



EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE
ADN PARA PCR A PARTIR DE LÁMINAS DE
BACILOSCOPIA EN EL DIAGNÓSTICO DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS-LIMA, 2021

EVALUATION OF A DNA EXTRACTION METHOD FOR
PCR FROM SMEAR MICROSCOPY SLIDES IN THE
DIAGNOSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*-
LIMA, 2021

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTORES

ROSMERY ZOILA MARIA BERNABE ROJAS
MERCEDES YANET CALIXTO CASTILLEJO

ASESOR

JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

LIMA - PERÚ
2024

JURADO

Presidente: Dra. Maritza Calderon Sanchez

Vocal: MSc. Lidio Edgar Neyra Valdez

Secretario: MSc. Diego Bernhard Cuicapuza Arteaga

Fecha de Sustentación: 30 de abril del 2024

Calificación: Aprobado

ASESOR DE TESIS

ASESOR

MSc. Juan Carlos Agapito Panta

Jefe de carrera de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Departamento Académico de Tecnología Médica - Facultad de Medicina

Universidad Peruana Cayetano Heredia

ORCID: 0000-0001-9134-7322

DEDICATORIA

Dedicado a nuestro padre celestial que nos acompaña y levanta para seguir adelante, y a nuestras familias que nos brindaron un apoyo continuo acompañándonos en el desarrollo de nuestra carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos:

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por la oportunidad de desarrollar los estudios en Tecnología Médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

A MSc. Juan Carlos Agapito Panta, por su apoyo, asesoramiento en todo el proceso del proyecto y nuestro desarrollo y culminación de la carrera con éxito.

Al Laboratorio de Mycobacterias del Centro de Excelencia (CENEX) del Hospital Cayetano Heredia.

A MASKAF DIAGNOSTICS, por su patrocinio en la investigación con la donación de pruebas moleculares de diagnóstico.

A INBIOMEDIC, por su contribución con la investigación con el entrenamiento, acompañamiento y dirección en el uso de dispositivos e implementos del centro diagnóstico.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

El presente trabajo titulado como: “Evaluación de un método de extracción de ADN para PCR a partir de láminas de baciloscopia en el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*-Lima, 2021.”, se ha desarrollado de acuerdo a la normativa presentada sobre la estructura de trabajos de investigación; el contenido, las opiniones, procesamiento, el análisis de datos y conclusiones están en responsabilidad exclusiva de los autores, e integra una elaboración realizada únicamente con la dirección del asesor de tesis, avalando la originalidad del mismo y declarando que no ha sido publicado con anterioridad para obtener grados o títulos. Se autoriza su utilización del trabajo con fines educativos o informativos por el Departamento de Escuela de Tecnología Médica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA PCR A PARTIR DE LÁMINAS DE BACILOGRAFÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS-LIMA, 2021

ORIGINALITY REPORT

15% SIMILARITY INDEX	15% INTERNET SOURCES	3% PUBLICATIONS	3% STUDENT PAPERS
--------------------------------	--------------------------------	---------------------------	-----------------------------

PRIMARY SOURCES

1	duict.upch.edu.pe Internet Source	2%
2	repositorio.unfv.edu.pe Internet Source	1%
3	hdl.handle.net Internet Source	1%
4	ri.ues.edu.sv Internet Source	1%
5	www.congreso.gob.pe Internet Source	1%
6	repositorio.urp.edu.pe Internet Source	1%
7	repositorio.upch.edu.pe Internet Source	<1%
8	repositorio.uwiener.edu.pe Internet Source	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. MATERIAL Y MÉTODOS	5
III.1. Diseño del estudio	5
III.2. Población y lugar de estudio	5
III.3. Tamaño muestral	5
III.4. Definición operacional de variables	6
III.5. Procedimientos y técnicas	6
III.6. Aspectos éticos	11
III.7. Plan de análisis	11
IV. RESULTADOS	12
V. DISCUSIÓN	13
VI. CONCLUSIONES	17
VII. LIMITACIONES	18
VIII. RECOMENDACIÓN	20
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
X. TABLAS Y GRÁFICOS	29
ANEXOS	32

RESUMEN

Antecedentes: La tuberculosis pulmonar continúa siendo una de las enfermedades con alta morbi-mortalidad en nuestro país, por lo cual se requiere el uso de metodologías factibles y de menor tiempo, con este fin surge una diversidad de pruebas, siendo las pruebas moleculares de mayor utilidad debido a su alta sensibilidad y especificidad. Diferentes estudios coinciden en que el método de extracción de ADN incide en la eficiencia de la amplificación que se obtendrá como resultado, por ello, se ha evaluado en el presente estudio una técnica de extracción que permita obtener con facilidad el ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a partir de láminas de baciloscopia.

Objetivo: Evaluar el rendimiento de un método de extracción de ADN *in house* para qPCR a partir de láminas de baciloscopia en el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en Lima, 2021. **Material y métodos:** Estudio observacional-descriptivo de tipo transversal. Se recolectaron un total de 67 láminas de BK, correspondientes a los años 2019, 2020 y 2021, provenientes del Laboratorio de Mycobacterias del Centro de excelencia (CENEX) en el Hospital Cayetano Heredia; independientemente al estado de carga bacilar, el ADN aislado se utilizó para la identificación de *M. tuberculosis* mediante qPCR. **Resultados:** La eficacia del método, se demostró mediante la amplificación total de las 67 extracciones, de las cuales el 86.6% resultaron positivas para *M. tuberculosis* mediante qPCR. **Conclusión:** El método de extracción de ADN evaluado a partir de láminas de baciloscopia permitió obtener concentraciones óptimas de ADN para la detección de *M. tuberculosis* mediante qPCR.

Palabras clave: Tuberculosis, Diagnóstico, Portaobjetos microscópicos teñidos,
qPCR

ABSTRACT

Background: Pulmonary tuberculosis continues to be one of the diseases with high morbidity and mortality in our country, which requires the use of feasible methodologies and less time, with this purpose a variety of tests arises, being the molecular tests of greater utility due to its high sensitivity and specificity. Different studies agree that the DNA extraction method affects the efficiency of the amplification that will be obtained as a result, therefore, different techniques have been evaluated that allow the genetic material of *Mycobacterium tuberculosis* to be easily obtained. **Objective:** Evaluate the performance of an in-house DNA extraction method for qPCR from smear slides in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Lima, 2021. **Material and methods:** Cross-sectional observational-descriptive study. A total of 67 sheets of BK were collected, corresponding to the years 2019, 2020, 2021 from the Mycobacteria Laboratory of the Center of Excellence (CENEX); independently of the bacillary load state, the isolated DNA was used for the identification of *M. tuberculosis* by qPCR. **Results:** The effectiveness of the method was demonstrated by the total amplification of the 67 extractions, of which 86.6% were positive for *M. tuberculosis* by qPCR. **Conclusion:** The DNA extraction method evaluated from sputum smears allowed optimal DNA concentrations to be obtained for the detection of *M. tuberculosis* by qPCR. **Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Diagnosis, Microscopic stained slides, qPCR.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis pulmonar (TB), es una enfermedad multifactorial causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), considerada un problema de salud pública a nivel global debido a su elevada incidencia y morbi-mortalidad. Según un informe publicado por la Organización Mundial de Salud (OMS), durante el año 2021 se estimaron 10,6 millones de casos de TB en el mundo; asimismo, 1,6 millones de personas murieron por causa de esta enfermedad el mismo año (1).

A causa de la pandemia por COVID-19, muchas enfermedades incluyendo la tuberculosis fueron desatendidas, lo cual redujo significativamente las notificaciones de casos de TB en el mundo (2). Perú no fue la excepción, y entre los años 2020-2021 tuvo una tasa de incidencia de 50 a 55 casos por 100 mil habitantes, respectivamente (3,4).

Debido a las altas cifras reportadas, la lucha contra TB ha sido declarada de interés nacional, según la Ley 30287, Ley de Control y Prevención de la Tuberculosis en el Perú y su Reglamento, y la Resolución Ministerial N°247-2018/MINSA que aprueba el “Plan de Intervención de Prevención y Control de Tuberculosis en Lima Metropolitana y Regiones priorizadas de Callao, Ica, La Libertad y Loreto, 2018-2020” (5, 6,7).

Actualmente, la baciloscopia sigue siendo uno de los métodos convencionales utilizados para el diagnóstico inicial de TB, según los criterios de positividad establecidos por la OMS, la cual consiste en la detección de bacilos acidorresistentes (BAAR) mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Pese a su factibilidad, bajo coste y rápida detección, su baja sensibilidad solo permite detectar

de 5000-10000 bacilos/ml (8). Por tal motivo, debe ser acompañada de un conjunto de criterios para confirmar el diagnóstico de TB pulmonar (9).

El cultivo microbiológico es usado como método de referencia para la confirmación de TB; no obstante, de acuerdo a las limitaciones mencionados por la OMS, el diagnóstico temprano continúa implicando una gran desventaja para la detección de nuevos casos de tuberculosis, ya que, el cultivo requiere un tiempo entre 2 a 6 semanas en comparación a las pruebas moleculares y la prueba de baciloscopia que pueden reportarse en 1 día. Por otro lado, la sensibilidad de los cultivos está relacionada con la carga bacteriana de la muestra y el tiempo de evolución de la enfermedad (8); razón por la cual aún se continúa con la búsqueda e implementación de nuevos sistemas de detección con plazos de tiempo más cortos y con una alta sensibilidad y especificidad que permita direccionar los nuevos casos de TB hacia un tratamiento oportuno.

En los últimos años, la implementación de pruebas moleculares, como la qPCR han adquirido mayor importancia en el diagnóstico de MTB y su farmacorresistencia con la finalidad de reemplazar o complementar las pruebas convencionales. Estas pruebas se basan en la amplificación y detección de secuencias específicas de ADN, lo que permite identificar diversos patógenos de manera precisa. (8,10).

En nuestro país, muchos estudios han implementado las pruebas moleculares como parte del sistema de diagnóstico a partir de muestras de esputo. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes asociados a la conservación y transporte de las muestras dirigidas a laboratorios de referencia (11). Por ello, el uso de portaobjetos de frotices teñidos podría representar un sistema confiable para su transporte, ya que, la falta de acceso a los servicios de salud es una situación problemática

persistente que involucra a la mayor parte de la población de menos recursos afectada por tuberculosis (11,12). Este sistema reforzaría la captación de casos no diagnosticados que no alcanzan tratamiento; asimismo, estas muestras fijadas son capaces de ser reusadas en un futuro para evaluar resistencia y como fuente de información clínica en casos de reinfección por tuberculosis.

Con esta finalidad, diferentes estudios se han dirigido a la búsqueda de métodos de detección molecular a partir de frotices de esputo teñidas mediante Ziehl Neelsen (11,16,17). Para la elección de un método de extracción es importante tener en cuenta factores como el costo, tiempo, cantidad y tipo de muestra para aislar la mayor concentración de ADN. Asimismo, el método de CTAB-Cloroformo descrito por Van Soolingen y col. ha sido usado en diversos estudios para el aislamiento de micobacterias, cuyos resultados de pureza del ADN han sido muy óptimos para la amplificación en PCR (12-14,). El CTAB es un detergente que permite la ruptura de la pared celular del bacilo, eliminando los inhibidores que afectan la PCR (13).

Ante los altos costos asociados a las pruebas moleculares, un método de extracción *in house* se presenta como una alternativa que no solo reduce los costos en comparación con un kit comercial, sino que también mejora la viabilidad de estas pruebas en laboratorios con recursos limitados. El desarrollo y mejoría de estas pruebas pueden contribuir con la disminución de falsos positivos, tiempo de diagnóstico y la aplicación de tratamientos innecesarios que contribuye a la incidencia de casos de resistencia antimicrobiana. Por ello, los resultados obtenidos pueden ser usados como base para otras investigaciones, ya sea relacionado con la

resistencia a fármacos y/o epidemiología molecular en el país, o contribuyendo con el avance de diagnóstico, sensibilidad y erradicación de TB.

Por consiguiente, el presente estudio está orientado a evaluar un método de extracción de ADN a partir de frotices de esputo teñidos con Ziehl-Neelsen, para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la prueba qPCR.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el rendimiento de un método de extracción de ADN *in house* para qPCR a partir de láminas de baciloscopia en el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en Lima, 2021.

2.2. Objetivos secundarios

- Establecer la concordancia entre el método de extracción CTAB-Cloroformo a través del resultado del qPCR para el diagnóstico de *M. tuberculosis* y el método convencional.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del método de extracción CTAB-Cloroformo a través del qPCR para el diagnóstico de *M. tuberculosis*.
- Determinar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método de extracción CTAB-Cloroformo a través del qPCR para el diagnóstico de *M. tuberculosis*.
- Indicar la correlación entre las concentraciones de ADN obtenidas por el método de extracción y el tiempo de almacenamiento de las baciloscopias.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Diseño del estudio

Estudio observacional-descriptivo de tipo transversal.

III.2. Población y lugar de estudio

La población de estudio está constituida por las muestras de esputo fijadas en láminas de baciloscopia, que corresponden a pacientes con sospecha de TB, que fueron procesadas por el Laboratorio de Mycobacterias del Centro de Excelencia (CENEX) del Hospital Nacional Cayetano Heredia entre los años 2019, 2020 y primer semestre del año 2021.

Criterios de inclusión

- Muestras de esputo fijadas y teñidas mediante el método de Ziehl Neelsen (Baciloscopia), con resultados positivo y negativo para *Mycobacterium tuberculosis*.
- Las muestras de baciloscopia deben tener su respectivo resultado del cultivo microbiológico.

Criterios de exclusión

- Las láminas de baciloscopia que se encuentren dañadas y/o deterioradas.

III.3. Tamaño muestral

En primer lugar, se realizó un ensayo piloto con 10 muestras para evaluar el método de extracción CTAB-Cloroformo, los cuales se amplificaron mediante el método qPCR para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Para este estudio, se recolectaron 67 láminas de baciloscopia que cumplen con los criterios de selección establecidos. El muestreo se llevó a cabo a través de un enfoque no probabilístico por conveniencia debido a limitaciones logísticas en cuanto a disponibilidad de las muestras por el acceso restringido.

III.4. Definición operacional de variables

La definición de las variables usadas en el presente estudio se encuentra descritas en Anexo 1.

III.5. Procedimientos y técnicas

Recolección de datos

Se realizó una ficha de datos con los resultados de baciloscopia y cultivo para cada lámina (Ver Anexo 2).

Para establecer la confidencialidad y privacidad de los datos y/o resultados a emplear en el estudio fueron anonimizados y codificados previamente a su proceso.

Procedimiento de cultivo microbiológico

Los resultados del cultivo microbiológico, se recolectaron del Laboratorio de Mycobacterias del Centro de Excelencia (CENEX) del Hospital Cayetano Heredia, cuyo protocolo se basa en el uso del medio Löwenstein-Jensen. Previamente, se realiza la descontaminación de las muestras de esputo con Hidróxido de sodio (NAOH) al 4%, posteriormente se procede a realizar 2 siembras en el medio preparado por cada muestra sin ajustar la tapa y se deja incubar con una posición

inclinada en la estufa a 37°C por 48 horas hasta lograr la evaporación de la parte líquida del medio.

La lectura se realiza una vez por semana para evaluar el crecimiento de colonias, en caso de contaminación se solicita una nueva muestra; para reportar el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* se deben observar colonias de un color crema, secas, rugosas de aspecto de coliflor, en el caso de observar una colonia de forma atípica se realiza un examen directo mediante la coloración Ziehl-Neelsen. El reporte se realiza mediante el recuento de colonias: (-) No se observan colonias, Número total de colonias si hay menos de 20, (+) 20 a 100 colonias, (++) Colonias separadas >100, (+++) Colonias confluentes, es decir, se observa desarrollo en toda la superficie del medio. Si no se observa crecimiento, se espera un plazo máximo de 2 meses para reportar un resultado negativo (28).

Procedimiento de la técnica de extracción de ADN

La extracción de ADN de *M. tuberculosis* a partir del esputo fijado en portaobjetos de frotis se realizó de acuerdo al método descrito por López A et al., Van Soolingen D et al. (12, 13) con modificaciones de acuerdo a lo establecido por la prueba piloto realizada por los investigadores. Inicialmente, se rasparon los frotices en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregó Solución Buffer Salino. Posteriormente:

Se realizó el pre calentamiento a 90°C por 10 minutos, luego, se agregó 20 µL (10 mg/ml) de Lisozima a las muestras, agitar con vórtex por unos segundos e incubar a 37°C en baño maría (toda la noche). Posteriormente, se añadieron 70 µL de SDS 10%, 5 µL de Proteinasa K (20 mg/ml) por cada muestra, previamente mezclar con ayuda de un vórtex, y se llevó a cabo la incubación a 65°C por 10 minutos.

Se agregó 80 μL de CTAB/NaCl (previamente calentado a 65°C) a cada muestra, y se mezcla usando un vórtex hasta que el líquido sea lechoso para la precipitación del ADN, llevando a incubación por 10 min a 65°C .

Luego, se agregó 750 μL de 24:1 cloroformo/alcohol isoamílico a la solución anterior para llevar a cabo la precipitación del ADN. Se centrifugó a 15000 RPM por 5 minutos, previamente homogeneizadas, hasta lograr un sobrenadante claro.

En un nuevo tubo eppendorf se transfiere el sobrenadante y se adiciona 450 μL de 2-propanol, mezclando por inversión y dejando reposar por 30 minutos a una temperatura de -20°C . Observar un punto blanco en el fondo del tubo. Repetir la centrifugación a 15000 RPM por 15 minutos y eliminar el sobrenadante. Para culminar el lavado, se agregó 500 μL de Alcohol 70°C previamente refrigerado a 4°C . Repetir la centrifugación a 15000 RPM por 5 minutos y eliminar el sobrenadante. Luego se dejó secar el ADN por un tiempo de 1 hora a temperatura ambiente para su purificación.

Finalmente, se resuspendió el ADN con 50 μL de Buffer TE 1X estéril y se almacenó una alícuota de 20 μL a una temperatura de -20°C para el análisis mediante qPCR.

Cuantificación de ADN

Se realizó la evaluación de la concentración de ADN mediante espectrofotometría, con el uso del equipo NanoDrop 1000 Thermo scientific. Se colocó sobre la platina 2 μL de blanco (TE 1X), posteriormente, se codifica en el sistema y se coloca 2 μL del extracto a evaluar en el cromatograma con un solo pico uniforme, entre lecturas

se limpia con 1ul de (TE 1X). para evitar algún tipo de interferencia con la reacción de qPCR; considerando una $A_{260} / A_{280} \geq 1.8$ como óptima.

Procedimiento de qPCR

Para realizar la prueba de qPCR se empleó el kit Logix Smart MTB Micobacteria tuberculosis (MTB) de la marca Co-Diagnostics, el cual permite detectar la presencia o ausencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir del ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído de muestras del tracto respiratorio; a través de la detección de los genes IS6110 y MPB64. El kit empleado contiene los siguientes reactivos: Mezcla Maestra Logix Smart MTB la cual está patentada de co-primers y reactivos de PCR, un control positivo interno RNAsaP y un control negativo que consiste en Agua libre de DNasa/RNasa.

Para la amplificación del ADN se usó el equipo QuantStudio 3 and 5 Real time PCR Systems. En la programación del termociclador, se registró el marcador primario IS6110 en el canal FAM, el segundo marcador MPB64 en el canal VIC y el control positivo interno para RNasa P en el canal ROX, dentro de 45 ciclos.

La prueba presenta una sensibilidad diagnóstica del 98% y 100% para IS6110 y MPB64, respectivamente y especificidad del 99% y 99.6% para IS6110 y MPB64 respectivamente.

Previamente a la amplificación, se realizaron diluciones a las muestras que tenían mayor concentración de ADN, probando con 5, 10 y 20 ng/μL. La concentración que funcionó mejor fue con 20 ng/μL.

El procedimiento se realizó según el inserto del kit Logix Smart MTB (32):

1. Se descongela la mezcla de Logix Smart MTB (MTB-MM-007), y controles durante 30 minutos aproximadamente.
2. Agitar con un vórtex y centrifugar la mezcla Logix Smart MTB por 3 segundos.
3. Manteniendo la cadena de frío, se coloca la mezcla maestra Logix Smart MTB en hielo.
4. Se adiciona una alícuota de 5 μ L de la mezcla en los tubos de PCR que se van a usar y 5 μ L de agua libre de nucleasas a los pocillos seleccionados.
5. Se procede a descongelar el ADN extraído/purificado, mezclar y centrifugar por unos segundos.
6. Agregar 5 μ L de muestra de ADN purificada a cada pozo usando una nueva punta entre cada muestra.
7. Para el pocillo del control positivo, se añadió al final para evitar contaminación.
8. Se colocan las tapas en los tubos y colocar los tubos en el termociclador.
9. Previamente a la ejecución se programa el termociclador en las siguientes condiciones para un volumen de reacción total de 10 μ L (**Ver Tabla 1**)
10. Para validar los resultados, se procede a verificar que los controles pasaron; si los controles pasan, entonces se interpreta los resultados de la muestra.
11. Con un rango del Ct de 21.00-29.99 para IS6110 y 21.50-25.20 para MPB64. (**Ver Tabla 2**)

III.6. Aspectos éticos

El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, exonerando el uso del consentimiento informado, debido a que solo se trabajaron con láminas de baciloscopia archivadas. Los datos que se recolectaron de las fichas de registro de resultado fueron obtenidas gracias a la autorización de la jefa del Laboratorio de Mycobacterias del Centro de Excelencia (CENEX) del Hospital Cayetano Heredia (Ver Anexo 3).

III.7. Plan de análisis

Para evaluar el rendimiento del método de extracción CTAB-Cloroformo, el análisis se realizó de la siguiente manera:

Para este estudio, la baciloscopia y el cultivo son considerados como un solo método debido a que ambos se utilizan de forma convencional para diagnosticar MTB en el CENEX.

Se compararon los resultados del método de extracción a través del qPCR con los resultados de la prueba convencional. La correspondencia de ambas metodologías se realizó mediante el análisis de concordancia Kappa de Cohen. El índice Kappa, se interpretó de la siguiente manera: 0.0-0.20; ínfima concordancia; 0.21-0.40, escasa concordancia; 0.41-0.60, correlación moderada; 0.61-0.80, buena concordancia; 0.81-1.0, muy buena concordancia (23).

Para determinar la correlación entre las concentraciones de ADN y el tiempo de almacenamiento de las baciloscopias se utilizó la prueba de Spearman. Se utilizó el paquete estadístico Stata 15.0 para todos los análisis estadísticos.

IV. RESULTADOS

En el estudio, se observó que el 58 (86.6%) de las baciloscopias fueron positivas, con cargas bacilares variables. Dentro de este grupo, las muestras con carga bacilar de 1+ representaron el 43.3%, siendo el resultado de baciloscopia más frecuente. Le siguieron las muestras con cargas de 2+ y 3+, que representaron el 16.4 % y 26.9%, respectivamente. Además, se reportaron 9 (13.4%) resultados negativos. Por otro lado, en los reportes de diagnóstico por cultivo microbiológico de las muestras analizadas, se observó que 50 (74.6%) de ellas fueron positivas, mientras que 17 (25.4%) fueron negativas. En relación con la concentración del ADN extraído por CTAB-Cloroformo, se presentó una mediana de 31.3 (IQR: 16.3-65.5). Por otro lado, del total de muestras extraídas, se obtuvo 31 (46.3%) muestras de una buena calidad. Además, mediante la qPCR se demostró que 58 (86.6%) muestras resultaron positivas para *Mycobacterium tuberculosis* y 9 (13.4%) fueron negativas (Tabla 3).

La correspondencia del método de extracción CTAB-cloroformo y evaluadas mediante la técnica molecular de qPCR mostró una muy buena concordancia categórica de 0.93 ($p < 0,001$).

En cuanto a los indicadores de rendimiento del método de extracción, se encontró una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 98.3%, 100%, 100% y del 88.8%, respectivamente (Tabla 4 y 5).

Finalmente, en la población con sospecha de MTB, se identificó una débil correlación monótonica entre las concentraciones obtenidas de ADN y el

tiempo de almacenamiento de las baciloscopias, con un coeficiente de correlación de Spearman de 0.2, con un valor de $p=0.054$. ($p>0.05$)

V. DISCUSIÓN

La tuberculosis pulmonar (TB) continúa siendo una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial, considerada la principal causa de muerte por una infección, según la OMS. Por ello, diversos investigadores han trabajado en la implementación de nuevas técnicas de diagnóstico que mejoren la sensibilidad y especificidad, buscando garantizar resultados precisos en un tiempo oportuno (8,10).

En el presente estudio, se evaluó el rendimiento del método de extracción CTAB-Cloroformo, a partir de muestras fijadas en láminas de baciloscopia que fueron analizadas mediante qPCR para el diagnóstico de TB, con el objetivo de brindar una metodología alternativa para el diagnóstico preliminar de TB. El uso de muestras fijadas en láminas facilitó su conservación y transporte hacia el laboratorio donde se analizaron, lo que pone de manifiesto una ventaja para las muestras que necesitan ser evaluadas y se encuentran en zonas remotas de nuestro país.

Por ello, la elección de un método de extracción es primordial para obtener una adecuada amplificación; entre los más usados son el método Chelex100, Fenol Cloroformo (14). A pesar que, el método Chelex 100 es considerado un método rápido y económico para la extracción de ADN, puede presentar contaminantes residuales que afectan la eficiencia de la reacción de PCR (33).

A partir de una prueba piloto, se realizó la evaluación del método de extracción CTAB-Cloroformo, cuya amplificación mediante qPCR fue óptima para el presente

estudio. Pese a sus limitaciones, como el tiempo prolongado de extracción, se logró una óptima purificación de ADN; su capacidad de reducir la contaminación del ADN extraído con proteínas y polisacáridos, permite mejorar la calidad del ADN y evitar interferencias en la amplificación mediante PCR (30).

La concentración de ADN extraído de láminas de baciloscopia puede verse afectada por una variedad de factores. Entre ellos se encuentran la presencia de ADN bacteriano proveniente de la flora bucal u otros microorganismos; además de aspectos vinculados a la adecuada recolección de la muestra, y la técnica empleada para la extensión de los frotices y reactivos empleados en la tinción de la baciloscopia.

La secuencia IS6110 ha sido utilizada por mucho tiempo para la identificación de MTB; sin embargo, se ha demostrado en algunos estudios no estar siempre presente, ya que el estudio de un solo gen podría orientar a un resultado falso negativo (28). Por ende, el presente estudio usó un marcador complementario MPB64 para aumentar la sensibilidad de la prueba, mediante el Kit comercial Logix Smart *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) donado por la empresa MASKAF DIAGNOSTICS.

La sensibilidad de ambos marcadores pudo ser identificada en el presente estudio; sin embargo, de las 58 muestras amplificadas y reportadas como positivos para *M. tuberculosis*, 3 de los cuales amplificaron solo para MPB64 y 9 no mostraron amplificación para este marcador. Sin embargo, es importante destacar que, si amplificaron para el marcador IS6110, lo cual subraya la relevancia de emplear múltiples marcadores moleculares para potenciar la especificidad del método diagnóstico. Este hallazgo enfatiza la necesidad de diversificar los marcadores

utilizados para garantizar una detección más precisa de *M. tuberculosis* y reducir la posibilidad de falsos negativos.

La técnica qPCR permitió la amplificación del 86.6% de las muestras recolectadas en comparación a la metodología convencional (baciloscopia y cultivo), el cual representa un 88%; ambas técnicas favorecen la identificación de casos de MTB. Para determinar la concordancia entre el método evaluado a través del resultado del qPCR y el método convencional, se evaluó el índice de Kappa mostrando una muy buena concordancia categórica de 0.93 ($p < 0,01$). El valor obtenido alcanzó una fuerza de asociación aceptable, mayor al resultado obtenido por Guernier y col, cuyo estudio evaluó la concordancia entre la prueba de baciloscopia y qPCR obteniendo un índice de Kappa de 0.443 ($p < 0,01$) (17). Asimismo, Carniel y col, evaluaron la concordancia entre el cultivo y PCR obteniendo un índice de Kappa de 0.68 ($p < 0,01$) (11).

Dentro de los indicadores de rendimiento del método CTAB-Cloroformo, se calculó la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo obteniendo un 98.3%, 100%, 100% y del 88.8%, respectivamente; mostrando una mayor especificidad respecto a los obtenidos por Rivera F., mediante PCR convencional (16).

No obstante, dentro de los hallazgos se identificaron 8 resultados positivos para baciloscopia, y reportados como negativo en el cultivo microbiológico. Este tipo de resultados, principalmente, se pueden encontrar en casos de que el paciente se encuentre cursando un tratamiento con antibióticos, reduciendo la viabilidad de las

bacterias y minimizar la cantidad de colonias o su ausencia en el medio de cultivo; entre otros factores, como una mala recolección de la muestra (31).

Asimismo, entre los registros de baciloscopia, una de las muestras recolectadas fue reportado como negativo y su cultivo con 2 colonias; obteniéndose un resultado negativo para qPCR, este resultado discordante puede atribuirse a factores asociados a la clínica del paciente o estado de la enfermedad. Además, de no tener información si se realizaron pruebas adicionales para su confirmación.

A pesar de estas observaciones entre ambas metodologías, el método evaluado permitió detectar *Mycobacterium tuberculosis* en los casos positivos de baciloscopias, que no fueron detectados mediante el cultivo.

Según los procedimientos de calidad externos del Instituto Nacional de Salud, se considera que el tiempo adecuado para la conservación de láminas de baciloscopia teñidas y almacenadas en un ambiente seco tiene un rango de 4 a 6 meses como mínimo (24). Por ello, se evaluó la correlación entre la concentración obtenida de ADN y el tiempo de almacenamiento, mediante el coeficiente de correlación de Spearman, obteniendo una correlación positiva débil ($p=0.054$), lo cual no es significativo para nuestro estudio.

Por ende, el método CTAB-Cloroformo nos permitió obtener resultados óptimos mediante qPCR, permitiendo la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en láminas de baciloscopia, incluyendo casos con cultivo negativo donde la carga bacteriana puede ser baja o cursan tratamientos previos que no permiten la viabilidad del bacilo. Si bien, el costo de la prueba es superior a las metodologías

convencionales y el procedimiento de extracción puede resultar prolongado; el costo beneficio en relación al tiempo de reporte es mayor, lo que facilita una atención oportuna.

VI. CONCLUSIONES

- El método de extracción CTAB-Cloroformo evaluado a partir de láminas de baciloscopia, permitió obtener una buena concentración de ADN y una pureza óptima para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Los resultados del método de extracción CTAB-Cloroformo evaluado mediante qPCR mostraron una buena concordancia con respecto al método convencional para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Los resultados del método de extracción a través de qPCR lograron una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, demostrando que el método propuesto es capaz de detectar eficazmente los casos de TB. Asimismo, el valor predictivo positivo y negativo del método de extracción CTAB-Cloroformo a través de qPCR fue significativo, lo cual permite disminuir los casos de falsos positivos y negativo.
- Para el presente estudio, las concentraciones de ADN obtenidas por el método de extracción y el tiempo de almacenamiento de las baciloscopias no mostraron correlación significativa entre sí.

VII. LIMITACIONES

- Dentro de las limitaciones que se presentaron, fue no disponer de información de la clínica del paciente, tratamiento previo y toma de muestra del paciente, que pueden influir en la interpretación de los resultados de las pruebas convencionales. Se sugiere considerar la recolección y análisis de datos detallados para futuros estudios, mejorando la interpretación de los resultados y reforzando así los hallazgos.
- El acceso a ensayos de cuantificación de ADN más específicos fue limitado en este estudio. No obstante, se optó por utilizar el equipo Nanodrop para determinar la concentración del ADN como una alternativa factible en comparación con otras metodologías.
- Para validar la amplificación del ADN mediante qPCR, se basó solo con el resultado del control positivo interno del kit, y no se analizaron otros controles de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. La razón de no contar con este control se debe a un mayor requerimiento de bioseguridad que no contaba nuestro laboratorio.
- Nuestro muestreo se restringe solo a DIRIS Lima Norte, por ello los resultados no son representativos para toda la población de Lima.
- Por otro lado, el acceso limitado a laboratorios de biología molecular, en medio de una situación de pandemia limitó en su momento la ejecución de los ensayos y la recolección de las muestras en el CENEX del Hospital Cayetano Heredia.
- Por la cual, no se logró tener una cantidad de muestras representativa a la prevalencia del lugar de estudio.

- A pesar de estas limitaciones, nuestro estudio logro identificar datos relevantes, gracias al método de extracción CTAB-Cloroformo evaluado mediante qPCR, el cual demuestra ser un método de diagnóstico molecular de alta especificidad. Asimismo, se empleó un kit comercial para la amplificación de MTB que nos permitió disminuir el tiempo de procedimiento. Si bien, hay pocos estudios en la literatura, nuestro estudio nos permite seguir reforzando esta metodología como una alternativa para el diagnóstico de tuberculosis.

VIII. RECOMENDACIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que las láminas de baciloscopia pueden representar una herramienta muy útil para la extracción de ADN con el potencial de facilitar la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y la confirmación del diagnóstico. Asimismo, se propone el uso de láminas de baciloscopia como una alternativa biosegura para el transporte de muestras desde centros de salud, que no disponen de métodos confirmatorios para el diagnóstico de TB, hacia laboratorios de referencia.

Además de su empleo para monitorear la resistencia antibacteriana como la rifampicina y realizar seguimiento de desarrollo de multirresistencia en pacientes con reinfección, y brindar opciones para evaluar resistencia bacteriana en muestras previo a algún tratamiento sin la necesidad de esperar el resultado de un cultivo microbiológico, con el fin de disminuir los casos de tuberculosis multirresistente (MDR) y extremadamente resistente (XDR).

En estos últimos años, se han implementado laboratorios con áreas de Biología Molecular con énfasis en diagnóstico de infecciones respiratorias, por ello, la aplicación de nuevas técnicas para evaluar ADN contribuye a la identificación de TB recurrente o riesgo de resistencia antibacteriana.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2022 [Internet]. Geneva, Switzerland: WHO; 2022. [cited 2023 April 3]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>
2. Ministerio de Salud. COVID-19 y el impacto en la Tuberculosis en el mundo, 2021 (SE.24 hasta 31 Enero-2021) [Internet]. Bol Epidemiol. (Lima). 2021 [citado 8 de abril 2023]; 30 (04):102-103. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_20214.pdf
3. Ministerio de Salud. Sala situacional-Tasa de morbilidad e Incidencia de Tuberculosis en el Perú [Internet]. DPCTB. 2022 [citado 8 de abril 2023]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/Dashboard.aspx>
4. World Health Organization. TB country, regional and global profiles [Internet].2022 [citado 8 de abril 2023]. Disponible en: https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22PE%2
5. Normas Legales: Ley de Prevención y Control de la Tuberculosis en el Perú. El Peruano. 14 diciembre 2014 [Citado el 2 de abril de 2023]. Sec. Disposiciones Complementarias: p.539864. Disponible en: https://www.mef.gob.pe/contenidos/servicios_web/conectamef/pdf/normas_legales_2012/NL20141214.pdf
6. Reglamento de la Ley N°30287. Ley de Prevención y Control de la Tuberculosis en el Perú. El Peruano. 15 de mayo de 2016 [citado el 2 de abril del 2023]; p:

587360-587368. Disponible en:
ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2016/DS_021.pdf

7. Resolución Ministerial N°247-2018/MINSA que aprueba el DT “Plan de Intervención de Prevención y Control de Tuberculosis en Lima Metropolitana y Regiones priorizadas de Callao, Ica, La Libertad y Loreto, 2018-2020” [Internet]. 2018 [citado 8 de abril 2023] Disponible en:
<http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20180328114640.PDF>
8. Organización Panamericana de la Salud. Manual operativo de la OMS sobre la tuberculosis. Módulo 3: Diagnóstico. Métodos de diagnóstico rápido para detectar la tuberculosis, 2020 [Internet]. Washington, D.C.: OPS; 2022 [Citado el 23 de noviembre de 2023]. <https://doi.org/10.37774/9789275325377>. Disponible en:
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55927/9789275325377_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
9. World Health Organization Treatment of tuberculosis. Guidelines. Fourth edition. [Internet]. 2010 [Citado el 4 de abril de 2023]. Pág. 26. Disponible en:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44165/9789241547833_eng.pdf?sequence=1
10. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. Disponible en:
<https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762?login=falseOrga>

nización Panamericana de la Salud. Manual sobre la selección de pruebas moleculares de diagnóstico rápido recomendadas por la OMS para detectar la tuberculosis y la tuberculosis farmacorresistente [Internet]. Washington, D.C.: OPS; 2022 [Citado el 23 de noviembre de 2023]. doi.org/10.37774/9789275326329. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56594>

11. Carniel F, Dalla Costa ER, Lima-Bello G, Martins C, Scherer LC, Rossetti ML. Uso de la PCR convencional y la microscopía de frotis para diagnosticar la tuberculosis pulmonar en el área de la selva amazónica. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. Diciembre 2014 [citado 18 de abril de 2022]; 47 (12): 1016-1020. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2014001201016&lng=en.
12. López A, Acosta F, Sambrano D, Tarajia M, Navajas S, Arias F, Escobar B, Ortis P, Adames F, Goodridge A. Direct Molecular Characterization of Acid-Fast Bacilli Smear of Nontuberculosis Mycobacterium Species Causing Pulmonary Tuberculosis in Guna Yala Region, Panama. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2021 Jul 8 [citado 26 de noviembre 2023];105(3):633-637. doi: 10.4269/ajtmh.21-0096. PMID: 34237018; PMCID: PMC8592319. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34237018/>
13. Van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Ocurrencia y estabilidad de secuencias de inserción en cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*: evaluación de un polimorfismo de ADN dependiente de la secuencia de inserción como herramienta en la epidemiología

- de la tuberculosis. J Clin Microbiol [Internet]. noviembre de 1991 [citado 26 de noviembre 2023]; 29(11):2578-86. DOI: 10.1128/jcm.29.11.2578-2586.1991. PMID: 1685494; PMCID: PMC270376. Disponible en: [jcm 00047-0232.pdf \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1685494/)
14. Neves de Almeida I, Da Silva Carvalho W, Lúcia Rossetti M et al. Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: preliminary study. BMC Res Notes [Internet]. 2013 [Citado 18 de abril de 2022].6:561. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891981/>
15. Rabodoarivelo MS, Brandao A, Cergole Novella MC, C. Bombonatte AG, Imperiale B, Rakotosamimanana N et al. Detection of multidrug-resistant tuberculosis from stored DNA Samples: A multicenter study. Int J of Mycobacteriol [Internet]. 2018 [citado 16 de abril de 2022]; 7(1): 40-44. Disponible en: <http://www.ijmyco.org/article.asp?issn=2212-5531;year=2018;volume=7;issue=1;spage=40;epage=44;aulast=Rabodoarivel>
16. Rivera Fernández N. Evaluación operacional de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico rápido de la tuberculosis a partir de frotis de esputo en la Dirección de Salud IV-LE [Internet]. Repositorio de Tesis – UNMSM. 2007[citado 16 de abril de 2022]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2481>
17. Guernier V, Diefenbach-Elstob T, Pelowa D, Pollard S, Burgess G, McBryde ES, Warner J. Molecular diagnosis of suspected tuberculosis from archived smear slides from the Balimo region, Papua New Guinea [Internet]. Int J Infect

- Dis. 2018 Feb [citado 18 de abril de 2022]; 67:75-81. doi: 10.1016/j.ijid.2017.12.004. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29229499. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29229499/>
18. Alger J, Acosta MC, Lozano C, Velásquez C, Labrada LA. Frotis manchados como fuente de ADN. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [internet]. 1996 Oct [citado 22 de abril de 2022]; 91 (5): 589-591. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761996000500009&lng=en.
19. Van der Zanden AG, Te Koppele-Vije EM, Vijaya Bhanu N, Van Soolingen D, Schouls LM. Use of DNA Extracts from Ziehl-Neelsen-Stained Slides for Molecular Detection of Rifampin Resistance and Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol [Internet]. 2003 Oct [citado 22 de abril de 2022]; 41: 1101-1108. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150281/>
20. Perini Furlaneto I, Bezerra Sousa E, Lima de Brito M, et al. Evaluation of different methods of DNA extraction from baciloscopic tests of Ziehl-Neelsen staining. Cad Saúde Colet, Rio de Janeiro [Internet]. 2007 [Citado 5 de mayo de 2022]; 15 (3): 401 – 414. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/240611600_AVALIACAO_DE_DIFERENTES_PROCEDIMENTOS_PARA_EXTRACAO_DE_DNA_A_PARTIR_DE_ESFREGACOS_CORADOS_PELO_METODO_DE_ZIEHL-NEELSEN Evaluation of different methods of DNA extraction from baciloscopic tests of Ziehl

21. Ruiz Fuentes JL, Díaz A, Entenza AE, et al. Comparison of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium leprae* from Ziehl–Neelsen-stained microscopic slides. *International Journal of Mycobacteriology* [Internet]. 2015 [Citado 5 de mayo de 2022]; 4(4): 284 –289. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26964809>
22. Zakham F, Lahlou O, Akrim M, et al. Comparison of a DNA Based PCR Approach with Conventional Methods for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Morocco. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2012 [Citado 19 de abril de 2023];4(1): e2012049. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3435128/>
23. Vindell J [Internet]. Kappa de Cohen en R [Citado en Noviembre de 2023]. Disponible en: Kappa de Cohen en R (rstudio-pubs-static.s3.amazonaws.com)
24. Procedimientos para el control de calidad externo de baciloscopia para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis [Internet]. Lima, 2012 [citado el 16 de abril del 2023]; pág. 25. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/PROCEDIMIENTOS_CONTROL_CALIDAD_BACILOSCOPIA_DIAGNOSTICO_BACTERIOLOGICO_TUBERCULOSIS.pdf
25. Karadaq A, Usta E, Bilgin K, et al. Comparison of Culture, Real-Time DNA Amplification Assay and Ehrlich-Ziehl-Neelsen for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Balkan Med J*[Internet]. 2013 [Citado 19 de abril de 2023]; 30(1): 13–15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4116022/>

26. Gaspar Carnevale G, Suso Vargas F, Hehl Caiaffa-Filho H, et al. Preanalytical conditions can interfere with *M. tuberculosis* detection by PCR in respiratory samples. Clinbics (Sao Paulo) [Internet]. 2018 [Citado 5 de mayo de 2023]; 73: e410. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6238817/>
27. Jenny Laura Ruiz-Fuentes, Alexis Díaz, Anayma Elena Entenza, et al. Comparison of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium leprae* from Ziehl–Neelsen-stained microscopic slides [Internet]. International Journal of Mycobacteriology, Volume 4, Issue 4, 2015 [Citado 5 de mayo de 2023], Pages 284-289, ISSN 2212-5531. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.06.005>.
28. Resolución Ministerial N.º 1071-2022-MINSA. Documento Técnico: Manual de Procedimientos para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis mediante Cultivo [Internet]. 2022 [Citado 5 de mayo de 2022] Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3993571/Documento%20T%C3%A9cnico.pdf?v=1672236183>
29. Chaudhari KV, Toi PC, Joseph NM. Evaluation of real time polymerase chain reaction targeting mpb64 gene for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [Internet]. Indian J Tuberc. 2021 Apr;68(2):242-248. doi: 10.1016/j.ijtb.2020.09.009. Epub 2020 Sep 12. PMID: 33845959. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33845959/>
30. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol Biol. 1985;5(2):69-76.

doi:10.1007/BF00020088. Disponible en:
<https://www.scienceopen.com/document?vid=46e6093b-769a-467f-be1a-fd0c2ecfa9c0>

31. Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (2013). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(4), 506-513. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/236228980_Chelex_100_as_a_medium_for_simple_extraction_of_DNA_for_PCR-based_typing_from_forensic_material_BioTechniques_104_506-13_April_1991.
32. Instrucciones de uso - Logix Smart MTB K-007 IVD (en español) [en línea]. 2023 [26 Marzo 2024]; co-dx. Disponible en: https://co-dx.com/wp-content/uploads/2023/08/Instructions-for-Use-Logix-Smart-MTB-K-007-IVD-Spanish-Rev_5.pdf.

X. TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Condiciones para PCR Real time

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Capture
95 °C	20 segundos	45	N/A
95 °C	3 segundos		N/A
55 °C	32 segundos		FAM(Green), Cal Fluor 560 (Yellow), y Cal Fluor 610 (Orange)

Tabla 2. Valores de umbral del ciclo de control positivo

Rango para valores de umbral del ciclo de control positivo	
MTB para IS6110 (FAM)	21.00-29.99
MTTB para MPB64 (CF560)	21.50-25.20
Control Positivo Interno (CF610)	15.00-23.99

IS6110 (FAM): Micobacteria tuberculosis marcador principal para ISS6110

MPB64 (CF560): Micobacteria tuberculosis marcador secundario para MPB64

Control Positivo Interno (CF610): Marcador de control positivo interno Rnasa P

Tabla 3. Características de la muestra estudiada con sospecha clínica de MTB 2019-2021 (n=67)

Características	N (%)
Baciloscopia	
Negativa	9 (13.4)
1+	29 (43.3)
2+	11 (16.4)
3+	18 (26.9)
Cultivo	
Positivo	50 (74.6)
Negativo	17 (25.4)
qPCR	
Positivo	58 (86.6)
Negativo	9 (13.4)
Concentración de ADN (ng/ml)*	31.3 (16.3-65.5)
Calidad del ADN (A260/280)**	
Mala calidad (<1.8)	36 (53.7)
Buena calidad (1.8 a 2)	31 (46.3)
Tiempo de almacenamiento (meses)*	8 (6.0-11.0)
Método convencional (BK-cultivo)	
Positivo	59 (88.0)
Negativo	8 (12.0)

* Mediana (IQR).

**Ratio

Tabla 4. Detección de MTB por qPCR para la evaluación del método CTAB-Cloroformo

	Detección de ADN de MTB por qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Baciloscopia			
Positivo	58	0	58
Negativo	0	9	9
<i>Total</i>	58	9	67
Carga bacilar			
1+	29	0	29
2+	11	0	11
3+	18	0	18
Negativo	0	9	9
<i>Total</i>	58	9	67
Cultivo			
Positivo	50	1	51
Negativo	8	8	16
<i>Total</i>	58	9	67
Método convencional (BK-cultivo)			
Positivo	58	1	59
Negativo	0	8	8
<i>Total</i>	58	8	67

Nota. Fuente: Elaboración propia, 2024.

Tabla 5. Detección de MTB con CTAB-Cloroformo

	Detección de MTB por Método convencional (Cultivo y/o baciloscopia)		Total
	Positivo	Negativo	
Detección de ADN de MTB(qPCR)			
Positivo	58	0	58
Negativo	1	8	9
<i>Total</i>	59	8	67

ANEXOS

Anexo 1. Definición operacional de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo y escala de medición
Baciloscopia (BK)	Prueba rápida usada para la detección de bacilos BAAR, donde se encuentra el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , en muestras de esputo.	Búsqueda de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) mediante el estudio microscópico de muestras de esputo.	Negativo (No se observan BAAR) 1+ (10-99 BAAR en 100 campos observados positivo) 2+ (1-10 BAAR por campo en 50 campos observados positivo) 3+ (más de 10 BAAR promedio por campo en 20 campos observados positivo) (26)	Variable cualitativa / nominal
Resultado de qPCR)	Emplea moléculas cuya fluorescencia permiten la cuantificación de los productos amplificados de ADN o ARN	Resultado para marcadores IS6110, MPB64 identifica la presencia de MTB.	Positivo (Ct 21-25) Negativo (Ct <21)	Variable cualitativa /nominal

Concentración de ADN	Cantidad de ácidos nucleicos pertenecientes a la muestra de esputos fijadas en láminas BK.	Resultado de absorbancias medidas por espectrofotometría.	ng/μl	Variable cuantitativa/continua
Relación OD 260 / OD 280	La relación de absorbancia a 260 nm frente a 280 nm evalúa la contaminación de ADN de las soluciones de proteínas.	Indicador de pureza de los ácidos nucleicos obtenidos	≥ 1.8 = Puro < 1.8 = No puro	Variable cualitativa
Tiempo de almacenamiento	Tiempo transcurrido desde la obtención de resultados de la prueba Bk.	Registrado en la base de datos del Laboratorio de Mycobacterias del Hospital Nacional Cayetano Heredia (CENEX).	Meses	Variable cuantitativa/discreta
Resultado de cultivo (Gold standard)	Prueba Gold standard usado para confirmar el diagnóstico de tuberculosis.	Resultado del desarrollo de microorganismo en medios de Löwenstein-Jensen	Positivo (se observa crecimiento) Negativo (no se observa crecimiento)	Variable cualitativa/nominal

facilitar el procedimiento de extracción mediante un protocolo de bajo costo y de fácil operatividad para Laboratorios con bajos recursos.

El motivo de usar láminas de baciloscopia archivadas, permitirá acceder a información relevante desde el punto de vista del diagnóstico. Sin embargo, muchos de los diagnósticos requieren disponer de aislados cultivados, o como mínimo esputos descontaminados y procesados, algo que no es factible en muchas zonas de bajos recursos, donde no existe un equipamiento de laboratorio mínimo.

El uso de láminas de baciloscopia almacenadas o archivadas no representa riesgo alguno al diagnóstico del participante, debido a que el material dispuesto a recuperar es luego de la etapa final de diagnóstico, y posteriormente las láminas almacenadas por un periodo de tiempo, son incineradas y eliminadas de forma segura, siguiendo los protocolos de bioseguridad. En ese sentido, creemos que el uso de las láminas de baciloscopia, son importantes para realizar este estudio, pues sin este instrumento no sería factible ejecutar el presente proyecto.

El uso de láminas de baciloscopia provenientes del laboratorio de Mycobacterias del Centro de Excelencia (CENEX) no representa un riesgo para la confidencialidad de los datos del participante, debido a que se encuentran previamente codificadas sin ningún dato personal del paciente que permita su identificación; asimismo, el material dispuesto, es recuperar el esputo fijado con Ziehl Neelsen luego de la etapa final del diagnóstico.

La implementación del método de extracción *in house* además del uso de la prueba molecular, podrá ser reproducible empleando cabinas de sobremesa para PCR que faciliten las medidas de contención para el manejo del extracto, garantizando un proceso de calidad. Además de eliminar los casos falsos negativos no identificados por el diagnóstico microbiológico (poner el porcentaje de falsos positivos), favorecerán a una acción inmediata al acceso de tratamiento. Asimismo, el costo beneficio de la prueba en promedio (aproximadamente 120 soles) con respecto al tratamiento ineficiente es menor cuando se determina el diagnóstico a un corto plazo, ya que la prueba molecular contribuye con un diagnóstico más específico de tuberculosis.

Por todo ello, el presente estudio buscar alternativas a problemas o retos para seguir implementando pruebas moleculares en los laboratorios a nivel nacional, contribuyendo de esta manera con el diagnóstico oportuno y seguimiento de diferentes enfermedades infecciosas. Por otro lado, en cuanto a la importancia social, está asociado a mejoras en el sistema de diagnóstico para darle un alcance oportuno al tratamiento dentro de las 24 horas en zonas de difícil acceso.

Anexo 4. Tablas de resultados

CÓDIGO INTERNO	RESULTADO BK	RESULTADO CULTIVO	Concentración (ng/ml)	A 260	A 280	A260/280	qPCR
1	1+	3+	19.43	0.389	0.162	2.40	POSITIVO
2	2+	3+	69.16	1.383	0.711	1.94	POSITIVO
3	3+	2+	61.52	1.230	0.627	1.96	POSITIVO
4	3+	3+	57.86	1.157	0.575	2.01	POSITIVO
5	2+	2+	7.14	0.143	0.084	1.70	POSITIVO
6	1+	1+	24.19	0.484	0.255	1.89	POSITIVO
7	1+	1+	25.93	0.519	0.290	1.79	POSITIVO
8	1+	4 colonias	23.46	0.469	0.268	1.75	POSITIVO
9	2+	3+	65.50	1.310	0.718	1.83	POSITIVO
10	3+	3+	5.23	0.105	0.051	2.04	POSITIVO
12	1+	2+	34.61	0.692	0.590	1.93	POSITIVO
14	2+	2+	18.56	0.371	0.177	2.10	POSITIVO
17	2+	2+	28.53	1.780	0.313	1.82	POSITIVO
18	1+	2+	3.00	0.060	0.030	2.00	POSITIVO
19	1+	2+	44.66	0.893	0.724	1.23	POSITIVO
20	1+	2+	54.84	1.097	0.607	1.81	POSITIVO
21	3+	1+	17.16	0.343	0.201	1.71	POSITIVO
22	1+	1+	5.67	0.113	0.067	1.68	POSITIVO
23	1+	1+	159.62	3.192	1.754	1.82	POSITIVO
24	3+	2+	22.55	0.451	0.239	1.89	POSITIVO
25	1+	3+	10.02	0.200	0.112	1.79	POSITIVO
26	1+	3+	39.48	0.790	0.443	1.78	POSITIVO
27	1+	2+	14.29	0.286	0.181	1.58	POSITIVO
28	3+	1+	38.89	0.778	0.443	1.76	POSITIVO
29	1+	1+	56.85	1.137	0.644	1.77	POSITIVO
30	1+	2+	42.34	0.847	0.459	1.84	POSITIVO
31	1+	2+	50.29	1.006	0.524	1.92	POSITIVO
32	2+	3+	34.74	0.695	0.376	1.85	POSITIVO
33	1+	1+	5.01	0.100	0.064	1.57	POSITIVO
34	2+	3+	70.96	1.419	0.800	1.77	POSITIVO
35	3+	3+	19.72	0.394	0.227	1.74	POSITIVO
36	1+	3+	86.89	1.738	0.967	1.8	POSITIVO
37	2+	2+	14.89	0.298	0.155	1.92	POSITIVO
38	3+	3+	27.37	0.547	0.291	1.88	POSITIVO
39	1+	1+	11.75	0.235	0.127	1.85	POSITIVO

41	1+	N	131.64	2.633	1.467	1.79	POSITIVO
42	N	N	23.04	0.461	0.265	1.74	NEGATIVO
44	N	N	125.52	2.510	1.440	1.74	NEGATIVO
45	N	N	11.40	0.228	0.140	1.63	NEGATIVO
58	3+	N	71.89	1.438	0.808	1.78	POSITIVO
59	3+	1+	8.44	0.169	0.101	1.68	POSITIVO
60	3+	N	105.74	2.115	1.196	1.77	POSITIVO
61	3+	N	64.59	1.292	0.739	1.75	POSITIVO
62	1+	N	31.28	0.626	0.346	1.81	POSITIVO
64	1+	N	265.52	5.310	2.993	1.77	POSITIVO
66	2+	N	20.88	0.418	0.260	1.61	POSITIVO
69	1+	4 colonias	60.76	1.215	0.653	1.86	POSITIVO
70	N	2 colonias	30.36	0.607	0.341	1.78	NEGATIVO
72	N	N	237.83	4.757	2.663	1.79	NEGATIVO
77	N	N	13.60	0.272	0.160	1.70	NEGATIVO
80	N	N	18.57	0.371	0.211	1.76	NEGATIVO
81	3+	N	40.82	0.816	0.443	1.84	POSITIVO
82	3+	3+	10.59	0.212	0.134	1.58	POSITIVO
83	1+	1+	50.92	1.018	0.600	1.70	POSITIVO
86	3+	2+	105.54	2.111	1.173	1.80	POSITIVO
87	1+	3+	25.13	0.503	0.268	1.88	POSITIVO
88	3+	3+	89.40	1.788	0.993	1.80	POSITIVO
89	3+	3+	135.84	2.717	1.553	1.75	POSITIVO
90	1+	3+	10.82	0.216	0.118	1.84	POSITIVO
92	1+	3+	48.55	0.971	0.546	1.78	POSITIVO
93	1+	3+	9.45	0.189	0.117	1.62	POSITIVO
94	2+	3+	77.56	1.551	0.875	1.77	POSITIVO
95	1+	3+	30.38	0.608	0.354	1.72	POSITIVO
96	2+	3+	92.14	1.843	1.023	1.80	POSITIVO
97	3+	3+	10.10	0.202	0.113	1.79	POSITIVO
101	N	N	139.03	2.781	1.515	1.84	NEGATIVO
104	N	N	16.3	326.000	179.000	1.82	NEGATIVO