



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL MÉTODO DE
SUSCEPTIBILIDAD A FÁRMACOS POR OBSERVACIÓN
MICROSCÓPICA “MODS” PARA EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR EN MUESTRAS
HUMANAS

EVALUATION OF THE PERFORMANCE OF THE
MICROSCOPIC OBSERVATION DRUG SUSCEPTIBILITY
METHOD “MODS” FOR THE DIAGNOSIS OF
EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS IN HUMAN
SAMPLES

TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

AUTOR

MARUJA YARA DEPAZ DOLORES

ASESOR

STEEV ORLANDO LOYOLA SOSA

CO- ASESOR

JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

LIMA - PERÚ

2020

ASESORES DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

ASESOR

Mg. Steev Orlando Loyola Sosa

Departamento Académico de la Escuela Profesional de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-5455-2423

CO-ASESOR

Mg. Juan Carlos Agapito Panta

Departamento Académico de la Escuela Profesional de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-9134-7322

DEDICATORIA

Dedico este Proyecto de Investigación a **Dios**, por darme la fortaleza y sabiduría en los momentos más difíciles de mi vida y por ser mi guía y luz que ilumina mi caminar del día a día.

A mis **padres** Matías e Isabel, por haberme inculcado los principios y valores para ser una persona de bien en la sociedad, ellos son mi mayor motivación para continuar superándome. A mis **hermanos**, por el cariño y aliento incondicional en todo momento.

A mis **profesores** de Investigación, por transmitir sus conocimientos y prepararnos para practicar una investigación con ética y responsabilidad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi total agradecimiento a la Escuela Profesional de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina de la UPCH, por preocuparse de que sus egresados se evoquen a la Investigación Científica de calidad.

Mi gratitud por siempre, a mis Asesores del trabajo académico, por la paciencia y apoyo brindado.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

El autor declara no tener conflictos de interés.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

Evaluación del rendimiento del método de susceptibilidad a fármacos por observación microscópica "MODS" para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras humanas.

INFORME DE ORIGINALIDAD

22%	22%	3%	13%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.usmp.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	mejorconsalud.as.com Fuente de Internet	2%
3	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	2%
4	fr.slideshare.net Fuente de Internet	1%
5	centroconacyt.mx Fuente de Internet	1%
6	duict.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	es.finance.yahoo.com Fuente de Internet	1%
8	Submitted to Universidad de San Martin de Porres	1%

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	5
III. Materiales y Métodos	6
IV. Referencias Bibliográficas	15
V. Anexos	22

RESUMEN

La Tuberculosis sigue siendo un problema importante de salud y es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo. Se estima que la tuberculosis extrapulmonar representa aproximadamente el 10 a 20% de los casos de enfermedad tuberculosa que se ha reportado a nivel mundial en persona inmunocompetentes, siendo mayor esta cifra, en personas inmunodeprimidas como los afectados por VIH u otra comorbilidad. El diagnóstico oportuno y confiable es una limitante para brindar opciones terapéuticas adecuadas, debido a que los métodos convencionales como el cultivo sólido son lentos y/o los cultivos líquidos automatizados son inaccesibles en laboratorios de escasos recursos debido a su alto costo. El método MODS, es una prueba fenotípica de tamizaje directa a partir de muestras de esputo con baciloscopia positiva, negativa y paucibacilar, y es considerada como una opción diagnóstica costo-efectiva.

Objetivo: Determinar el rendimiento del cultivo líquido por método MODS en comparación al cultivo sólido de Lowenstein Jensen para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras humanas. **Materiales y métodos:** Se realizará un estudio de Evaluación de pruebas diagnósticas de todas las muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha de Tuberculosis extrapulmonar procedentes de los establecimientos de salud de la Región Lima Provincias, referidas al Laboratorio de Salud Pública de la DIRESA Lima, sede Huaral; durante el Periodo de enero a diciembre del 2020. Todas las muestras serán analizadas por cultivo sólido Lowenstein Jensen y cultivo líquido por método MODS.

Palabras claves: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, análisis microbiológico.

ABSTRACT

The tuberculosis remains a major health problem and is considered such one of the top 10 causes of death around the world . Extrapulmonary tuberculosis is estimated to account for approximately 10 to 20% of cases of tuberculosis disease reported worldwide in people capable of producing a normal immune response, primarily in people who have a weakened immune system, such as people affected by HIV or other comorbidity. Timely and reliable diagnosis is a limitation to providing adequate therapeutic options because some conventional methods such as solid culture are slow and/or automated liquid cultures are inaccessible in laboratories with limited resources due to their high cost. The MODS method is a direct phenotypic screening test using sputum samples with positive, negative and paucibacillary sputum, and is considered a cost-effective diagnostic option. **Objective:** Determine the performance of the liquid culture by MODS method in comparison to the Lowenstein Jensen solid culture for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in human samples. **Materials and methods:** A Diagnostic Test Evaluation study will be carried out on all extrapulmonary samples from patients with suspected extrapulmonary Tuberculosis from health facilities in the Lima Provinces Region, referred to the DIRESA Lima Public Health Laboratory, Huaral headquarters ; during the period from January to December 2020. All samples will be analyzed by Lowenstein Jensen solid culture and liquid culture by MODS method.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, microbiological analysis.

I. INTRODUCCIÓN

En el último informe global de la Organización Mundial de la salud (OMS), la tuberculosis (TB) sigue siendo un problema importante de salud y es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo (1). Se estima que 10.0 millones (9.0–11.1 millones) de personas enfermaron de TB en el 2018, un número que se ha mantenido relativamente estable en los últimos años (1).

Geográficamente, la mayoría de los casos de tuberculosis en el 2018 fueron registrados en las regiones del Sudeste Asiático (44%), África (24%) y el Pacífico Occidental (18%), y en menor escala en el Mediterráneo oriental (8%), América (3%) y Europa (3%). En la región de las Américas, Brasil y Perú se encuentran dentro de los 30 países del mundo con alta carga de incidencia anual de casos de TB y de TB multidrogorresistente (TB MDR), respectivamente (1). Durante el 2017, en América fueron diez los países que albergaron al 87% de los casos del continente, de los cuales, más de la mitad se concentraron en Brasil, Perú y México (2). La carga de casos de TB resistentes a Rifampicina (RR) y de casos multidrogo resistentes (MDR) está principalmente concentrada en Perú, Brasil y México (2).

La TB es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa y crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que se localiza generalmente en el pulmón, aunque puede afectar a otros órganos por diseminación hematógica y linfática (3,4) denominándose TB extrapulmonar (TBEP) (5). Se estima que la carga de TBEP representa aproximadamente el 10 a 20% de los casos de enfermedad tuberculosa

que se ha reportado a nivel mundial en persona inmunocompetentes (6, 7). Del mismo modo, se estima que la carga de TBEP en personas inmunodeprimidas, como los afectados por VIH, se incrementa hasta un 60 a 62% (6, 8) en comparación a la población general (9). La carga reportada para TBEP durante los años 2013 y 2014 fue de 18%, siendo la ubicación pleural la más frecuente (54%), seguida de ganglionar (11.1%) y del sistema nervioso (9%), y en menor porcentaje casos de localización gastrointestinal, mamas, urogenital, osteo-articular y de piel (10).

El diagnóstico oportuno y confiable permite brindar opciones terapéuticas fundamentadas en una correcta identificación y caracterización del agente patógeno. En muestras extrapulmonares, la sensibilidad de la baciloscopia oscila entre 5 a 20% debido a que se requiere de una alta carga bacteriana (11). El cultivo sólido en Lowenstein Jensen (LJ) es considerado como la prueba de oro debido a que permite detectar desde 10 bacilos/mL de muestra (11). Sin embargo, pese a su alta sensibilidad, el crecimiento de las micobacterias es lento y por ende los resultados pueden tardar de 3 a 4 semanas. Por el contrario, las pruebas rápidas ofrecen un diagnóstico rápido, mejorando el manejo del paciente (12).

En la actualidad se cuentan con dos métodos de diagnóstico rápido basadas en el uso de medios de cultivo líquido, como el método automatizado MGIT y el método MODS (13). El método MODS, el cual fue desarrollado en Perú, es una prueba fenotípica de tamizaje directa a partir de muestras de esputo con baciloscopia positiva o negativa, indicada antes o durante el tratamiento anti-tuberculosis (13). MODS determina de manera simultánea tuberculosis y la

resistencia a isoniacida y rifampicina en 7 a 14 días, motivo por el cual es considerada como una opción diagnóstica costo-efectiva (13,14).

El desempeño de MODS para el diagnóstico rápido de TB y TB MDR usando muestras de esputo en comparación con el cultivo sólido ha sido estudiado por múltiples grupos de investigación a nivel mundial. La sensibilidad y especificidad de MODS es alta, oscilando entre 92% a 96% y $\geq 98\%$, respectivamente (15, 16, 17).

Durante el 2012 en Egipto, el desempeño de MODS frente al método MGIT fue evaluado utilizando 115 muestras de pacientes con baciloscopia positiva, en la que la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de MODS para TB-MDR fue de 95,3%, 98,6%, 97,6% y 97,1% respectivamente (18). Estos hallazgos fueron consistentes con un estudio desarrollado en el 2012 utilizando muestras de esputo de pacientes de un hospital de República Dominicana (19). En dicho estudio la sensibilidad y especificidad de MODS para la detección de TB pulmonar fue de 100%, con una mediana del tiempo de positividad del cultivo en medio líquido MODS y medio solido LJ de 7 y 30 días respectivamente (19). Asimismo, Agarwal A. y colaboradores evaluaron el ensayo MODS empleando el método estándar de referencia (cultivo sólido y líquido) durante el año 2019 en la India. En ese estudio obtuvieron la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 91.3%, 98.2%, 96.0% y 95.9% respectivamente y el resultado de cultivo se obtuvo con una mediana de tiempo de 10.3 días en comparación con 13.8 días usando MGIT y 30.5 días usando cultivo LJ (20).

En relación con muestras extrapulmonares, durante el 2013 en China, el rendimiento del método MODS frente al cultivo LJ fue evaluado utilizando muestras de líquido pleural (LP) y líquido céfalo raquídeo (LCR), en la que la sensibilidad de MODS para el diagnóstico de TB Pleural y TB miliar fueron 20.5% y 37.5% respectivamente, mientras que con el cultivo LJ fueron 6.4% y 18.8% respectivamente, en tanto la especificidad para ambos ensayos fue el 100%. El tiempo promedio para la obtención de los resultados de cultivo de los métodos MODS y LJ fueron 14 días, 32 días para para muestras de LP, y 9 días y 31 días para muestras de LCR respectivamente (21).

Asimismo, en otro estudio similar, realizado por Zadbuke S. y colaboradores, evaluaron el desempeño de MODS en muestras extrapulmonares usando como método de referencia el cultivo LJ durante el 2017 en un hospital de la India. En este estudio obtuvieron un resultado de sensibilidad y especificidad de la prueba MODS de 83.33% y 83.33% respectivamente y el tiempo promedio para la detección del *Mycobacterium tuberculosis* fue más corto en comparación con el cultivo LJ, 10 días y 31 días respectivamente (22). Sin embargo, en el estudio desarrollado por Kirwan D. y colaboradores, en la que evaluaron el rendimiento del método MODS con muestras sólidas de ganglios linfáticos empleando como método de oro el cultivo LJ durante el año 2016 en un hospital de Lima Perú. El resultado de sensibilidad de MODS en este estudio, fue menor en comparación al cultivo LJ, siendo 65.4% y 76.9% respectivamente (23).

Pregunta de Investigación: ¿Cuál es el rendimiento del cultivo líquido por método MODS para el diagnóstico de Tuberculosis extrapulmonar en muestras de

pacientes procedentes de establecimientos de salud de la Región Lima Provincias en el periodo 2020?

1.1 Justificación

La información disponible sobre validación de MODS para diagnosticar TB usando muestras pulmonares es amplia y consistente en la literatura científica. No obstante, la información con respecto a la validación de MODS para diagnóstico de TBEP es limitada y escasa a nivel local. En el Perú, MODS se encuentra únicamente validado para el diagnóstico de TB pulmonar, sin embargo, para casos extrapulmonares son limitadas, y no están validadas. La escasa evidencia sugiere que MODS podría ser una opción diagnóstica rápida y con buen rendimiento diagnóstico para casos de TBEP en comparación a métodos automatizados de cultivos líquidos. Los resultados de este estudio podrían ser usados para la implementación del MODS como técnica diagnóstica en laboratorios de escasos recursos.

II. OBJETIVO E HIPÓTESIS

Objetivo general

Determinar el rendimiento del cultivo líquido método MODS en comparación al cultivo sólido de Lowenstein Jensen (LJ) para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras humanas.

Objetivos secundarios

1. Estimar la sensibilidad y especificidad del cultivo líquido por método MODS en comparación al cultivo sólido de Lowenstein Jensen (LJ) para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras humanas.
2. Estimar el valor predictivo positivo y negativo del cultivo líquido por método MODS en comparación al cultivo sólido de Lowenstein Jensen (LJ) para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras humanas.
3. Estimar el coeficiente kappa para el cultivo líquido por método MODS en comparación al cultivo sólido de Lowenstein Jensen (LJ) para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras humanas.
4. Evaluar diferencia de tiempo de crecimiento del *Mycobacterium tuberculosis* entre el cultivo líquido por método MODS en comparación al cultivo sólido de Lowenstein Jensen (LJ) para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras humanas.

III. MATERIAL Y MÉTODO

1. Diseño del estudio

Evaluación de pruebas diagnósticas.

2. Población y lugar de estudio

La población de estudio estará conformada por todas las muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha de Tuberculosis extrapulmonar procedentes de los establecimientos de salud de la Región Lima Provincias, las cuales son referidas al Laboratorio de Salud Pública de la Dirección Regional de Salud de Lima Provincias, sede Huaral, durante el periodo de enero a diciembre del 2020.

2.1 Criterios de inclusión

Muestras extrapulmonares de pacientes con diagnóstico presuntivo de TB EP.

Muestras extrapulmonares de pacientes que no hayan iniciado tratamiento antituberculosis.

Muestras extrapulmonares con baciloscopia positiva, paucibacilar y/o negativo.

2.2 Criterios de exclusión

Muestras de aspirado bronquial.

Muestras de lavados bronquio alveolares.

Muestras con cantidad insuficiente.

3. Muestra

Para el 2018, se recibió un total de 384 muestras extrapulmonares con solicitud de diagnóstico de MTB. Los diferentes tipos de muestra recibidas y procesadas fueron: líquido pleural (138), líquido céfalo raquídeo (37), líquido ascítico (14), líquido sinovial (4), líquido peritoneal (1), secreción ganglionar (9), secreción de abscesos (6), secreción mamaria (4), secreción traqueal (3),

secreción de herida (2), aspirados gástricos (106), orina (40), heces (16) y biopsias de piel (3) y mamario (1).

En un escenario conservador, en el cual asumimos un 20.0% de positividad en muestras extrapulmonares, y para encontrar una diferencia de 10% en sensibilidad o especificidad ($H_0: 0.5$, $H_a: 0.6$), con potencia de 0.804 y significancia menor a 0.05, el tamaño de muestra calculado fue de 249 muestras.

4. Procedimientos y técnicas

El método MODS se basa en la observación de cordones característicos de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio luz invertida. El método, ha sido diseñado para la detección del crecimiento de MTB y la susceptibilidad a INH y RIF. Sin embargo, el propósito del presente estudio es sólo evaluar el rendimiento de MODS con relación a la detección de MTB para diagnóstico de TBEP y no la caracterización de la resistencia. Bajo ese contexto se detalla los procedimientos y técnicas orientadas al aislamiento de MTB.

Para el procedimiento de descontaminación previo a la siembra en los medios de cultivo, se utilizará la solución decontaminante Hidróxido de Sodio N-acetil cisteína (NaOH-NALC) para el método LJ (24) y MODS (25). En caso de muestras extrapulmonares que proceden de órganos estériles, se realizará el proceso directo y el procedimiento de descontaminación se realizará cuando

haya sospecha que la muestra no es estéril, la muestra será dividida en dos volúmenes iguales, uno será usado para ser decontaminado y el otro para la inoculación directa.

Proceso Directo (26, 27, 28)

Para muestras de fluidos como líquido pleural, sinovial y pericárdico, y además para muestras de biopsia de tejidos y aspirado ganglionar asépticamente colectados se realizará de la siguiente forma:

- 1) El volumen requerido de las muestras de fluidos es 5 ml, serán concentradas por centrifugación a 3000g por 15 minutos en un tubo de polipropileno de centrifuga de 15 ml.
- 2) En tanto las muestras de biopsia de tejido, la cantidad mínima requerida será de 5 mm³, la cual previa a la centrifugación serán machacadas en un mortero con 300-400 ul de solución salina fisiológica (SSF), luego se añadirá 4 ml de SSF y se separará la muestra en 2 tubos estériles de centrifuga; 2 ml será usado para inoculación directa y el resto será decontaminado.
- 3) Luego de la centrifugación el sobrenadante será decantado cuidadosamente y el sedimento será resuspendido en un volumen total de 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene 5.1ml de 7H9-OADC-PANTA) en un tubo; mezclar bien.
- 4) Preparar un frotis adicionando 2 gotas (0.1ml) en una lámina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen.

- 5) Adicionar la suspensión de la muestra al tubo que contiene el remanente del medio 7H9-OADC-PANTA; mezclar bien.
- 6) Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa y en los tubos LJ.

En caso de muestras de **líquido cefalorraquídeo** (LCR), la cantidad mínima requerida será de 5 ml, la cual será colocada en un tubo de centrífuga de 15 ml y concentrada por centrifugación a 3000g por 15 minutos. Luego se decantará el sobrenadante y se dejará aproximadamente 750µl del sedimento. Este se resuspenderá y preparará un frotis adicionando 2 gotas (100µl) en una lámina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen, así mismo se sembrará 200ul en cada tubo de LJ, y la suspensión remanente de la muestra 250µl será dispensada en la placa de MODS que contiene 750µl del medio 7H9-OADC-PANTA (29).

Procedimiento de descontaminación (26, 27, 28 30, 31, 32) se realizará para muestras con sospecha de contaminación y para muestras con alta carga de flora microbiana como las heces, la orina y el aspirado nasogástrico.

- 1) En caso de la muestra de **heces**, se pesará 0.1g de la muestra y se colocará en un tubo de centrífuga de 15 ml conteniendo 6ml de agua destilada estéril.
- 2) Cerrando la tapa firmemente se mezclará en un agitador durante 30 segundos para disolver la muestra.
- 3) Se dejará reposar por 15 minutos para separar las partículas de heces no disueltas.

- 4) Usando una pipeta Pasteur, se transferirá 2ml del sobrenadante a otro tubo estéril de centrífuga de 15ml y se procederá a la descontaminación de la suspensión de las heces según el método NALC-NaOH descrito para las muestras de esputo.
- 5) Del mismo modo las otras muestras que requieran descontaminación serán concentradas por centrifugación a 3000g por 15 minutos en un tubo de polipropileno de centrífuga.
- 6) Luego de la centrifugación se decantará el sobrenadante y se dejará aproximadamente un volumen de 2ml y se procede a la descontaminación siguiendo el método de NaOH-NALC con un tiempo máximo de 15 minutos de exposición con solución descontaminante.
- 7) Usando una pipeta Pasteur estéril se resuspenderá el sedimento en un total de 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene 5.1ml 7H9-OADC-PANTA) en el tubo de centrífuga; mezclar bien.
- 8) Se preparará un frotis adicionando 2 gotas (100µl) en una lámina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen.
- 9) Luego se adicionará el otro mililitro de la suspensión de la muestra al tubo que contiene el remanente del medio 7H9-OADC-PANTA; mezclar bien.
- 10) Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa MODS y los tubos LJ.

Preparación final de la placa de MODS (Detección)

- 1) Se dispensará 1 ml de la suspensión final de la muestra en cada uno de los 4 pozos en una sola columna de la placa de 24 pozos y 200µl en cada tubo de LJ.

- 2) Se almacenará un alícuota stock de la suspensión de la muestra remanente en un tubo estéril de microcentrífuga a 2-8°C como backup.
- 3) Se repetirá el mismo procedimiento con las otras muestras hasta que todas las columnas de la placa estén llenas con excepción de la columna 3 (o hasta que todas las muestras hayan sido dispensadas).
- 4) Se dispensará 1ml del medio 7H9-OADC-PANTA sin muestra en los 4 pozos de la columna 3 de cada placa de MODS (controles internos negativos).
- 5) Luego serán cerrado la placa con su tapa, colocada en una bolsa de polietileno tipo ziploc y esta será cerrada, ya no se abrirá por ningún motivo.
- 6) Serán incubadas a 37°C entre 7 a 21 días y los cultivos LJ serán incubados entre 30 a 60 días.

Nota

Si el proceso de la muestra es directo o por descontaminación, la muestra descontaminada y la muestra directa serán inoculadas en columnas separadas (4 pozos para cada muestra) y puede ser dispensada en la misma placa.

Lectura de las Placas e interpretación

La lectura de las placas será realizada de forma diaria, hasta los 21 días. Un resultado positivo es definido como el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia ($\geq 2\text{UFC}$) en uno o más pozos (26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

Lectura del cultivo LJ e interpretación

De forma estándar, la lectura de esta técnica se realiza a los 2-3 días después de sembrados para evaluar contaminación, si la siembra está absorbida y el líquido se ha evaporado, y luego a los 7 días post siembra y luego una vez por semana hasta identificar los tubos con desarrollo de colonias de micobacterias (24). No obstante, para este estudio la lectura de los tubos será realizado de forma diaria. Un resultado positivo es definido como el crecimiento de uno o más unidades formadoras de colonia (≥ 1 UFC) en los tubos (24, 33).

5. Aspectos éticos

Este protocolo se registrará en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), y será evaluado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución. Este estudio no propone usar un consentimiento informado debido a que los objetivos propuestos no difieren del fin por el cual las muestras fueron recolectadas.

Se solicitará los Permisos a la Estrategia Sanitaria Regional de Prevención y Control de Tuberculosis de la Dirección Ejecutiva de Salud Integral y a la Dirección de Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública de la Dirección Ejecutiva de Inteligencia Sanitaria de la DIRESA Lima, para el uso de las instalaciones, equipos, materiales e insumos necesarios para la ejecución del estudio.

Durante la implementación del estudio se respetarán los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y se seguirán estrictamente las recomendaciones realizadas por el CIE-UPCH.

6. Plan de análisis

Las variables categóricas serán resumidas como frecuencias absolutas y proporciones. Las variables numéricas serán resumidas usando una medida de tendencia central y dispersión que se ajuste a la distribución de sus datos. El rendimiento de la prueba de observación microscópica “MODS” se realizará a través del cálculo del coeficiente Kappa, sensibilidad y especificidad, y valores predictivos. Estos cálculos serán realizados utilizando el cultivo sólido de Lowenstein Jensen (LJ) como Gold Standard. El reporte de cada indicador estará acompañado de los intervalos de confianza al 95%. La diferencia de tiempos en el aislamiento será determinado mediante la prueba de t de Student en caso se cumpla con los supuestos estadísticos, o con su homólogo no paramétrico en caso de no cumplimiento. Todos los análisis serán realizados con el software estadístico Stata v14 (StataCorp, TX, US).

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Global Tuberculosis Report 2019. Informe mundial sobre tuberculosis 2019. Disponible en: <https://www.who.int/tb/global-report-2019>.
2. Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis en las Américas 2018. Washington, D.C.: OPS, 2018. Número de documento: OPS/CDE/18-036. Disponible en: <http://www.actbistas.org/wp-content/uploads/2018/09/La-tuberculosis-en-las-americas-2018-Version-final.pdf>.
3. Ministerio de Salud de Argentina. Enfermedades Infecciosas / Tuberculosis. Guía para el Equipo de Salud N°3. 2da Edición; ISSN 1852-1819 / ISSN 1852-219X (en línea); 2014. Disponible en: http://www.ministeriodesalud.chubut.gov.ar/wp-content/uploads/2018/07/guia_de_diagnostico_tratamiento_y_preencion_de_la_tuberculosis.pdf.
4. Ramírez M, Menéndez A, Noguero A. Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. Rev. Esp. sanid. penit. [Internet]. 2015 [Citado el 13 de Oct del 2019] 17 (1): 3-11. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1575-06202015000100002&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4321/S1575-06202015000100002>.
5. Izaga N, Pérez T, Hernández L, Contreras P, Toledo C. Tuberculosis faríngea en amígdala palatina. Rev Cubana Otorrinolaringol Cirug Cabeza

- Cuello [Internet]. 2019 [Citado el 13 Oct del 2019]; 3 (1): [aprox. 0 p.].
Disponible en: <http://www.revotorrino.sld.cu/index.php/otl/article/view/76>
6. Stangalino V, Gómez J, González J, Averbach J, Iriart J, Soprano A. Tuberculosis extrapulmonar: Otra cara de la misma moneda. IntraMed Journal [Internet]. 2019 [Citado el 02 Nov del 2019]; 2(3).
 7. Peñata A, Salazar R, Castaño T, Bustamante J, Ospina S. Diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a rifampicina con un método automatizado en tiempo real. biomédica [Internet]. 1 de abril de 2016 [Citado el 24 Feb del 2018]; 36(Sup1):78-9. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3088>.
 8. Chaves W, Buitrago J, Dueñas A, Bejarano J. Acerca de la tuberculosis extrapulmonar. Repertorio [Internet]. 1jun 2017 [Citado el 24 Nov del 2019]; 26(2):90-7. Disponible en: <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/23>.
 9. Organización Panamericana de la Salud. Coinfección TB/VIH. Guía Clínica Regional. Actualización 2017. Washington, D.C.: OPS; 2017. Disponible en: URI <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34855>.
 10. Ministerio de Salud - Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú 2015. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=599&Itemid=204.
 11. Palacios A, Luna G, Ornelas M, Herrera D, Ortiz M, Silva J. Diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar por cultivo. Neumol. cir. torax [revista en la

- Internet]. 2017 Jun [Citado el 24 de Feb del 2018]; 76(2):84-90.
Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462017000200084&lng=es.
12. Terán R, De Waard H. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. eJIFCC [Revista Electrónica]. 2015 Nov [Citado el 12 de Oct del 2019]; 26 (4):310-25. Disponible en:
<https://www.ifcc.org/media/334114/eJIFCC2015Vol26No4pp295-309.pdf>.
13. Norma Técnica de Salud Para la Atención Integral de las Personas Afectadas por Tuberculosis, 2013. NTS N° 104-MINSA/DGSP-V.01. p. 42-44.
14. Rodríguez L, Alva A, Coronel J, Caviedes L, Mendoza A, Gilman R, et al. Implementación de un sistema de telediagnóstico de tuberculosis y determinación de multidrogorresistencia basada en el método MODS en Trujillo, Perú. Rev. perú. med. exp. salud pública [Internet]. 2014 Jul [Citado el 01 de Nov del 2019]; 31(3): 445-453. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300006&lng=es.
15. Martin L, Coronel J, Faulx D, Valdez M, Metzler M, Crudder C, et al. A Field Evaluation of the Hardy TB MODS Kit™ for the Rapid Phenotypic Diagnosis of Tuberculosis and Multi-Drug Resistant Tuberculosis. PLOS ONE [Internet]. 2014 Sep [Citado el 10 de Nov del 2019]; 9(9): e107258
Disponible en:

<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0107258&type=printable>.

16. Caviedes L, Shun Lee T, Gilman R, Sheen P, Spellman E, Lee E, et al. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(3): 1203–1208.
17. Sertel D, Uzun M. The value of microscopic-observation drug susceptibility assay in the diagnosis of tuberculosis and detection of multidrug resistance. *APMIS* [Internet]. 2018 Ene [Citado el 10 de Nov del 2019]; 126 (1): 38-44. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apm.12783>.
18. Rasslan O, Hafez SF, Hashem M, Ahmed OI, Faramawy MA, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay in the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. [Internet]. 2012 Jul [Citado el 04 de Dic del 2016]; 16 (7): 941-6. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22584201>.
19. Salcedo N, Ceballos V, Guillén LE, Pimentel RD. Detección de Mycobacterium tuberculosis por observación microscópica y susceptibilidad a las drogas para el diagnóstico rápido de la tuberculosis. *VITAE* [Internet]. 2013 Ene-Mar [Citado el 23 de Nov del 2019]; (53): 1-12. Disponible en: https://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=4723&rv=106.

20. Agarwal A, Katoch CDS, Kumar M, Dhole TN, Sharma YK. Evaluación del ensayo de susceptibilidad al fármaco de observación microscópica (MODS) como una prueba rápida, sensible y económica para la detección de tuberculosis y tuberculosis resistente a múltiples fármacos. *Med J Fuerzas Armadas India*. [Internet]. 2019 Ene [Citado el 24 de Nov del 2019]; 75 (1): 58-64. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2018.03.011>.
21. Huang Z, Xiong G, Luo Q, Jiang B, Li W, Xu X, et al. Evaluation of the performance of the microscopic observation drug susceptibility assay for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in China: A preliminary study. *Respirology* [Internet]. 2014 Ene [Citado el 20 de Oct del 2019]; 19 (1): 132-7. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/resp.12192>.
22. Zadbuke SS, Set R, Khan N, Shastri J. Concurrent evaluation of microscopic observation of drug susceptibility assay for pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *J Médicos de laboratorio*. [Internet]. 2017 Abr-Jun [Citado el 24 de Nov del 2019]; 9 (2): 89-94. Disponible en: http://www.jlponline.org/temp/JLabPhysicians9289-5827305_161113.pdf.
23. Kirwan DE, Ugarte-Gil C, Gilman RH, Caviedes L, Rizvi H, Ticona E, et al. Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay for Rapid Diagnosis of Lymph Node Tuberculosis and Detection of Drug Resistance. *J Clin Microbiol*. [Internet]. 2016 Ene [Citado el 12 de Oct del 2019]; 54 (1): 185-9. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/54/1/185.full.pdf>.

24. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte II Cultivo. 2008. OPS.
25. Manual Susceptibilidad a drogas de Mycobacterium tuberculosis mediante observación microscópica (MODS) – V.01. 2011. MINSA/INS.
26. MODS EPTB SOP: Líquido Pleural, Líquido Sinovial, Líquido Pericárdico. Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.
27. MODS EPTB SOP: Biopsia. Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.
28. MODS EPTB SOP: Aspirado Ganglionar. Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.
29. MODS EPTB SOP: Líquido Céfalo Raquídeo. Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.
30. MODS EPTB SOP: Heces. Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.

31. MODS EPTB SOP: Orina. Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.
32. MODS EPTB SOP: Aspirado Nasogástrico. Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.
33. Mycobacteriology Laboratory Manual. A publication of the Global Laboratory Initiative a Working Group of the Stop TB Partnership. First Edition, April 2014. p 49-50. Disponible en: <https://www.who.int/tb/laboratory/mycobacteriology-laboratory-manual.pdf>.

V. ANEXOS

Cuadro de definición operacional de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo y escala de medición
Tipo de muestra	Muestras procedentes de órganos extrapulmonares	Las muestras extrapulmonares, son aquellas que proceden de órganos como la pleura, abdomen, meninges, ganglios linfáticos, mamas, tracto genitourinario, piel, articulaciones, huesos u otros órganos que no sean los pulmones.	Muestras líquidas: Líquido pleural, Líquido ascítico, Líquido Céfalo Raquídeo, Líquido peritoneal, etc. Secreciones: Mamaria, Ganglionar, Traqueal, de heridas y Abscesos. Muestras sólidas: Biopsias de tejidos. Otros fluidos: aspirado nasogástrico, orina y heces.	Categórica y Nominal politómica
Resultado de Cultivo líquido	Cultivo MODS	Positivo: ≥ 2 unidades formadoras de colonia (UFC) en uno o más pozos. Negativo: No crecimiento (0 UFC). Indeterminado: crecimiento de 1 UFC. Contaminado: Sobre crecimiento de bacterias /hongos.	Positivo, Negativo, Indeterminado, Contaminado	Categórica y Nominal politómica
Resultado de Cultivo sólido	Cultivo LJ	Positivo: ≥ 1 UFC en los tubos. Negativo: Sin desarrollo. Contaminado: Todos los tubos inoculados con la muestra contaminados.	Positivo, Negativo, Contaminado	Categórica y Nominal, politómica

Tiempo de desarrollo de <i>Micobacterium tuberculosis</i> (<i>M. tb</i>)	Cultivo MODS	Tiempo transcurrido desde la siembra hasta el desarrollo de colonias sugerentes del <i>M. tb</i> .	Días	Numérica, Continua de razón
	Cultivo LJ	Tiempo transcurrido desde la siembra hasta el desarrollo de colonias sugerentes del <i>M. tb</i> .	Días	Numérica, Continua de razón