moleculares, de las cuales 43% (11954) fueron con *Genotype MTBDR plus*, con esta prueba se alcanzado una cobertura de 70% en los casos nuevos de TB Pulmonar con cultivo o frotis positivo (20).

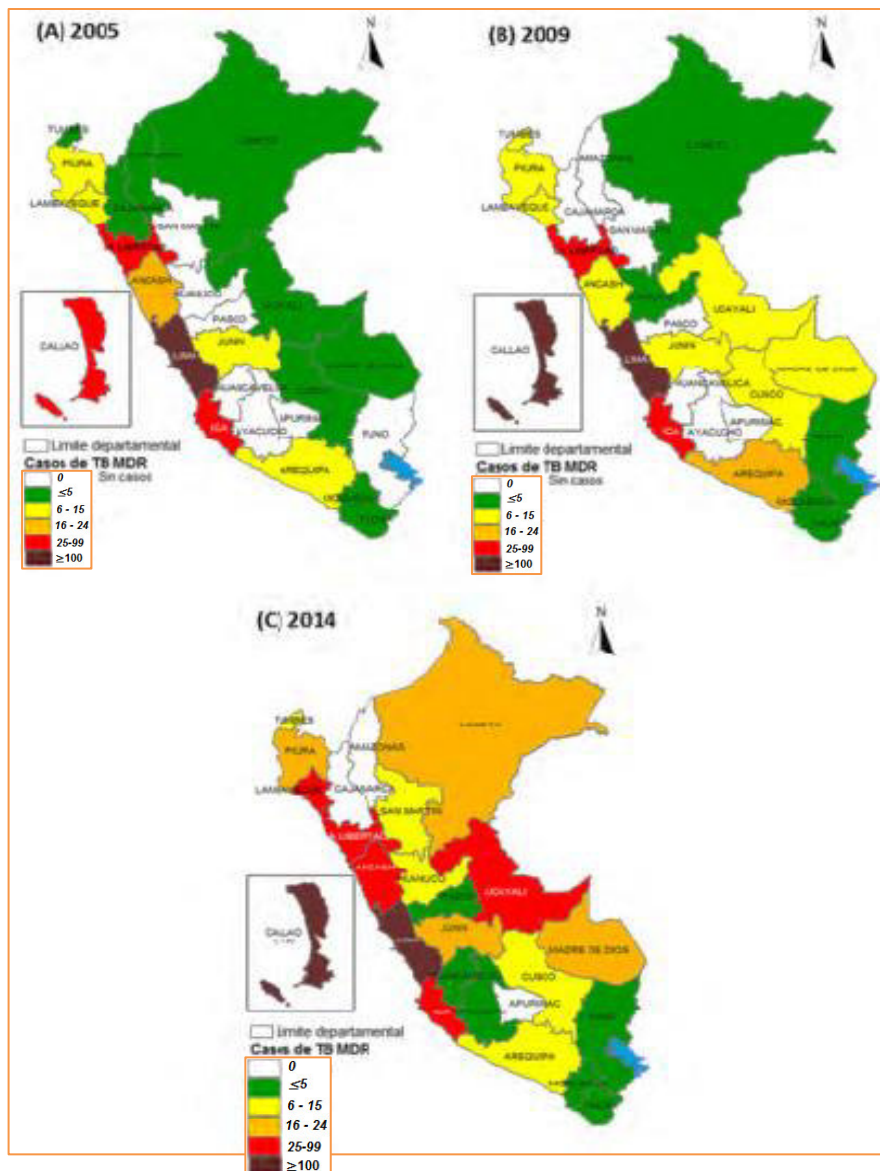


Figura N° 3.-Mapas del número de casos de TB MDR según departamento

Perú, 2005 (A), 2009 (B) y 2014 (C) (20)

Tabla N° 2.- Casos nuevos e incidencia de tuberculosis por departamentos, Perú - Año 2013 y 2014 (20)

Departamento	N° Casos nuevos Año 2013	N° Casos nuevos Año 2014	Incidencia TB 2013	Incidencia TB 2014	% de casos nuevos TB 2013	% de casos nuevos TB 2014	% de casos TB nuevos acumulado 2013	% de casos TB nuevos acumulado 214
Perú	27505	27350	90.3	88.8				
Madre de dios	234	270	178.8	201.3	0.9%	0.8%	0.9%	0.8%
Lima*	16265	16618	154.6	155.5	59.1%	60.7%	60.0%	61.5%
Tacna	458	437	137.4	127.2	1.7%	1.6%	61.6%	63.1%
Ucayali	771	598	159.4	122.1	2.8%	2.3%	64.4%	65.4%
Loreto	1272	1113	124.9	108.2	4.6%	4.2%	69.0%	69.6%
Ica	751	761	97.3	97.6	2.7%	2.9%	71.8%	72.4%
Moquegua	144	141	81.5	78.9	0.5%	0.5%	72.3%	73.0%
La libertad	1257	1245	69.3	68.0	4.6%	4.6%	76.9%	77.5%
Arequipa	771	766	61.2	60.4	2.8%	2.8%	79.7%	80.3%
Lambayeque	825	721	66.5	57.9	3.0%	2.6%	82.7%	82.9%
Junin	792	711	59.5	54.9	2.9%	2.6%	85.5%	85.5%
San Martín	333	436	40.7	52.6	1.2%	1.6%	86.8%	87.2%
Ancash	628	584	55.3	51.1	2.3%	2.1%	89.0%	89.3%
Tumbes	83	116	35.9	49.4	0.3%	0.5%	89.3%	89.8%
Huanuco	396	411	46.7	48.1	1.4%	1.4%	90.8%	91.2%
Cusco	697	603	53.6	45.4	2.5%	2.2%	93.3%	93.4%
Ayacucho	281	246	41.7	36.1	1.0%	0.9%	94.3%	94.3%
Pasco	85	96	28.4	31.8	0.3%	0.3%	94.6%	94.6%
Puno	441	444	31.7	31.7	1.6%	1.7%	96.3%	96.3%
Piura	514	501	28.3	27.4	1.9%	1.8%	98.1%	98.1%
Amazonas	92	114	21.9	27.1	0.3%	0.4%	98.5%	98.5%
Huancavelica	89	108	18.3	22.0	0.3%	0.3%	98.8%	98.9%
Apurímac	106	97	23.3	21.2	0.4%	0.4%	99.2%	99.2%
Cajamarca	220	213	14.5	14.0	0.8%	0.8%	100.0%	100.0%

*Incluye Callao

4.5. Epidemiología de la Tuberculosis infantil en el Perú

En los años 2013 y 2014 del total de casos notificados un 7.7% fueron menores de 15 años. La incidencia de TB en los menores de 15 años se ha mantenido estacionaria del 2010 al 2015, con un promedio de 30 niños afectados por TB por cada 100 mil niños

menores de 15 años. La razón de niños por adulto afectado por TB ha disminuido progresivamente en la última década, en los últimos 6 años se reportó una razón de 8 niños por cada 100 adultos (20).

El porcentaje de TB Pulmonar en menores de 15 años, fue muy similar a lo reportado en adultos. Pero más de la mitad de los casos de TB Pulmonar en menores de 15 años fueron diagnosticados con baciloscopía negativa o sin baciloscopía, a diferencia de los mayores de 15 años donde casi el 80 % de los casos son diagnosticados con baciloscopía positivo. El porcentaje de casos menores de 15 años que tuvieron contacto con otros pacientes con TB, fue mayor (49.2%) que los mayores de 15 años (30%); además este porcentaje se incrementó en los más pequeños (63% en menores de 5 años) (20).

4.6. Tuberculosis Pediátrica

La tuberculosis (TB) del niño tiene, con respecto a la del adulto, claras diferencias en el comportamiento epidemiológico, en la presentación clínica y los métodos diagnósticos. La población pediátrica, en especial los menores de 5 años, son los más susceptibles. Es en estos pacientes donde la diseminación hematogena secundaria hacia localizaciones extra-pulmonares ocurre con mayor frecuencia (son vulnerables a desarrollar formas graves de Tuberculosis, conocidas como Meningoencefalitis Tuberculosis [MEC TB] aquella que afecta al sistema nervioso central). Otras particularidades que se presentan en un niño con TB: es una infección con bajo nivel de bacilos en la expectoración (denominada: paucibacilar), por lo que la definición de la Organización Mundial de la Salud de aislamiento biológico imprescindible del *M. tuberculosis* para el diagnóstico de TB no es aplicable en un alto porcentaje de casos de tuberculosis pediátrica. Tratándose casi siempre de TB con baciloscopía negativa, es decir no se encuentra el causante de la

enfermedad, el Bacilo de Koch en el examen de esputo (21).

4.7. Diagnóstico de la Tuberculosis Pediátrica

Los estudios en tuberculosis pediátrica difieren marcadamente entre países desarrollados y en vías de desarrollo. Por ejemplo en países como Estados Unidos, los porcentajes de reactividad a la prueba de la Tuberculina o de Mantoux (Tuberculina Skin Test) en la población en general son bajos, por lo tanto esta prueba es útil en el diagnóstico de tuberculosis. Sin embargo, en muchos países en desarrollo tales como el Perú, la interpretación de esta prueba para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar es menos confiable debido a que la mayoría de la población es positiva a esta prueba (22).

En la Norma Técnica de Salud para la Atención integral de las personas afectadas por Tuberculosis - MINSALDGSP V.01 (23), definen que la detección de casos de TB infantil se basa en el estudio de contactos del caso índice con TB, por lo que se debe priorizar el diagnóstico en niños que pertenezcan a grupos de alto riesgo de desarrollar enfermedad activa como son: contactos de TB pulmonar con frotis positivo, contacto de casos TB MDR, menores de 5 años, infección por VIH, niños con desnutrición severa.

El diagnóstico de TB infantil se sustenta en la evaluación clínica, el antecedente epidemiológico, estudio inmunológico (PPD), estudios bacteriológicos y otros resultados de exámenes auxiliares.

La evaluación para el diagnóstico de TB infantil debe incluir:

1. Historia clínica detallada: Incluyendo síntomas compatibles con TB (tos más de 2 semanas, fiebre por más de 14 días, pérdida de peso o retraso en el crecimiento) y antecedente de contacto con casos confirmados de TB activa.

2. Examen físico completo: Evaluación del crecimiento y desarrollo, buscar adenopatías, signos meníngeos, deformaciones de columna, entre otros.
3. Aplicar PPD independiente de haber recibido vacuna BCG. Se considera positivo si el PPD es mayor de 5 mm en niños con desnutrición, hijos de madres con TB, infección por el **VIH** u otras inmunodeficiencias; y mayor de 10 mm en el resto de niños.
4. En niños con sintomatología respiratoria o con lesión radiológica pulmonar se deben tomar dos muestras de esputo o aspirado gástrico, para baciloscopía y cultivo.
5. Radiografía de tórax frontal y lateral.

El diagnóstico de un caso de TB pulmonar infantil sin confirmación bacteriológica será realizado por el médico pediatra o por el médico consultor y debe sustentarse en por lo menos tres de los siguientes criterios:

- Contacto de caso TB pulmonar frotis positivo dentro de los últimos 12 meses.
- Evaluación clínica sugestiva para TB.
- PPD positivo.
- Radiografía de tórax sugerente de TB.

Todo caso de TB infantil debe recibir el mismo tratamiento para personas adultas con y sin infección por VIH, contemplado en la Norma Técnica de Salud con dosis ajustadas a su peso. En los casos de TB infantil que son contactos de un caso con TB resistente, se debe además:

- Obtener muestras para baciloscopía, prueba de sensibilidad rápida, cultivo y prueba de sensibilidad convencional.

- Referir al niño al médico consultor.
- Iniciar tratamiento empírico de acuerdo a esquema que recibe el caso índice.
- Reevaluar el caso de acuerdo al resultado de la prueba de sensibilidad y la evolución clínica (23).

La detección de tuberculosis en niños se hace aún más difícil debido a la naturaleza paucibacilar y a la dificultad de obtención de esputo en niños lo cual conlleva al uso de métodos invasivos, costosos e incómodos tales como: el esputo inducido, el aspirado gástrico o el lavado broncoalveolar, etc. Esto hace que el diagnóstico considere además otros criterios, que son conocidos como criterios de Stegen y Toledo, teniendo así los siguientes criterios mencionados en la norma técnica pero agrupada en:

- Criterio epidemiológico, es decir el antecedente de una persona enferma con tuberculosis en la familia; porque recordemos que "detrás de un niño con tuberculosis hay siempre un adulto con tuberculosis",
- Criterio radiológico, a través de una radiografía de tórax que sugiera al médico tratante la posibilidad de la enfermedad,
- Criterio clínico, que muchas veces no aporta mayor información pues los síntomas de la tuberculosis son inespecíficos en los niños, generalmente el niño no tose y suele lucir sano de allí la importancia de una adecuada evaluación para el descarte de la enfermedad,
- Criterio inmunológico, evaluado a través del examen de PPD preparado biológico que se inyecta en el antebrazo del niño y cuya reacción nos permite determinar si el niño ha sido infectado con el bacilo de la tuberculosis.
- Criterio bacteriológico, cuando se confirma la enfermedad por el hallazgo del

bacilo de Koch mediante el diagnóstico generalmente microbiológico.

Todos estos criterios proporcionan información al médico tratante lo cual le permite hacer el diagnóstico de tuberculosis en el niño, ver tabla N°3 (24,25).

Tabla N°3.- Criterios de Stegen modificado por Toledo (25)

Criterios	Puntaje
Hallazgo del Bacilo de Koch	7 puntos
Granuloma específico (histológico)	4 puntos
PPD mayor de 10mm.	3 puntos
Antecedente epidemiológico	2 puntos
Radiografía sugestiva	2 puntos
Cuadro clínico sugestivo	2 puntos

Interpretación de la suma del puntaje:

Hasta 2 puntos: No es tuberculosis

3 a 4 puntos: El diagnóstico es posible y amerita estudio más profundo

5 a 6 puntos: El diagnóstico es factible y amerita iniciar tratamiento

7 a más puntos: El diagnóstico es de certeza. Iniciar tratamiento

En Perú, desde hace más de 15 años el Programa de tuberculosis del Ministerio de Salud incluyó los Criterios de Stegen modificado por Toledo en el Manual de Normas y Procedimientos en Tuberculosis para decidir el diagnóstico y tratamiento de la

tuberculosis en niños. Estos sistemas de criterios y puntajes son útiles cuando se tiene duda del diagnóstico y no se encuentra el criterio bacteriológico (25).

4.8. Diagnóstico Microbiológico

Los datos clínicos-radiológicos tienen valor de sospecha en ocasiones muy fundada o bastante significativa, pero el diagnóstico definitivo es el hallazgo del bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) en la muestra clínica obtenida del paciente. Tradicionalmente se utilizan dos pruebas para establecer el diagnóstico de infecciones por micobacterias en la práctica clínica: la microscopía y el cultivo. La principal muestra para el aislamiento de bacilos de lesiones pulmonares es el esputo expectorado espontáneamente, una buena muestra de esputo debería contener entre 2 y 5 mL; y se podrían necesitar al menos 3 muestras de esputo para encontrar BAAR en aquellos pacientes que eliminan bacilos intermitentemente de sus lesiones pulmonares. En caso de no haber posibilidad de obtener éste por los procedimientos convencionales se utilizan otros métodos para inducir éste. Una vez obtenida la muestra se procede a realizar tradicionalmente las técnicas de tinción (para la observación microscópica y corroborar la presencia del bacilo) y /o técnicas de cultivo de micobacterias (7).

4.8.1. Métodos de identificación por observación microscópica

Para realizar el examen directo de los BAAR en esputo por microscopia, se debe realizar una extensión de la porción más purulenta de la muestra, que ocupe las dos terceras partes de la lámina, cuidando de no realizar un frotis excesivamente grueso. Se fija la extensión

a la llama o en una placa caliente y posteriormente se realiza la tinción.

Las técnicas de tinción más utilizadas son las de Ziehl-Neelsen y la de auramina, las cuales se basan en la propiedad de ácido-alcohol resistencia de las micobacterias.

La tinción de Ziehl-Neelsen consiste en cubrir la preparación con fucsina fenicada, calentar suavemente a la llama por debajo del porta objeto hasta la emisión de vapores y dejar actuar por lo menos por 15 minutos. Se lava con agua, se decolora con alcohol ácido (al 50%), y a los 5 minutos, tras lavar de nuevo, se añade el colorante de contraste, que es el azul de metileno. Al cabo de un minuto se lava y se deja secar. Con esta técnica, los bacilos se ven rosas sobre fondo azul. Para la microscopía de fluorescencia se cubre la preparación con una solución de auramina, a los 20 minutos se lava con agua, se decolora durante 3 minutos con alcohol ácido, se cubre con el colorante de contraste (rojo tiazina) y al cabo de un minuto se lava y se deja secar. Por esta técnica, se observan los bacilos con fluorescencia amarilla intensa sobre fondo oscuro, y las fluorescencias parásitas aparecen en rojo. La microscopía es, en general, un método rápido y útil como screening presuntivo, pero no permite la identificación de la micobacteria observada, y los bacilos deben estar presentes en una concentración superior a 10 000 bacterias/mL para que la detección sea segura (7).

4.8.2. Métodos de cultivo de micobacterias

Por otro lado, las técnicas de cultivo permiten el aislamiento de micobacterias, pero requieren una mayor complejidad técnica. Cuando se trata de realizar el aislamiento de micobacterias a partir de productos contaminados, es necesario eliminar completamente la microflora bacteriana asociada, permitiendo la supervivencia del mayor número posible de micobacterias, y además fluidificar las muestras, que en ocasionadas son muy

viscosas. A este procedimiento se le denomina decontaminación-fluidificación y se realiza antes de inocular la muestra en el medio. Se dispone de varios métodos de decontaminación – homogeneización; los más utilizados son de Karlson (con hidróxido de sodio al 2%), de Tacquet y de Tison (con lauril sulfato) y de Kubica (con N-acetil cisteína) (7).

Entre los medios de cultivo de micobacterias más utilizados tenemos a Lowenstein-Jensen y el Coletsos (medios sólidos a base de huevo) solidificados en un tubo inclinado con tapa rosca; también existen técnicas con base de agar (Dubos o Middlebrook 7H10 y 7H11). La técnica de cultivo usando el medio Lowenstein- Jensen es la prueba de oro o “Gold standard”, contra el cual se comparan las otras técnicas tanto en especificidad como sensibilidad. La identificación de *M. tuberculosis* mediante cultivo se basa en que es una micobacteria de crecimiento lento, no cromógena, que en los medios habituales (como Lowenstein- Jensen) presenta una morfología típica: colonias secas, rugosas, descritas por algunos autores como en “miga de pan”. Da positiva a la prueba de la niacina, frente al resto de las micobacterias, que la dan negativa, y también da positivo a la reducción de nitratos (7). El problema con la tinción es que se necesita una gran cantidad de bacterias para que la prueba sea positiva, mientras que el método microbiológico es excesivamente lento para las necesidades de la clínica (crecimiento lento de *M. tuberculosis* que puede tardar de 3 a 6 semanas); por lo que durante las últimas décadas se han desarrollado otras técnicas para su identificación como la cromatografía y las basadas en el análisis de ácidos nucleicos. Éstas últimas son las que han demostrado mejores resultados (10).

4.9. Utilización de Técnicas Moleculares para la detección de *M. tuberculosis*

El diagnóstico clásico de la tuberculosis se ha basado en la baciloscopía y el cultivo. Sin

embargo éstos poseen aún limitaciones importantes; debido a ello, y a la alta frecuencia de esta enfermedad en nuestro país, se ha creado la necesidad de implementar nuevas estrategias basadas en métodos rápidos, sensibles y específicos.

El desarrollo de pruebas rápidas basadas en biología molecular ha surgido como alternativa para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Entre estas pruebas está la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se presenta como un método rápido de gran sensibilidad (1 ng/ μ L de ADN) y especificidad, entre 98% y 100% para micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Entre los blancos genéticos de amplificación más comunes para la identificación de micobacterias, se presenta la secuencia de inserción IS 6110 específica de los miembros del complejo *M. tuberculosis* y el gen hsp 65 ligado a la restricción específica del producto de amplificación conocido como metodología de PCR (análisis de restricción de los productos de PCR), que se ha descrito como una metodología rápida, económica y de fácil implementación para la identificación de micobacterias (26).

La detección de material genético específico de *M. tuberculosis* suele realizarse a partir de muestras biológicas o de cultivo, permitiendo establecer el diagnóstico en 1-3 días, en lugar de las 2- 4 semanas del cultivo. Dicha detección es posible independientemente de la viabilidad de la bacteria y del tamaño de la muestra, ver tabla N^o4 (27).

Tabla N°4: Características de los principales métodos de diagnóstico para *M. tuberculosis*. Modificado por Palma-Nicolás y col. (28).

Prueba	Tiempo requerido	Principales inconvenientes	Valor Diagnóstico
Baciloscopía	3 días (3 muestras)	Baja sensibilidad	No
Cultivo	3-8 semanas	El tiempo que requiere	Si
PCR	1-3 días	Costo elevado	Si

A nivel mundial, varios grupos de investigación han propuesto y utilizado diferentes dianas génicas (IS6110, 32kDa, 65kDa, etc.), y en ellas distintos fragmentos, para la detección de ADN de *M. tuberculosis* mediante PCR (27).

En el 2004, analizaron diferentes primers o cebadores (para las secuencias génicas: IS6110, 65kDa, 38kDa y MPB64) utilizados en el diagnóstico de tuberculosis mediante PCR y sus variantes, los resultados obtenidos demostraron que todas las secuencias génicas analizadas fueron encontradas en todas las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de la población estudiada (Amazonas, Brasil). Además, demostraron que la amplificación de la secuencia génica 65kDa mediante PCR-Nested presenta una concordancia observada de 88,9%, co-positividad de 84,2% y co-negatividad de 100% con el cultivo en el medio sólido Lowenstein-Jensen (27).

Por otra parte, nuestro país no es ajeno a este tipo de investigaciones y desde hace varios años se vienen desarrollando estudios al nivel de biología molecular para la identificación de *M. tuberculosis* en distintas muestras biológicas, así como detección de genes

asociados a resistencia a drogas. Así, en el 2003, Montenegro y col (8), emplearon y estandarizaron el método de la PCR usando la variante *hemi-nested* para la detección rápida de *M. tuberculosis* en muestras de aspirado gástrico, aspirado nasofaríngeo y muestras de esputo; demostrando una sensibilidad de 90,4% y una especificidad de 94% comparado con el cultivo que es el Gold standard.

4.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. El DNA puede ser clonado directamente o usado en una amplia variedad de procedimientos analíticos. La PCR es una técnica de una gran simplicidad. Se preparan dos oligonucleótidos sintéticos, cada uno complementario de secuencias en las hebras opuestas del DNA diana, situadas justo en los extremos del segmento que se quiere amplificar. Los oligonucleótidos sirven de cebadores (o denominados “primers” en inglés) para la replicación, con los extremos 3’ de las sondas hibridadas orientados uno hacia otro y posicionados para cebar la síntesis a lo largo del segmento de DNA (o ADN) deseado (29).

4.10.1. Etapas de la PCR

Consiste en la ejecución de varios ciclos consecutivos siguiendo para cada ciclo tres pasos (Figura N°4), cada uno con distintas condiciones establecidas de temperatura y tiempo. Por lo general para poder utilizar ésta técnica debe conocer en detalle la secuencia de los extremos del fragmento que se quiere amplificar con

el objeto de diseñar y sintetizar oligonucleótidos complementarios a estos extremos, para que sirvan como cebadores de extensión o “primers” específicos en la reacción.

El DNA aislado que contiene el segmento que se desea amplificar se calienta brevemente para desnaturalizarse y a continuación se enfría en presencia de un gran exceso de los oligonucleótidos sintéticos que actúan a modo de primers o cebadores. A continuación se añaden los 4 desoxiribonucleótidos trifosfato, y el segmento de DNA que ha sido cebado es replicado selectivamente. El ciclo de calentamiento, enfriamiento y replicación se repite 25 o 30 veces en unas pocas horas por medio de proceso automatizado que amplifica el segmento de DNA flanqueado por los cebadores hasta que pueda ser analizado o clonado fácilmente. En la PCR se emplean DNA polimerasas termoestables, tales como la polimerasa *Taq* (obtenida de una bacteria que vive a unos 90°C). La enzima permanece activa después de cada paso de calentamiento y no tiene que ser reemplazada. El diseño cuidadoso de los cebadores utilizados en la PCR, introduciendo, por ejemplo, lugares de corte para enzimas de restricción, puede facilitar la ulterior clonación del DNA amplificado (29).

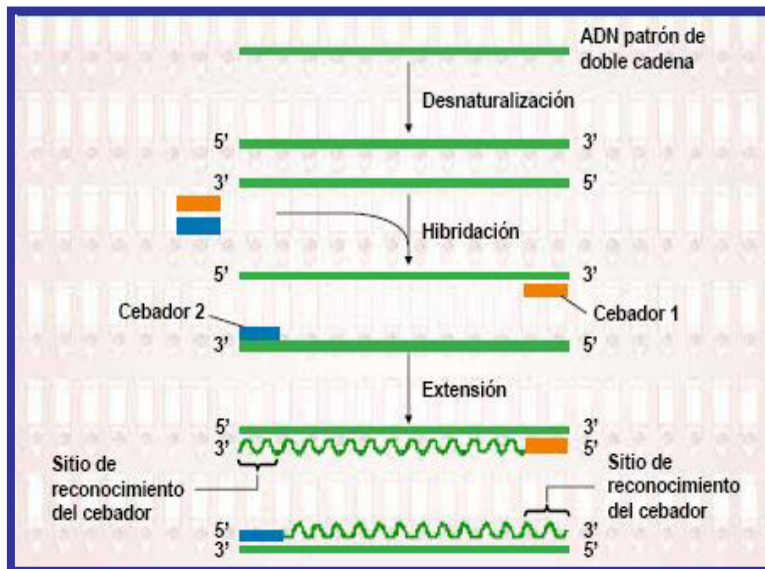


Figura N° 4.- Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.10.2. Ventajas de la PCR (30)

a) **Rapidez**

Se puede obtener resultados de muchas muestras en el mismo día.

b) **Sensibilidad**

Una sola molécula de ADN puede amplificarse, a menudo por PCR, a niveles detectables. La técnica de PCR es una herramienta de diagnóstico muy sensible, para detectar fracciones de ADN de todo tipo de organismos.

c) **Especificidad**

Debido a que el ADN constituye el material genético único de cada organismo.

d) **Información Genética**

Uno de los aspectos más útiles de PCR es que puede proveer información importante sobre el organismo en estudio. Debido a la especificidad de los

cebadores, por ejemplo, puede determinarse el género, árbol filogenético o nivel de especie.

e) **Accesibilidad de la muestra**

Además de las muestras clínicas, pueden analizarse especímenes de una variedad de fuentes usando las mismas técnicas moleculares.

f) **Seguridad**

El primer paso en la preparación de la fuente de ADN es lisar las células. Esto contrasta con muchos procedimientos de diagnóstico clásicos, que involucra el crecimiento de gran cantidad de patógenos para establecer su identidad.

g) **Detección de organismos viables y no viables**

Esta ventaja de la PCR se debe a que los organismos vivos no son necesarios para la detección exitosa. Sin embargo, en situaciones donde se requiere detectar solo organismos vivos se usa RT-PCR.

4.10.3. Componentes de la PCR (30)

El ADN molde (diana o blanco)

Es el ADN el cual se elige copiar e incrementar la concentración, se puede obtener de organismos vivientes unicelulares y pluricelulares; en el caso del ser humano se puede obtener de suero, sangre, esputo, heces, tejidos, etc. Dependiendo del ADN a amplificar y el tipo de PCR a utilizar las características de pureza y concentración varían.

ADN polimerasa

Las ADN polimerasas que se emplean son termorresistentes, la más usada es procedente de *Thermus aquaticus* (*Taq*), pero carece de actividad correctora de errores (exonucleasa 3'-5'), por lo que puede introducir aproximadamente un nucleótido equivocado por cada 1000, este índice de error no suele presentar problemas en la mayoría de aplicaciones, pero ha de tenerse en cuenta, y la magnitud puede ser importante si ocurre en los primeros ciclos. Otras polimerasas, cómo la obtenida de *Pyrococcus furiosus* o la aislada de *Thermococcus litoralis*, incorporan errores con una frecuencia mucho más baja y pueden copiar fragmentos de mayor longitud que la *Taq* ADN - polimerasa.

Para que la especificidad sea máxima, se debe evitar que la polimerasa y el resto de los componentes estén a temperatura ambiente antes de iniciar el primer ciclo. La polimerasa puede también añadirse una vez que se ha producido la primera desnaturalización del ADN o incluso mejor, para no tener que manipular los tubos

una vez iniciado el proceso, la amplificación de secuencias por calor requieren cambios rápidos de temperatura, el proceso se realiza en un termociclador que lleva un microprocesador para programar estos cambios y el número de ciclos deseados.

Ión magnesio (Mg⁺²)

La PCR requiere iones de magnesio divalentes. La concentración de MgCl₂ en la mezcla final de la reacción puede ser variada, normalmente dentro del rango de 0.5 a 5.0 mM para encontrar el óptimo. Los iones Mg⁺² forman un complejo soluble con dNTPs (Desoxiribonucleótidos trifosfatos) que es esencial para la incorporación de dNTP; ellos también estimulan la actividad de la polimerasa y la interacción del cebador con el ADN. La concentración de MgCl₂ puede tener un dramático efecto en la especificidad y rendimiento en una PCR. El exceso de Mg⁺² producirá la acumulación de productos no específicos.

Desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs)

Los desoxiribonucleótidos trifosfatos libres (A, T, C, G) son esenciales para la reacción de síntesis de ADN. La concentración debe estar en el rango de 50 a 200 μM para cada desoxiribonucleótido a fin de tener una especificidad y fidelidad óptima a altas velocidades de incorporación.

Buffer de reacción

Hay varios buffers disponibles para la PCR. El buffer más usado es de la Taq ADN – polimerasa, el cual tiene una concentración de 10X. Los componentes del buffer son:

Tris-HCl, 100 mM (pH 8.3)

KCl 500 mM

MgCl₂ 15 mM

Gelatina 0.1% (w/v)

Las composiciones de los buffers para el uso con otras polimerasas termostables pueden diferir; sin embargo, la mayoría de los proveedores normalmente proporcionan un buffer 10X para el uso con la enzima respectiva.

Agua

Un factor muy importante en la PCR es la calidad del agua utilizada en la reacción. Se sugiere utilizar únicamente agua de alta pureza tridestilada libre de ADN contaminante o de DNAsas.

4.10.4. Adyuvantes de la PCR

Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Los más usados son el DMSO, glicerol y BSA (Bovine serum albumin). Este último a concentraciones por encima de 0.8 µg/µL incrementa la eficiencia de la PCR por estabilizar la Taq ADN - polimerasa.

4.10.5. Iniciadores, cebadores o primers

Los iniciadores son oligonucleótidos pequeños de cadena simple que limitan los segmentos de ADN a determinar, normalmente son fragmentos de 18 a 25 pb que son complementarios a los extremos 5' de las hebras del segmento de ADN que se desea amplificar (29).

4.10.6. PCR anidado o *Nested*

Participan dos pares de cebadores para la amplificación del mismo gen, el segundo par de cebadores se conoce como cebadores anidados o *nested*, los cuales son complementarios a regiones internas específicas del producto de la primera PCR generando un segundo producto más corto que el primero. La lógica de esta estrategia, es incrementar la sensibilidad de la reacción, partiendo del uso de un primer set de cebadores que se unen a secuencias poco específicas pero que tienen mayor probabilidad de ser encontradas, en la segunda reacción se usan cebadores internos específicos para el producto de la primera PCR (29).

En el presente trabajo se usaron 3 cebadores o primers, en la fase *outer* (1er PCR de un anidado) y en la fase *inner* del PCR (2do PCR de un anidado) se repitió un mismo cebador, por lo que la técnica se denomina *Hemi-Nested*. Ver figura N°5 ilustrativa de PCR anidado.

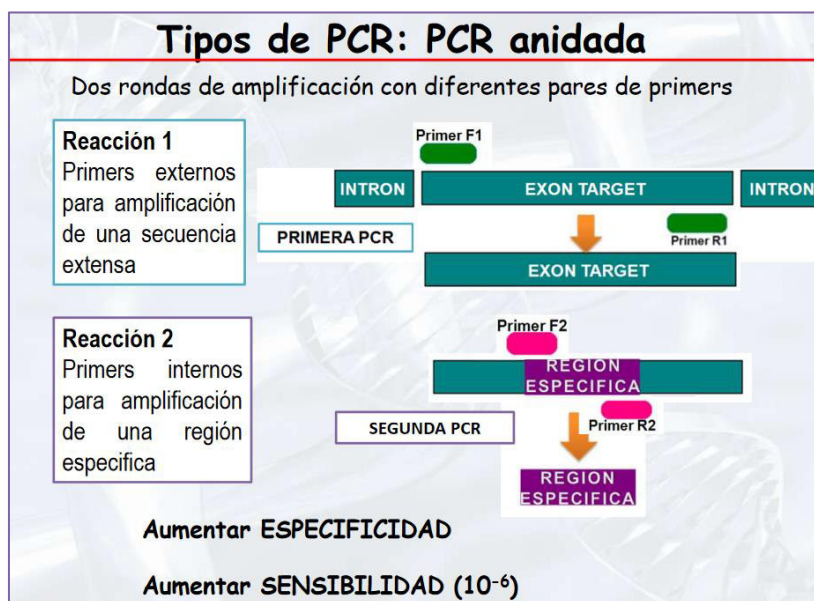


Figura N°5: PCR anidada (30)

Montenegro y col, estandarizaron un ensayo de PCR IS6110 *Hemi-Nested*, con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la detección de complejo *M. tuberculosis* en las muestras de esputo (frotis negativo) paucibacilares. Esta técnica fue utilizada y estandarizada para el reconocimiento de *M tuberculosis* en muestras de heces amplificando este segmento de inserción IS6110 de *M. tuberculosis* (8).

IS6110 es un elemento de inserción que se encuentra exclusivamente dentro del *Complejo Mycobacterium tuberculosis*, el cual ha sido descrito en numerosos artículos por cepa. Por otra parte, está presente en múltiples copias, y en diferentes lugares en el genoma, esto ha proporcionado un excelente método por el cual las cepas pueden ser genotipificadas; por lo tanto, debido a estas características que tiene el IS6110, éste ha sido utilizado ampliamente para estudios epidemiológicos (32) (33).

4.11. Secuencia de Inserción IS6110

La secuenciación del genoma completo del *M. tuberculosis* H37Rv fue publicada en 1998 identificando 3974 genes (actualmente 4011). El genoma comprende 4 411 529 pares de bases (pb) con un contenido de Guanina+Citosina (G/C) de 65,6%, esto representa la segunda secuencia bacteriana más grande disponible después de la *Escherichia coli*. El hecho de que la proporción G/C sea elevada a lo largo de todo el genoma, de una forma homogénea, no concentrada en regiones puntuales, denota que se trata de un genoma que no ha recibido el impacto de la transferencia horizontal de islas de patogenicidad. No obstante, se observan regiones con una proporción en G/C superior a la media y que son secuencias pertenecientes a una gran familia de genes que incluyen PGRSs (polymorphic G+C-rich sequences). La Secuencias de Inserción (IS del inglés Insertion Sequence), son

pequeños (<2,5 kilobases) segmentos de ADN que puede insertarse en una molécula blanco. Antes de que se completara la secuencia del *M. tuberculosis* H37Rv, se describieron cuatro elementos de IS en la micobacteria llamadas IS61109, IS108110, IS154711 y el elemento IS-like12. La mayoría de las secuencias de inserción del *M. tuberculosis* H37Rv, se han insertado en regiones intergénicas o no codificantes, a menudo cerca de las regiones del ARN de transferencia (ARNt). En el genoma del H37Rv contiene 16 copias de secuencias de inserción IS6110, que ha sido utilizado en gran medida en el estudio de la epidemiología molecular de la TB y se han hallado seis copias de IS1081, el elemento más estable. Se han identificado nuevos elementos de inserción entre ellos las familias, IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256 y el ISL38. Otra familia encontrada es la de REP13E12 que está localizada a lo largo del genoma del *M. tuberculosis* y está presente solo en los miembros de este complejo (34).

IS6110 es un elemento de inserción que se encuentra exclusivamente dentro del *Complejo Mycobacterium tuberculosis*; la suposición ha sido que esta restricción es el resultado de la falta de intercambio genético con otras especies de micobacterias. Una de las ventajas de esta exclusividad es que IS6110 se ha convertido en una importante herramienta de diagnóstico en la diferenciación de especies del *Complejo Mycobacterium tuberculosis* de otras micobacterias. Por otra parte, del elemento tiene presencia en múltiples copias, y en diferentes lugares en el genoma, esto ha proporcionado un excelente método por el cual las cepas pueden ser genotipificadas; por lo tanto, debido a estas características que tiene el IS6110, éste ha sido utilizado ampliamente para estudios epidemiológicos (32) (33).

4.12. Naturaleza de la muestra a usarse en el estudio:

Tal como se explicó en la hipótesis, para el presente estudio se utilizará las heces como muestra clínica en la que se espera la presencia de *M. tuberculosis* la cual sería detectada por la técnica de PCR.

Las heces están compuestas de alimentos que no se digirieron, bacterias, moco y células del epitelio intestinal que se descaman en el proceso de absorción de nutrientes, microorganismos y otras sustancias que no logran atravesar el epitelio intestinal (35).

Composición:

- ✓ El bolo fecal tiene un peso de entre 150 a 250 g.
- ✓ Agua 80%
- ✓ Sólidos 20% (Almidón, Ac. Grasos, fibras musculares y flora normal 1/3 de las heces)

4.13. Extracción de ADN genómico en heces:

Debido a la naturaleza de la muestra a utilizar, el presente trabajo busca establecer el mejor método para extracción de ADN.

En estudios de extracción de ADN en muestras de heces, se compararon diferentes técnicas para la extracción de ADN genómico en este tipo de muestra. En el estudio realizado por Ariefdjohan y col (36), se hizo un análisis de los kits de extracción de ADN (en muestras de heces) que se tenían en el mercado en el momento de realizar este presente trabajo:

- ✓ Mobio Ultra Clean® Fecal DNA Isolation Kit;
- ✓ QIAamp® DNA Stool Mini Kit;

- ✓ FSp: FastDNA® SPIN Kit;
- ✓ FSo: FastDNA® SPIN Kit for Soil

De estos estudios se determinó que usando los kits FSp y FSo se obtuvo aproximadamente 3 veces más cantidad de ADN que el producto de extracción de usando los otros kits de Mobio Ultra Clean® y QIAamp®.

Por otro lado, en 1991 Walsh y col (37), utilizó como método de extracción una resina quelante: Chelex 100, el cual se ha desarrollado para la extracción de ADN de muestras de tipo forense para el uso con la PCR. Los procedimientos son sencillos, rápidos, no implican ningún disolvente orgánico y no requieren múltiples transferencias de tubos para la mayoría de tipos de muestras. La extracción de ADN a partir de semen y muy pequeñas manchas de sangre utilizando Chelex 100 es tan eficiente o más eficiente que el uso de proteinasa K y extracción con fenol-cloroformo. ADN extraído de manchas de sangre parece menos propenso a contener inhibidores de la PCR cuando se preparan por este método (37).

Tomando en cuenta que ambos métodos de extracción de ADN (FastDNA® SPIN Kit for Soil y usando Chelex 100) en muestras biológicas ofrecen obtener una buena cantidad de ADN, con menos inhibidores para la PCR; se decidió comparar ambos métodos como objetivo secundario en el presente estudio.

5. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental del presente trabajo de tesis, se realizó en el área de Biología Molecular del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas del LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo). Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias y Filosofía – Universidad Peruana Cayetano Heredia.

5.1. Criterios de inclusión:

Los sujetos elegibles cumplieron con los siguientes criterios para ser incluidos en el estudio:

- ✓ Consentimiento informado: Los padres o el/los representante legal del paciente debe poder y estar dispuesto a dar su consentimiento informado por escrito para que su hijo o representado pueda participar en el estudio.
Este consentimiento informado fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Salud del Niño y la Asociación Benéfica PRISMA para su uso en el presente estudio.
- ✓ Edad: de 0 a 12 años de edad tratados en la unidad de neumología del Instituto Nacional de Salud del Niño.
- ✓ Los pacientes debían ser VIH negativos
- ✓ Los pacientes no debían haber recibido tratamiento para tuberculosis.

5.2. Controles Negativos:

Para efectos de este estudio se tomaron muestras negativas de heces, así como aspirados gástricos y nasofaríngeos de niños menores de 12 años. Estos pacientes eran sanos y

tenían exámenes clínicos negativos, sin factores de riesgo de tuberculosis, y test de tuberculina negativo.

5.3. Muestras biológicas

Se trabajaron con muestras de heces y aspirado gástrico- nasofaríngeo obtenidas de pacientes menores de 12 años del Instituto Nacional de Salud del Niño.

Las muestras de heces fueron colectadas el mismo día o al día siguiente que se colectaron las muestras de aspirados gástricos y nasofaríngeos.

Durante la recolección de la muestra en el Instituto Nacional de Salud del Niño se realizó una codificación, la cual fue reemplazada por otra en el Laboratorio con el fin de evitar los sesgos relacionados con las variables de análisis. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C sin ningún aditivo hasta su utilización hasta por un periodo de 2 años.

5.4. Aspirado gástrico y nasofaríngeo

Para efectos del presente estudio, y con la finalidad de poder determinar tuberculosis en los pacientes con sospecha de la misma, se obtuvieron muestras de aspirados gástricos y nasofaríngeos, las cuales fueron expuestas a tinción de auramina y cultivo microbiológico, con la finalidad de determinar cuáles eran los pacientes positivos a tuberculosis en la población que ingresó en el estudio.

La técnica de cultivo usando el medio Lowenstein- Jensen es la prueba de oro o Gold standard, contra el cual se comparan las otras técnicas tanto en especificidad como sensibilidad.

5.5. Extracción de ADN genómico métodos utilizados:

Las muestras de heces fueron retiradas del congelador a -20°C y se dejaron reposar por 20 minutos al medio ambiente, luego de este tiempo se pesaron 200 mg de muestra y se procedió a realizar cada tipo de extracción tipo de extracción usando para el caso de FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene) el método indicado por el fabricante del kit, y para el caso del Método de extracción “Chelex 100” se usó el protocolo desarrollado en el área de Biología Molecular del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas del LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo). Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias y Filosofía – Universidad Peruana Cayetano Heredia. (38)

5.5.1. Método de extracción FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene)

Se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

Se homogeneizaron 200 mg de muestra de heces con 1 mL de buffer fosfato salino, para posteriormente transferirlo a “lysing matriz tube” con 125 μL de buffer de homogeneización, luego se procesó en el Fast Prep (Qbiogene, Irvine, CA) (Figura N°6) por 30 segundos a la velocidad que indica el fabricante. El producto se centrifugó a 1400 rpm durante 1 minuto, se separó el sobrenadante y se añadieron 250 μL de solución PPS (*Protein Precipitation Solution*) componente del kit. Esta solución se utilizó con el propósito de precipitar las proteínas existentes en la muestra. Luego se procedió a homogeneizar la muestra por inversión con el tubo cerrado. Se repitió la centrifugación a 1400 rpm durante 1 minuto; al sobrenadante se añadió una suspensión denominada *Binding Matrix* Suspensión del FastDNA®

SPIN Kit, suspensión que es la responsable de capturar el ADN, se centrifugó a la misma velocidad y tiempo antes mencionado, el ADN fue eluido con 60 μ L de agua desionizada estéril libre de pirógenos.



Figura N° 6.- Equipo FastPrep®

5.5.2. Método de extracción “Chelex 100”

Este método se desarrolló en 2 fases:

Descontaminación de la muestra (Fase I)

Se homogeneizaron 200 mg de muestra de heces en 2 mL de agua y se descontaminó con N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sodio por 15 min como describen Montenegro y cols, Caviedes y cols. (8) (39). Luego, se agregó etanol a una concentración final de 60% y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min.

Extracción del ADN (Fase II)

Se eliminó el sobrenadante y resuspendió el pellet con 980 µL de buffer conteniendo Triton X-100 1%, Tris – HCl 10 mM y EDTA 1 mM, se homogeneizó por 2 min. Luego, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 80 µL de una solución de Chelex 100 10% y Triton X-100 1% en TE (Buffer compuesto por Tris y EDTA). Seguidamente, se homogeneizó e incubó a 100 °C por 30 min, y después a -20 °C por 10 min. Finalmente, se centrifugó a 7000 rpm por 5 min.

5.6. Visualización del ADN genómico total:

Una vez que el ADN fue extraído se analizó la calidad y la concentración de éste realizando una electroforesis en geles de agarosa al 1% previamente preparado con bromuro de etidio 1 mg/mL, en buffer TAE 1X a 90 voltios por 10 min. Después, el ADN se visualizó a través de un transiluminador ultravioleta (Ultraviolet UVP) (31).

5.7. Estandarización de la *Hemi-Nested* - PCR

Durante este estudio se probó con diferentes concentraciones de los componentes de la PCR (concentración de buffer, de cloruro de magnesio, Triton, etc), estandarizándose la técnica al siguiente método final, usando como técnica inicial la usada por Montenegro y Col (8):

5.7.1. Primera fase: Volumen de reacción (*Outer*)

Se empleó un volumen de 25 μL que contenía: Buffer 1X, MgCl_2 1,7 mM, dNTP 178 μM , cebadores 2 μM de c/u, Triton X-100 0,1%, rojo de cresol 0,089 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, *Taq* ADN polimerasa 0,035 U/ μL , agua grado PCR 4 μL (reactivos de Invitrogen) y ADN 3 μL (Aproximadamente 50 ng)

5.7.2. Segunda Fase: Volumen de reacción (*Inner*)

Se empleó un volumen de 25 μL que contenía: Buffer 1X, MgCl_2 2,08 mM, dNTP 178 μM , cebadores 0,52 μM de c/u, Triton X-100 0,1%, rojo de cresol 0,104 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, *Taq* ADN polimerasa 0,041 U/ μL , agua grado PCR 4 μL (reactivos de Invitrogen) y ADN 1 μL (resultado de la primera fase - *outer*).

Las concentraciones de cloruro de magnesio, oligonucleótidos, ADN, y *Taq* ADN polimerasa fueron variadas a fin de encontrar las concentraciones óptimas de amplificación.

5.8. Cebadores específicos

Se utilizaron los cebadores PT8, PT9 y TB290 el fragmento amplificado fue de 360 pb (8) (40). Las secuencias de ambos cebadores son las siguientes, ver figura N°7:

Nested PCR	Outer set	IS6110
	Pt8: GTGCGGATGGTCGCAGAGAT	
	Pt9: GTGCGGATGGTCGCAGAGAT	
	Inner set	
	TB290: GGCGGGACAACGCCGAATGCGAA	
Pt9: GTGCGGATGGTCGCAGAGAT		

Figura N° 7.- Secuencias de Cebadores para IS6110

5.9. Condiciones de amplificación

Se utilizó el termociclador (BIORAD MyCycler TM) donde para la primera fase (*outer*) se realizaron 25 ciclos y para la segunda fase (*inner*) se realizaron 40 ciclos de reacción. Para visualizar los fragmentos de ADN resultantes de la amplificación, se utilizó un protocolo estandarizado en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas, el cual consistió en mezclar 12 µL de ADN amplificado con 3 µL de buffer de carga. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 2.5% con buffer TAE 1X, por 45 min a 95 voltios. Los geles de agarosa fueron preparados con bromuro de etidio (10 mg/mL), colocándose 0,028 µL/mL agarosa/ volumen del gel. Para identificar el tamaño de los productos de la PCR se colocó en un carril 3 µL de 100 pb ADN ladder (Invitrogen), consistente en 15 fragmentos entre 100 a 1500 pb, múltiplos de 100 pb y un fragmento adicional de 2072 pb.

Al finalizar la corrida electroforética las bandas fueron observadas por exposición del gel de agarosa a la luz ultravioleta en un transiluminador (*Ultraviolet UVP*) y se tomaron las fotografías de registro con una cámara (Kodak Digital Science).

5.10. Análisis de sensibilidad y especificidad

Para el análisis de sensibilidad y especificidad de las muestras de heces trabajadas se consideró como Gold standard o prueba de referencia a los cultivos microbiológicos de *M. tuberculosis* (26). Los resultados fueron evaluados en una tabla de contingencia 2 x 2 (8) en la cual se enfrentará los resultados de la prueba de PCR (en filas) con el estado real de los pacientes (en columnas) como se observa en el siguiente esquema:

		PRUEBA DE REFERENCIA	
		POSITIVOS	NEGATIVOS
P C R	Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
	Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Característica	Fórmula
% Sensibilidad	$\frac{VP}{(VP+FN)}$
% Especificidad	$\frac{VN}{(FP+VN)}$

Dónde:

- ✓ VP son los verdaderos positivos, número de pacientes enfermos en los que la prueba fue positiva (resultado correcto).
- ✓ FP son los falsos positivos, número de pacientes sanos en los que la prueba fue positiva (resultado incorrecto).
- ✓ FN son los falsos negativos, número de pacientes enfermos en los que la prueba fue negativa (resultado incorrecto).

- ✓ VN son los verdaderos negativos, número de pacientes sanos en los que la prueba fue negativa (resultado correcto).
- ✓ Llamando $n = VP + FP + FN + VN$ al número de pacientes sometidos a la prueba.

Adicionales datos estadísticos fueron calculados usando el online clinical calculator, que se puede localizar en: <http://www.vassarstats.net/clin1.html>. Ver sección de Anexos.

6. RESULTADOS

6.1. Características de las muestras obtenidas y población utilizada:

Para el presente estudio se obtuvieron 236 muestras de heces, 236 aspirados gástricos y 236 aspirados nasofaríngeo, provenientes de 236 niños.

De los 236 pacientes que aceptaron formar parte de este estudio, se encontraron a 16 pacientes con sospecha clínica de tuberculosis de acuerdo a los criterios de Stegen modificado por Toledo.

6.1.1. Característica de edad de la población utilizada:

Edad de paciente en años:

- Edad media (IQR) 5.05
- Promedio de las edades \pm SD: 4.42 ± 3.04
- Rango de edades de 3 semanas a 11 años.
- Ratio de acuerdo a género (Masculino/Femenino): 12:4

6.1.2. Score de los criterios de Stegen y Toledo en los 16 pacientes con sospecha clínica:

- Promedio del score: 7.44 ± 2.28
- Pacientes con score de ≥ 7 (alta probabilidad de tuberculosis): 11 (69%)
- Rango de score encontrados en los 16 pacientes: 5-13
- Prueba de tuberculina positiva ($\geq 10\text{mm}$): 14 pacientes (88%)
- Tos más de dos semanas: 6 (38%)

- Sospecha radiográfica: 11 (69%)
- Pulmón infiltrado en radiografía: 2 (13%)
- Contacto con adulto infectado con tuberculosis: 14 (88%)

6.1.3. Característica de los controles negativos:

Aceptaron formar parte del estudio 23 niños sanos, así se obtuvieron 23 muestras controles negativas de heces y aspirados nasogástricos y nasofaríngeos. Estos controles negativos fueron usados tanto en la estandarización como en las pruebas realizadas como control negativo.

6.2. Estandarización de la extracción de ADN

A las 236 muestras de heces se le extrajo el ADN total aplicando FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene) y “Chelex 100”, en el 100% de muestras se obtuvo una buena calidad de ADN. Los geles de agarosa mostraron bandas de ADN, en cada una de las muestras obtenidas por ambos métodos de extracción y purificación de ADN genómico.

En la Figura N° 8, se muestra el ADN genómico obtenido por ambos métodos: líneas del 1 al 3 con FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene) y del 4 al 5 con “Chelex 100”

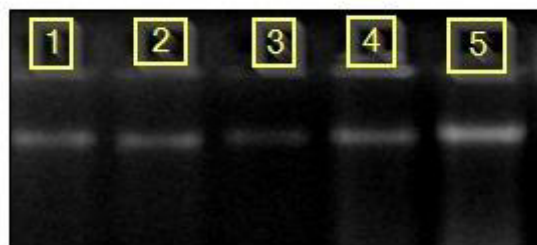


Figura N° 8.- ADN genómico en gel de agarosa

6.3. Estandarización de la prueba de PCR *Hemi-Nested* – PCR)

En la estandarización de la PCR con los cebadores PT8, PT9 y TB290 (ver figura N° 7), como se observa en la figura N° 9, producto de esta PCR *hemiNested* se observa la presencia de una sola banda de aproximadamente 360 pb en las muestras que contenían *M. tuberculosis*.

En heces provenientes de 16 pacientes con tuberculosis, se detectó *M. tuberculosis* en 6 muestras de heces utilizando FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene) y 5 utilizando “Chelex 100”. Con respecto a las muestras utilizadas como control de extracción, los blancos de reactivos de extracción y de PCR no mostraron ningún tipo de contaminación.

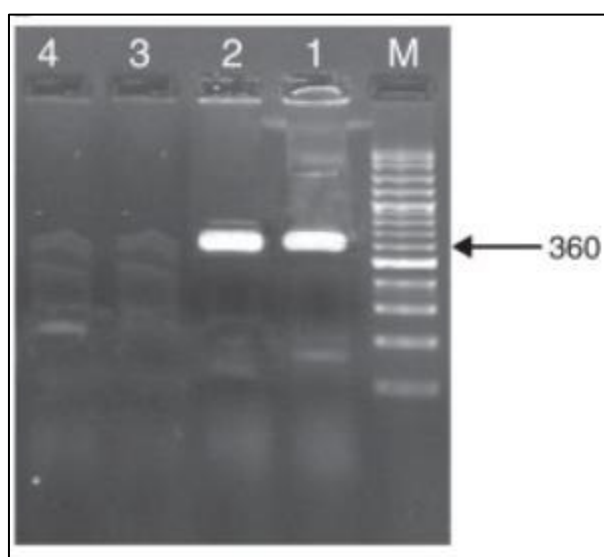


Figura N° 9.- Gel de agarosa mostrando los productos de PCR IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* amplificados.

6.4. Análisis de sensibilidad y especificidad

6.4.1. Extracción de ADN genómico por el método “FastDNA® SPIN Kit for Soil” (Qbiogene)

De un total de 236 muestras obtenidas de pacientes, 16 fueron positivas y 220 negativas por la prueba referencial de cultivo microbiológico. Esta investigación detectó *M. tuberculosis* por PCR en 6 de 16 muestras positivas, por tanto se obtuvo una sensibilidad del 37,5% (Tabla N°5). Para la especificidad de un total de 236 muestras, 220 muestras tenían resultado negativo por la prueba referencial de cultivo microbiológico, frente a estos reportes la especificidad utilizando la prueba de PCR fue del 100%.

Tabla N°5. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR utilizando la extracción de ADN genómico por el método “FastDNA® SPIN Kit *for Soil*” (Qbiogene)

	CULTIVO MICROBIOLÓGICO			
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	
P C R	POSITIVO	6	0	6
	NEGATIVO	10	220	230
TOTAL		16	220	236

6.4.2. Extracción de ADN genómico por método “Chelex 100”

De un total de 236 muestras, 16 fueron positivas y 220 negativas para la prueba referencial de cultivo microbiológico. Con PCR se obtuvieron 5 muestras clínicas positivas para *M. tuberculosis*, encontrándose una sensibilidad del 31.25% (Tabla N°6). Para la especificidad, de un total de 236 muestras, 220 fueron negativas

según la prueba referencial. Frente a estos resultados este trabajo estimó la especificidad de la PCR en un 100%.

Tabla N°6. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR utilizando Extracción de ADN genómico utilizando el método “Chelex 100”

	CULTIVO MICROBIOLÓGICO			
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	
P C R	POSITIVO	5	0	5
	NEGATIVO	11	220	231
	TOTAL	16	220	236

7. DISCUSIÓN

Muchos ensayos se han desarrollado utilizando la amplificación de ADN, para la detección directa de *M. tuberculosis* en una variedad de muestras clínicas obtenidas a partir de adultos. Más recientemente, una amplia gama de alternativas de reconocimiento de ácido nucleico están comercialmente disponibles, incluidos los basados en la PCR, tales como Amplicor (Roche), cadena de la reacción ligasa (LCX, sistemas de Abbott), amplificación mediada por transcripción (TMA; Gen-Probe) y la amplificación de desplazamiento de cadena (BDProbe; Tec-SDA). Las bajas sensibilidades y los altos costos de estas pruebas han impedido hasta ahora su uso en la detección de la tuberculosis pediátrica (8).

En los últimos años, varios estudios con grupos pequeños de niños han examinado la utilidad de la PCR en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar pediátrica. El principal inconveniente de los ensayos de diagnóstico de PCR son las limitaciones en su especificidad, la necesidad de obtener muestras múltiples para optimizar rendimiento, su alto costo y la baja sensibilidad de kits de PCR disponibles comercialmente.

En nuestro país, se han realizado estudios de detección de *M. tuberculosis* en muestras provenientes del aparato respiratorio en adultos y aspirados gástricos en niños por Montenegro y cols, Cordova y cols, Connelly y cols. (27) (8) (41).

En algunas investigaciones se han descrito que el ADN de *M. tuberculosis* puede detectarse mediante PCR en muestras de heces de adultos con tuberculosis pulmonar, pero la sensibilidad de la prueba es variable, dependiendo del método de extracción de ADN utilizado (41).

Por otro lado, la eficacia de las pruebas basadas en la PCR varía considerablemente de acuerdo con el método de PCR utilizado, el gen objetivo, muestra para la extracción de ADN y lo más importante, las habilidades operativas del personal de laboratorio y la estandarización de las técnicas moleculares. Otras consideraciones que influyen en la sensibilidad y especificidad del ensayo son las estrictas precauciones necesarias para evitar la contaminación, el uso de controles adecuados, y repetición de pruebas de muestras clínicas con resultados dudosos. Todos los factores en relación con la prueba en sí pueden ser optimizados, reproducibles y precisos siempre y cuando se trabaje bajo condiciones controladas. Además, la utilidad clínica de PCR como método de diagnóstico depende de los valores predictivos positivos y negativos. Debido a que estos valores varían notablemente con la prevalencia de la tuberculosis, es esencial tener en cuenta la epidemiología regional a la hora de determinar la utilidad de una prueba de diagnóstico por PCR (8).

En el artículo de Amel El Khéchine y cols del 2009 mencionan que dado que el *M. tuberculosis* puede sobrevivir en el fluido gástrico (demostrado por Vandal et al., 2008), al ser tragados podrían ser detectados en las muestras de heces; así Amel El Khéchine y cols colectaron en paralelo muestras del tracto respiratorio y muestras de heces del mismo paciente, obteniendo como resultado una sensibilidad de 37.5% y una especificidad de 100% para la tinción de Ziehl–Neelsen en muestras de heces, sensibilidad de 54.2 %/ especificidad de 100% para el cultivo y una sensibilidad de 100 %/ y especificidad de 97.3% en la prueba de PCR tiempo real (12).

En otros estudios similares reportados por Córdova y cols, en el 2010, utilizaron también PCR para la detección de *M. tuberculosis* en muestras de heces; obteniendo una sensibilidad de 86% y una especificidad de 100 % (41).

Otro estudio de Hiroyuki Kokuto y cols, en el 2015, realizaron una detección de *M. tuberculosis* en muestras fecales de adultos diagnosticados con tuberculosis pulmonar, usando el test de “Xpert Mycobacterium tuberculosis (MTB)/rifampicin” que es un test automatizado usando PCR en tiempo real para la detección del microorganismo y determinación de resistencia a Rifampicina (RIF) obteniendo 85,7% de sensibilidad y 100 % de especificidad (42).

En el presente estudio, se utilizaron los métodos “FastDNA® SPIN Kit for Soil” y “Chelex 100” permitiendo obtener ADN genómico de buena calidad a partir de muestras de heces de 236 niños. En la literatura se describe que se pueden emplear métodos de solventes orgánicos para la extracción de ADN de muestras de heces, si bien, este procedimiento es de bajo costo en comparación a los métodos aplicados en este estudio, el inconveniente del uso de solventes es su efecto hepato-tóxico para el personal del laboratorio cuando no se cuentan con las medidas de bioseguridad, siendo estas no disponibles en muchos laboratorios en nuestro país.

Durante la estandarización de la PCR, la amplificación de la secuencia blanco se incrementó variando la concentración de MgCl₂ de 1.5 a 2.5 mM, lo cual está dentro del rango óptimo de actividad de la *Taq* ADN polimerasa. En la separación del ADN amplificado por electroforesis en geles de agarosa, se observaron los productos de amplificación con bandas de ADN definidas, lo cual evidencia la hibridación específica de los cebadores.

La amplificación del IS6110 de *M. tuberculosis* mediante PCR usando ADN genómico extraído por los métodos “FastDNA® SPIN Kit for Soil” y “Chelex 100” permitió una sensibilidad de 37.5% y 31.25% respectivamente. A la vez, ambos casos presentaron

especificidad de 100 %, siendo los resultados obtenidos en este estudio similares para los dos métodos de extracción de ADN.

En este estudio en comparación con los reportados por los otros autores la sensibilidad es baja, menor a un 40%, comparado con la sensibilidad de una tinción o la sensibilidad que se obtiene de los métodos invasivos; una de las razones puede ser la misma naturaleza de la muestra, la cual contiene DNAsas que pueden haber degradado la cantidad de ADN que hubiera podido estar presente en la muestra a analizarse.

Por otro lado, en los últimos artículos reportados se utilizaron pruebas de PCR mucho más sensibles como la PCR en tiempo real, así como métodos de extracción de ADN combinados con kits de extracción de suelos y extracción de tejidos, lo cual podría impactar en la sensibilidad obtenida (42) (41) (12).

Otras variables como la cantidad de microorganismo presente en la muestra y su distribución no fueron realizadas en este estudio, lo cual hubiera impactado en el análisis de la sensibilidad de la técnica usada.

La recolección de muestras de heces en pacientes pediátricos es sencilla, a diferencia de la obtención de esputo que conlleva al uso de métodos invasivos, costosos e incómodos. Además, este método puede ser utilizado en el estudio de la tuberculosis en muestras clínicas procedentes de regiones alejadas.

Las técnicas moleculares son relativamente costosas en comparación con las convencionales, sin embargo, la disponibilidad de un método alternativo no invasivo, para la detección de *M. tuberculosis* en los niños menores de doce años permitiría la detección y vigilancia oportuna de este agente patógeno, así como determinar la evolución del tratamiento.

Se recomienda en futuros trabajos, investigar más sobre la sensibilidad ya que se puede tener un aparente ADN genómico de buena calidad, pero se debería haber amplificado otro gen en las 16 muestras confirmadas como positivas, a fin de comprobar que el ADN es realmente de buena calidad. Por otro lado, debía haberse tomado en cuenta el número de colonias de *M. tuberculosis* presentes en la muestra de heces y la distribución de este microorganismo en la muestra.

8. CONCLUSIONES

- Se logró detectar *M. tuberculosis* en muestras de heces de niños menores de 12 años usando la técnica de PCR *hemi-nested*.
- Se estandarizaron dos protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de heces que permitieron obtener ADN de buena calidad para su uso en técnicas moleculares.
- La sensibilidad de los PCR en la determinación de *M. tuberculosis* usando ADN genómico en muestras de heces, según el método de extracción FastDNA® SPIN *Kit for Soil* y “Chelex 100” fue de 37.5% y 31.25% respectivamente. Sin embargo, la especificidad de ambos casos fue de 100%.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio con una mayor cantidad de población y de muestras; así como, revisar los factores que contribuirían a alcanzar una mayor sensibilidad en esta prueba, ya que, sería una buena alternativa de diagnóstico rápido para pacientes que clínicamente es difícil un diagnóstico adecuado.
- Se pueden realizar estudios de PCR en otras muestras clínicas para tuberculosis no pulmonar.
- Estas técnicas de extracción y purificación se podrían utilizar en la detección de otros agentes patógenos.
- Se recomienda realizar un estudio similar en pacientes VIH positivos con esputo escaso o en pacientes con muestras paucibacilares.
- Se recomienda realizar un estudio de *Nested* o *Hemi-Nested* PCR para determinar la sensibilidad a drogas como la Rifampicina y/o isoniazida en pacientes con tuberculosis en diferentes muestras biológicas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Switzerland: WHO Press, World Health Organization; 2016. Report N° WHO/HTM/TB/2016.13
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. France: WHO Press, World Health Organization; 2014. Report N° WHO/HTM/TB/2014.08
3. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. France: WHO Press, World Health Organization; 2015. Report N° WHO/HTM/TB/2015.22
4. World Health Organization. Tuberculosis country profiles - Peru. [Online database]. Switzerland: World Health Organization. 2017 [acceso 09 Abril 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/>.
5. World Health Organization. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. 2nd ed. Geneva: WHO Document Production Services; 2014.
6. Connell TG, Zar HJ, Nicol MP. Advances in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in HIV-Infected and HIVUninfected Children. *J Infect Dis*. 2011; 204 Suppl 4: 151-158.
7. Anglada RR. *Microbiología Sanitaria y Clínica*. Madrid: Sintesis; 1997.
8. Montenegro SH, Gilman RH, Sheen P, Cama R, Caviedes L, Hopper T, et al. Improved Detection of Mycobacterium tuberculosis in Peruvian children by Use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Infect Dis*. 2003; 36(1):16-23.
9. Abadco DL, Steiner P. Gastric lavage is better than broncho-alveolar lavage for isolation of Mycobacterium tuberculosis in childhood pulmonary tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J*. 1992; 11(9):735-8.
10. Russell DG. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(8): 569-77.

Khan EA, Starke JR. Diagnosing tuberculosis in children : increased need for better
11. methods. *Emerg Infect Dis*. 1995; 1(4):115-23.
12. El Khéchine A, Henry M, Raoult D, Drancourt M. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis. *Microbiology*. 2009; 155(7): 2384-9
13. Lozano MJA. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *OFFARM*. 2002; 21(8):102-110.

14. Carmona O, Gomez M, Montes T, Marcano C, Marino F. Microbiología Medica, de Divo. Mexico: McGraw- Hill Interamericana; 1997.
15. Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol.* 2003;1(2):97-105.
16. Torres C, Velez H, Rojas W, Borrero J, Restrepo J. Neumología - Tuberculosis y otras micobacterias respiratorias. In: Fundamentos de Medicina. Neumología. 5ta Ed. Colombia: CIB; 1998.
17. Ministerio de Salud. Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Lima: MINSA; 2009.
18. Getchell WS, Davis CE, Gilman J, Urueta G, Ruiz-Huidobro E, Gilman RH.. Basic epidemiology of tuberculosis in Peru: A prevalence study of tuberculin sensitivity in a pueblo joven. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47(6):721-9.
19. Ministerio de Salud. Situacion de la tuberculosis en el Perú. Lima: MINSA; 2014.
20. Ministerio de Salud. Análisis de la Situación Epidemiológica de la Tuberculosis en el Peru, 2015. [Edición electrónica] Lima : MINSA, Ministerio de Salud de Salud, Dirección General de Epidemiología; 2016 [consultado el 09 Abril 2016]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3446.pdf>.
21. Lozano-Moreno D, Aburto-Torres C, Valer-Chavez G. Formas Clinicas de tuberculosis en pediatria: Relacion con vacuna BCG y PPD. *Paediatrica.* 2003; 5(1): 7-13
22. Sanghavi DM, Gilman RH, Lescano-Guevara AG, Checkley W, Cabrera LZ, Cardenas V. Hyperendemic pulmonary tuberculosis in a peruvian shantytown. *Am J Epidemiol.* 1998;148(4):384-9.
23. Ministerio de Salud. Norma Tecnica de Salud para la Atencion integral de las personas afectada por tuberculosis. N°104-MINSA/DGSP-V01. Resolucion Ministerial 715-2013. Lima: MINSA; 2013
24. Perez-Velez CM, Marais BJ. Tuberculosis in children (review article). *N Engl J Med.* 2012; 367(4):348-361
25. Castillo-Vilela A. Valor Diagnóstico de los criterios de Stegen modificado por Toledo en la tuberculosis infantil en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. *Revista Peruana de Pediatría.* 2005; 58(2):30-39.
26. Puerto G, Castro CM, Ribon W. Reacción en cadena de la polimerasa una contribucion para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacterias. *Infectio: Revista de la Asociación colombiana de Infectología.* 2007; 11(2):87-94.

27. Smith KC, Starke JR, Eisenach K, Ong LT, Denby M. Detection of Mycobacterium tuberculosis in Clinical Specimens From Children Using a Polymerase Chain Reaction. *Pediatrics*. 1996; 97(2):155-160.
28. Palma-Nicolás JP, Bocanegra-García V. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos (Revisión). *Arch Bronconeumol*. 2007; 43(4):225-232
29. Berg P, Boyer H, Cohén SN. Tecnología de la Información basadas en el DNA. En: Nelson DL, Cox MM, Cuchillo CM. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5th ed. España: Ediciones Omega Barcelona (Version Español); 2009.
30. Cigudosa JC. Presentacion: Conceptos básicos sobre ADN y ARN- Tecnicas de amplificacion PCR y variantes. Madrid: Sociedad Española de Anatomía Patológica; 2014. Disponible en: https://www.seap.es/c/document_library/get_file?uuid=27b6b558-aed1-4586-8b3d-8754cf2fc83d
31. Laboratorio de Investigacion en Enfermedades Infecciosas - Facultad de Ciencias - Universidad Peruana Cayetano Heredia. Protocolos internos de laboratorio de Biología Molecular. Lima.
32. Coros A, DeConno E, Derbyshire KM. IS6110, a Mycobacterium tuberculosis Complex-Specific Insertion Sequence, is also Present in the Genome of Mycobacterium smegmatis, Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species. *J Bacteriol*. 2008;190(9):3408-3410
33. Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(12):2668-2673.
34. Fontalvo-Rivera D, Gomez-Camargo D. Artículo de Revisión: Genes del Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Medicas UIS - revista de los estudiantes de medicina de la universidad industrial de santander*. 2015; 28(1): 39-51.
35. Scribb. Material informativo sobre la composicion de las heces fecales humanas y su microbiota.. [cited 2017 April 23]. Available from: <https://es.scribd.com/doc/105070426/Heces-fecales>.
36. Ariefdjohan MW, Savaiano DA, Nakatsu CH. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr J*. 2010; 22: 9:23.
37. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991; 10(4):506-13

38. Wolf H, Mendez M, Gilman RH, Sheen P, Soto G, Velarde A, et al. Diagnosis of Pediatric Pulmonary Tuberculosis by Stool PCR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 79(6): 893-898.
39. Caviedes L1, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, Berg DE, Montenegro-James S. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(3):1203-8.
40. Shojaei TR, Mohd Salleh MA, Tabatabaei M, Ekrami A, Motallebi R, Rahmani-Cherati T, et al. Development of sandwich-form biosensor to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical sputum specimens. *Braz J Infect Dis.* 2014;18(6):600-8.
41. Cordova J, Shilov R, Gilman RH, Sheen P, Martin L, Arenas F, et al. Evaluation of Molecular Tools for Detection and Drug Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in stool specimens from patients with pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(5):1820-6.
42. Kokuto H, Sasaki Y, Yoshimatsu S, Mizuno K, Yi L, Mitarai S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in Fecal Specimens From Adults Diagnosed With Pulmonary Tuberculosis Using the Xpert MTB/Rifampicin Test. *Open Forum Infect Dis.* 2015 22;2(2): ofv074
43. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. [Online].; 2013 [1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA]. Available from: <http://www.cdc.gov/tb/esp/publications/faqs/glossary.htm>.
44. Lowry R. www.vassarstats.net/Clinical Calculator 1. [Online].; ©Richard Lowry 2001-2016 [cited 2016 Diciembre 14. Available from: <http://www.vassarstats.net/>.

11. ANEXOS

ANEXO 1: GLOSARIO DE TÉRMINOS RELACIONADOS CON LA TUBERCULOSIS (43)

- **Bacterias resistentes:** bacterias que no pueden ser destruidas con un medicamento específico.
- **Contacto:** persona que ha pasado tiempo con una persona que tiene tuberculosis infecciosa.
- **Cultivo:** prueba para determinar si hay bacterias de la tuberculosis presente en las flemas o en otros líquidos corporales. En la mayoría de los laboratorios, esta prueba puede tardar entre 2 y 4 semanas.
- **Enfermedad de tuberculosis:** enfermedad en la que las bacterias de la tuberculosis se multiplican y atacan diferentes partes del cuerpo. Los síntomas de la enfermedad de tuberculosis incluyen debilidad, pérdida de peso, fiebre, falta de apetito, escalofríos y sudores por la noche. Otros síntomas de la enfermedad de tuberculosis dependen del área del cuerpo donde estén proliferando las bacterias. Si la enfermedad de tuberculosis está en los pulmones (tuberculosis pulmonar), los síntomas pueden incluir tos intensa, dolor en el pecho o tos con sangre. Una persona con enfermedad de tuberculosis puede ser contagiosa y transmitir la tuberculosis a otras personas.
- **Espuito:** flema proveniente del interior de los pulmones que se expulsa al toser. El esputo se examina para detectar la presencia de bacterias de la tuberculosis

mediante un frotis; una parte del esputo también se puede usar para hacer un cultivo.

- **Frotis:** prueba para determinar la presencia de bacterias de la tuberculosis en las flemas. Para realizar esta prueba, el personal del laboratorio unta la flema en un portaobjetos de vidrio, tiñe la muestra con un colorante especial y analiza si hay bacterias de la tuberculosis en el portaobjetos. Por lo general, los resultados de esta prueba tardan un día.
- **Infección de tuberculosis latente:** una afección en la que las bacterias de la tuberculosis están vivas en el cuerpo pero inactivas. Las personas con la infección de tuberculosis latente no tienen ningún síntoma, no se sienten mal, no pueden transmitir la tuberculosis a los demás y, por lo general, tienen una reacción positiva a la prueba cutánea.

Sin embargo, estas personas pueden enfermarse de la tuberculosis si no se tratan la tuberculosis latente.

- **Infección por el VIH:** infección que causa el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus que provoca el sida (o síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Una persona que tiene la infección de tuberculosis latente y la infección por el VIH tiene un riesgo muy elevado de desarrollar la enfermedad de tuberculosis.
- **Isoniacida o INH:** medicina usada para prevenir la enfermedad de tuberculosis en las personas que tienen la infección de tuberculosis latente. Además, la isoniacida es uno de los cuatro medicamentos que suelen usarse para tratar la enfermedad de tuberculosis.

- ***Mycobacterium tuberculosis***: bacterias causantes de la infección de tuberculosis latente y la enfermedad de tuberculosis.
- **Negativo**: por lo general, se refiere al resultado de una prueba. Si usted tiene una reacción negativa a la prueba cutánea de la tuberculina o a la prueba de sangre, es probable que no tenga la infección por tuberculosis.
- **Positivo**: por lo general, se refiere al resultado de una prueba. Si usted tiene una reacción positiva a la prueba cutánea de la tuberculina o a la prueba de sangre, es probable que tenga la infección por tuberculosis.
- **Prueba cutánea de la tuberculina**: prueba que se usa a menudo para detectar si alguien se infectó con las bacterias de tuberculosis. Se inyecta un líquido denominado tuberculina en la piel en la parte inferior del brazo. Si usted tiene una reacción positiva a esta prueba, es probable que tenga la infección de tuberculosis. Podrá ser necesario hacer otras pruebas para saber si tiene la infección de tuberculosis latente o la enfermedad de tuberculosis.
- **Prueba de sangre de la tuberculosis**: una prueba de sangre para detectar la infección por las bacterias de la tuberculosis. Esta prueba mide la respuesta a las proteínas de la tuberculosis cuando se mezclan con una pequeña cantidad de sangre. Un ejemplo de estas pruebas son la prueba del QuantiFERON®-TB Gold In-Tube test (QFT-GIT); y la prueba T-Spot®.TB.
- **Radiografía de tórax**: fotografía del interior del tórax. La radiografía de tórax es una fotografía del pecho tomada con rayos X. Un médico puede analizar esta placa para determinar si las bacterias de la tuberculosis han afectado los pulmones.
- **Rifampina o rifampicina (RIF)**: uno de los cuatro medicamentos que suelen usarse para tratar la enfermedad de tuberculosis.

- **Rifapentina (RPT):** uno de dos medicamentos usados para tratar la infección de tuberculosis latente.
- **Terapia por observación directa (DOT, por sus siglas en inglés):** una forma de ayudar a los pacientes a tomar sus medicamentos para la tuberculosis. Si usted recibe terapia por observación directa, se reunirá con un miembro del personal de salud todos los días o varias veces por semana en un lugar acordado por ambos. Puede ser la clínica especializada en tuberculosis, su hogar, trabajo o cualquier otro lugar que le resulte conveniente. Tomará sus medicamentos bajo la supervisión de un miembro del personal de salud.
- **Tuberculosis extremadamente resistente (XDR, por sus siglas en inglés):** una forma poco común de tuberculosis resistente a casi todos los medicamentos utilizados para tratar la tuberculosis.
- **Tuberculosis extrapulmonar:** enfermedad de tuberculosis que afecta cualquier parte del cuerpo que no sean los pulmones (por ej., los riñones, la columna vertebral, el cerebro o los ganglios linfáticos).
- **Tuberculosis multirresistente (TB MDR, por sus siglas en inglés):** una forma de la enfermedad de tuberculosis causada por bacterias resistentes a dos o más de los principales medicamentos, la isoniacida y la rifampina.
- **Tuberculosis pulmonar:** enfermedad de tuberculosis que afecta los pulmones y que por lo general provoca una tos que dura 3 semanas o más. En la mayoría de los casos, la enfermedad de tuberculosis es pulmonar.
- **Tuberculina (PPD, por sus siglas en inglés):** líquido que se inyecta en la piel en la parte inferior del brazo durante la prueba cutánea de la tuberculosis. Si usted

tiene la infección de tuberculosis latente, es probable que tenga una reacción positiva a la tuberculina.

- **Vacuna BCG:** vacuna contra la tuberculosis que lleva el nombre de los científicos franceses que la desarrollaron, Calmette y Guérin. La vacuna BCG no es de uso común en los Estados Unidos, pero a menudo se aplica a los bebés y niños pequeños en otros países donde la tuberculosis es común.

ANEXO 2: DATOS ESTADISTICOS (44)

Método “Chelex 100”

Datos estadísticos calculados usando el online clinical calculator, que se puede localizar en: <http://www.vassarstats.net/clin1.html>

Values entered:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	5	5
Test Negative	220	11	231
Totals	220	16	236

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.067797	0.040521	0.109803
Sensitivity	0.3125	0.121287	0.585165
Specificity	1	0.978608	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.021186	0.007826	0.051504
Negative	0.978814	0.948496	0.992174
For any particular positive test result, the probability that it is:			

True Positive	1	0.462945	1
False Positive	0	0	0.537055
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	0.952381	0.914076	0.974769
False Negative	0.047619	0.025231	0.085924
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0.6875	0.494087	0.956626
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0.05	0.028075	0.089046

VassarStats Printable Report:

From an Observed Sample: Estimates of Population Prevalence, Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and likelihood Ratios

Wed Dec 14 2016 21:42:01 GMT-0500 (Hora est. Pacífico, Sudamérica)

Método “FastDNA® SPIN Kit for Soil” (Qbiogene)

Datos estadísticos calculados usando el online clinical calculator, que se puede localizar en: <http://www.vassarstats.net/clin1.html>

Values entered:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	6	6
Test Negative	220	10	230
Totals	220	16	236

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.067797	0.040521	0.109803
Sensitivity	0.375	0.162837	0.641264
Specificity	1	0.978608	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.025424	0.010376	0.057161
Negative	0.974576	0.942839	0.989624
For any particular positive test result, the probability that it is:			

True Positive	1	0.516818	1
False Positive	0	0	0.483182
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	0.956522	0.919109	0.977755
False Negative	0.043478	0.022245	0.080891
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0.625	0.427608	0.913512
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0.045455	0.024783	0.083368

Technical Note on Calculation of Confidence Intervals

95% confidence intervals for proportions (which include all but the last four of the above) are calculated according to the efficient-score method (corrected for continuity) described by Robert Newcombe, based on the procedure outlined by E. B. Wilson in 1927. As Newcombe notes in his 1998 paper, the familiar Gaussian approximation.

$$p \pm 1.96 \times \sqrt{p(1-p)/n}$$

References:

Newcombe, Robert G. "Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods," *Statistics in Medicine*, **17**, 857-872 (1998).

Wilson, E. B. "Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference," *Journal of the American Statistical Association*, **22**, 209-212 (1927).

VassarStats Printable Report:

From an Observed Sample: Estimates of Population Prevalence, Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and likelihood Ratios

Wed Dec 14 2016 21:40:14 GMT-0500 (Hora est. Pacífico, Sudamérica).

ANEXO 3: Perfil de tuberculosis en el Perú- country Profile en la web site del

OMS www.who.int/tb/data (4)

