

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA  
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO



FRECUENCIA DEL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR A TRAVÉS DE PRUEBAS MOLECULARES CON EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF EN PACIENTES SINTOMÁTICOS RESPIRATORIOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL ROSALES EN EL AÑO 2014.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO OPCIÓN AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO.

PRESENTADO POR:

KEVIN NICOLÁS GONZÁLEZ ORELLANA

CLAUDIA ABIGAIL LÓPEZ ANDRADE

CHRISTIAN HUMBERTO MAGAÑA GUARDADO

ASESOR:

LIC. JOSÉ ALBERTO ARGUETA.

Ciudad universitaria, junio de 2015

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR.**

INGENIERO MARIO ROBERTO NIETO LOVO.

**VICERECTOR ACADÉMICO.**

MAESTRA ANA MARÍA GLOWER DE ALVARADO.

**VICERECTOR ADMINISTRATIVO.**

MAESTRO OSCAR NOÉ NAVARRETE.

**FACULTAD DE MEDICINA.**

**DECANO.**

DOCTOR JOSÉ ARNULFO HERRERA TORRES.

**VICEDECANO.**

LICENCIADO ROBERTO ENRIQUE FONG HERNÁNDEZ.

**DIRECTORA DE LA ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA.**

LICENCIADA DALIDE RAMOS DE LINARES.

**DIRECTOR DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO.**

LICENCIADO LUIS ROBERTO PANIAGUA CASTRO.

## ÍNDICE

Contenido	Página
Introducción.....	3
Planteamiento del problema.....	4
Justificación.....	6
Objetivos.....	7
Marco teórico.....	8
Diseño metodológico.....	25
Presentación de resultados.....	26
Interpretación de resultados.....	29
Discusión de resultados.....	30
Conclusiones.....	32
Recomendaciones.....	33
Anexos.....	34
Referencias bibliográficas.....	38

## INTRODUCCIÓN

La presente investigación está referida a la frecuencia del diagnóstico de tuberculosis pulmonar a través de pruebas moleculares con el equipo GENE-XPRT MTB/RIF en pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014.

La investigación tiene el propósito de dar a conocer la importancia del uso de equipos automatizados para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, basados en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la cual multiplica una región determinada del ADN del *Mycobacterium tuberculosis* y a la vez identifica cepas sensibles o resistentes a rifampicina.

Diagnosticar rápidamente la tuberculosis pulmonar es de mucha importancia ya que representa uno de los problemas de salud pública en el mundo, afectando principalmente a países en vías de desarrollo. Múltiples factores como la pobreza, la inmunosupresión causada por el virus de la inmunodeficiencia humana y la aparición de cepas resistentes a una amplia variedad de antibióticos contribuyen a que la enfermedad persista en la población.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa asociada a factores entre los cuales se pueden mencionar la crisis económica mundial, descuido en programas de prevención y el hacinamiento en la población privada de libertad, constituyendo un gran problema de salud en El Salvador.

A lo anterior mencionado se le suma la inmunosupresión causada por el virus de inmunodeficiencia humana, hecho que ha agravado la problemática de la tuberculosis, dificultando aún más su control.

La tuberculosis es una enfermedad que afecta principalmente las vías respiratorias, pero también puede propagarse a otras partes del cuerpo. Es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, el bacilo es considerado ácido-alcohol resistente por presentar resistencia a la decoloración con alcohol ácido clorhídrico al 3% en la tinción de Ziehl-Neelsen.

El diagnóstico se inicia con un estudio bacteriológico a través del examen microscópico del esputo (baciloscopía) el cual es de mucha importancia ya que detecta la presencia del bacilo ácido-alcohol resistente.

En el hospital Nacional Rosales el diagnóstico inicial de la tuberculosis pulmonar, se hace principalmente por baciloscopía, si la baciloscopía es positiva se remite al paciente, al establecimiento de salud más cercano a su lugar de residencia, para recibir el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) ayudando a la recuperación y evitando así su posible transmisión.

En caso de sospecha de tuberculosis pulmonar en los que se necesita dar un tratamiento inmediato se procede a métodos automatizados los cuales permiten un diagnóstico rápido y específico.

Uno de estos métodos automatizados recomendados para el diagnóstico específico de tuberculosis es realizado con el equipo GENE-XPERT MTB/RIF, que se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, la cual consiste en reproducir múltiples copias de una región de ADN del *Mycobacterium tuberculosis* al usar una enzima de replicación de ADN (ADN polimerasa).

La eficiencia, de este método molecular permite que sea aplicado en diversos estudios que hacen parte de la investigación biológica básica, incluyendo el diagnóstico de enfermedades como la tuberculosis.

De allí, la inquietud de realizar un estudio, con relación a la frecuencia del diagnóstico de la tuberculosis pulmonar por medio de pruebas moleculares con el equipo GENE-XPRT MTB/RIF en los pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014.

La investigación pretende responder las siguientes interrogantes:

¿Cuál es la frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar, causados por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes o sensibles a rifampicina, detectados por el equipo GENE-XPRT MTB/RIF en los pacientes atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014?

¿Cuál es la frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar diagnosticados con el equipo GENE-XPRT MTB/RIF según sexo en los pacientes atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014?

¿Cuál es la frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar diagnosticados con los equipos GENE-XPRT MTB/RIF según muestras de esputo y lavado bronquial en los pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014?

## JUSTIFICACIÓN

Este proyecto de investigación se realizó con el fin de dar a conocer la frecuencia con la cual se diagnostica la tuberculosis pulmonar, a través del método molecular utilizado por el equipo GENE-XPRT MTB/ RIF en los pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014.

La importancia de realizar esta investigación, es porque no se tiene información actualizada sobre la frecuencia de los resultados de dicha prueba en el Hospital Nacional Rosales.

Es fundamental hacer investigaciones de este tipo para adquirir conocimientos sobre estos métodos automatizados y a la vez, lograr obtener datos acerca de la frecuencia de casos de tuberculosis pulmonar diagnosticados a través de métodos moleculares empleados por el equipo GENE-XPRT MTB/RIF en pacientes sintomáticos respiratorios del Hospital Nacional Rosales.

## OBJETIVOS

### GENERAL

- Conocer la frecuencia del diagnóstico de tuberculosis pulmonar causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes o sensibles a rifampicina, según el sexo y tipo de muestra procesada por medio del método molecular utilizado por el equipo GENE-XPRT MTB/RIF, en los pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014.

### ESPECÍFICOS

- Conocer la frecuencia de tuberculosis pulmonar causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, resistentes o sensibles a rifampicina diagnosticados con el equipo GEN-XPRT MTB/RIF en los pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014.
- Establecer la frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar, diagnosticados con el equipo GENE-XPRT/MTB RIF según sexo, en los pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014.
- Conocer la frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar diagnosticados con el equipo GEN-XPRT MTB/RIF en muestras de esputo y lavado bronquial, en los pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014.

## MARCO TEÓRICO

La tuberculosis es una enfermedad antigua que se ha reconocido en esqueletos procedentes de la edad de piedra y en los huesos de algunas de las primeras momias egipcias. Aunque la naturaleza infecciosa de la tuberculosis fue establecida por Villemin, alrededor de 1865, la índole de cambiar continuamente sus manifestaciones clínicas retardó la comprensión de la enfermedad hasta que Robert Koch descubrió el agente causal en 1882.

### **Definición de tuberculosis**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, transmisible, usualmente crónica, de presentación clínica variable, producida por *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch.

### **Características generales de las micobacterias**

Es un grupo de varias especies que conforman a la familia *Mycobacteriaceae* que se caracterizan por contener ácidos micólicos en su pared, son bacterias aeróbicas estrictas de contorno cilíndricos que no forman esporas. Algunas de ellas son patógenas para el hombre otras son oportunistas ya que solamente en circunstancias en las que se encuentra comprometido el sistema inmune producen enfermedad. La mayoría de las especies son de crecimiento lento, se necesitan semanas de incubación para observar las colonias, otras son de crecimiento rápido formando colonias en unos cuantos días.

La especie de mayor importancia clínica es *Mycobacterium tuberculosis* la cual es un bacilo delgado, recto o ligeramente curvo y con extremos redondeados. Los microorganismos poseen un ancho que varía entre 0.3-0.6 micras y un largo de 1-10 micras, la tinción de ácido alcohol resistencia de Zielh-Neelsen es útil para la coloración de estos microorganismos obtenidos de cultivo o material clínico (esputo), con esta tinción los bacilos aparecen como bastones de color rojo brillante contra un fondo azul. (DE LATINI, 2008, 28)

## **Características estructurales de *Mycobacterium tuberculosis***

Desde el punto de vista químico la pared es muy compleja y diferente de la de otros microorganismos grampositivos y gramnegativos. Contiene abundantes macromoléculas lipófilas complejas muchas de las cuales son propias de este microorganismo y muy activas desde el punto de vista microbiológico.

### **Lípidos**

*Mycobacterium tuberculosis* cuenta con varios lípidos, incluyendo ácidos micólicos, ceras y fosfátidos. En su pared celular los lípidos en gran medida están unidos a proteínas y polisacáridos. Los lípidos son responsables de alrededor del 60% del peso seco de la pared y le confieren propiedades que permiten que el microorganismo resista condiciones ambientales adversas. (JAWETZ, 2011, 289).

### **Proteínas**

Las proteínas constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente frente a la infección.

Se usan preparaciones parcialmente purificadas de estos derivados proteicos como pruebas de reactividad cutánea para determinar la exposición a *Mycobacterium tuberculosis* (MURRAY, 2006).

### **Polisacáridos**

Contiene diversos polisacáridos aunque no se ha demostrado su participación en la patogenia de la enfermedad, inducen el tipo de hipersensibilidad inmediata y pueden actuar como antígenos en reacciones con sueros de personas infectadas (JAWETZ, 2011,292).

### **Características genéticas de *Mycobacterium tuberculosis***

Su ADN está compuesto de 4 millones de pares de bases y contiene 3959 genes, de los cuales se ha caracterizado la función del 40% de ellos. Alrededor de 200 de estos genes están involucrados en la codificación de enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos.

La secuencia genómica completa de *Mycobacterium tuberculosis* fue descrita por Cole y Cols en la cepa H37Rv, suceso que proporcionó una nueva dirección a las diversas técnicas de ADN, en la detección e identificación de micobacterias y en la identificación molecular de resistencia.

### **Patogenia**

La interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con el hospedador humano comienza cuando las gotitas infecciosas de los pacientes contagiados son inhaladas por alguna persona. La mayor parte de los bacilos quedan atrapados en las vías respiratorias superiores y son expulsados por el barrido ciliar de las células de la mucosa, pero una parte de ellos por lo general menos del 10% llega hasta los alvéolos. Las micobacterias comienzan a multiplicarse dentro de los macrófagos y algunos de ellos terminan por tener una mayor capacidad de destruir al microorganismo, en tanto que otros pueden ser destruidos por él.

Después de uno a dos meses de la exposición aparecen en los pulmones las lesiones propias de la enfermedad.

*Mycobacterium tuberculosis* no produce exotoxinas ni endotoxinas, ninguna estructura aislada, antígeno o mecanismo puede explicar la virulencia del microorganismo.

Así mismo no existe una prueba simple in vitro basada en la morfología de la colonia o en diferencias serológicas que permitan distinguir un bacilo tuberculoso virulento de su variante avirulenta; sin embargo, habitualmente cierto número de propiedades se asocian con la capacidad de las cepas virulentas de

*Mycobacterium tuberculosis* para producir una enfermedad progresiva.

## **Determinantes de la patogenicidad**

### **Factor cordón**

Existe una alta correlación entre la virulencia de la cepa de bacilos tuberculosos y su aspecto morfológico en el cultivo, dónde adoptan la forma de cordones serpenteantes, constituidos por los bacilos que se disponen de manera paralela y compacta. Las formas atenuadas y a virulentas se desarrollan siguiendo un patrón aleatorio en cúmulos amontonados en forma de penachos, sin esta orientación característica. El factor cordón ataca membranas de las mitocondrias, produciendo lesión funcional a la respiración y fosforilación oxidativa.

### **Sulfátidos**

Los sulfátidos son glicolípidos localizados de forma periférica responsables de la reactividad al rojo neutro asociada a cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis*. Los sulfátidos son fagocitados con rapidez y eficiencia por los macrófagos en cultivo y desde el interior del lisosoma secundario, inhiben la fusión de estos organoides con los fagosomas, por ende dado que *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo intracelular, puede promover su propia supervivencia dentro del hospedero actuando desde el interior de los fagosomas para prevenir la formación de los fagolisosomas, con lo que evita su exposición a las hidrolasas lisosómicas. (JOKLIL, 1994, 698)

## **Manifestaciones clínicas**

La tuberculosis puede dividirse, en pulmonar, extra pulmonar o ambas. Antes de que se conociera la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) alrededor del 80% de todos los casos de tuberculosis se localizaban en los pulmones. Sin embargo hasta dos tercios de los pacientes infectados por el VIH y que enferman de tuberculosis pueden padecer una enfermedad tuberculosa

pulmonar y extra pulmonar o solo extra pulmonar. La tuberculosis pulmonar puede ser primaria o secundaria.

**Tuberculosis primaria:** Es la que aparece consecutivamente a la infección inicial por el bacilo tuberculoso. En áreas con altas tasas de transmisión de tuberculosis, esta forma de enfermedad a menudo se observa en niños.

Como la mayor parte del aire aspirado se distribuye en las zonas medias e inferior de los pulmones, estas áreas pulmonares a menudo se afectan con tuberculosis primaria. En la mayor parte de los casos la lesión cura espontáneamente y más tarde puede descubrirse por un pequeño nódulo calcificado.

En los niños y en las personas inmunodeprimidas, como en los casos de desnutrición e infección con el VIH la tuberculosis pulmonar primaria puede agravarse rápidamente y producir manifestaciones clínicas. Una manifestación frecuente es el derrame pleural que se debe a la penetración en el espacio pleural de los bacilos procedentes de un foco sub-pleural adyacente, en los casos graves, la lesión primaria aumenta pronto de tamaño, presenta necrosis en su parte central y forma pronto una cavidad (tuberculosis primaria progresiva).

**Tuberculosis secundaria:**

Llamada también tuberculosis de reactivación o de tipo adulto, la forma secundaria se debe, a la reactivación endógena de una infección tuberculosa latente y suele localizarse en los segmentos apicales y posteriores de los lóbulos superiores donde la gran concentración de oxígeno favorece el crecimiento de las micobacterias. El grado de afección parenquimatosa varía mucho, desde pequeños infiltrados hasta un proceso cavitario intenso. Al formarse las cavernas, su contenido necrótico y licuado acaba pasando a las vías respiratorias, dando lugar a lesiones parenquimatosas satélites.

### **Tuberculosis extrapulmonar:**

Los sitios donde con mayor frecuencia se localiza la tuberculosis son, por orden de frecuencia: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos y articulaciones, meninges, peritoneo, pericardio.

Pero prácticamente todos los órganos y aparatos pueden resultar afectados dada la diseminación hematógica de los individuos infectados por el VIH.

### **Tuberculosis aunada al virus de la inmunodeficiencia humana:**

La tuberculosis aparece en cualquier fase de la infección por VIH, y el cuadro inicial varía según el estadio de la enfermedad. Cuando solo hay deterioro de la inmunidad mediada por células, la tuberculosis pulmonar aparece con sus características típicas que incluye infiltrado de cavidades en los lóbulos superiores. En la etapa tardía de la infección por VIH es más frecuente observar un perfil similar a tuberculosis primaria.

## **Métodos diagnósticos de laboratorio**

### **Muestras**

**Espito:** En nuestro medio, la tuberculosis es la infección más importante causada por micobacterias. Esta infección crónica generalmente ocurre en los pulmones, por inhalación del microorganismo, por esta razón el esputo es la muestra que con mayor frecuencia se remite al laboratorio para la investigación de tuberculosis (TORRES, 1999, 203)

El primer esputo de la mañana es la muestra más adecuada para el análisis, pues está más concentrada y menos contaminada, ya que el paciente no ha comido o bebido durante la noche.

Indicar al paciente que al despertar se enjuague la boca dos veces con agua corriente; no usar pasta dental ni cualquier otro antiséptico. Acostado boca abajo en su cama, el paciente debe desgarrar esputo lo más profundamente posible, debe depositar la muestra en un recipiente estéril de boca ancha proporcionada por el laboratorio.

La cantidad adecuada para el análisis es de 5 a 10 ml de esputo, pero cualquier volumen debe procesarse. (Ver anexo 1)

### **Otros tipos de muestra**

#### **Lavado bronquial:**

Antes de tomar la muestra deben realizarse, de ser posible, baciloscopía de al menos dos muestras de esputo para intentar detectar al bacilo sin procedimientos invasivos y evitar los riesgos vinculados a este procedimiento.

La obtención de esta muestra está reservada a médicos especialistas y se deben respetar las siguientes recomendaciones.

- Tomar muestra en una sala bien ventilada y utilizando mascarillas de bioseguridad (N-95).
- Utilizar un fibrobroncoscopio esterilizado.
- Entregar al paciente un frasco para que recoja toda la expectoración que por estímulos de la fibrobroncoscopía se puede producir en las 24 horas siguientes.

El material obtenido debe ser cultivado para asegurar el mejor rendimiento posible de esta muestra de difícil obtención y para confirmar la presencia de bacilos viables en el caso de tener un resultado positivo de la baciloscopía.

**Lavado gástrico:** Frecuentemente se solicita lavado gástrico para análisis de micobacterias. Sirve para identificar micobacterias del esputo que el paciente involuntariamente se ha tragado.

Este procedimiento está indicado en los siguientes pacientes:

- Pacientes con evidencia radiológica de tuberculosis pulmonar y en quienes los exámenes de esputo son negativos.
- En pacientes que no cooperan, diciendo que no producen esputo o se lo tragan.
- Los que tiene dificultad para expectorar por diferentes trastornos, coma, enfermedad neurológica, etc.
- En los niños en los que se hace difícil obtener la muestra de esputo.

#### **Otros tipos de muestra**

- Fragmentos de pulmón
- Hisopado faríngeo
- Líquido cefalorraquídeo
- Orina
- Médula ósea

### **Procedimientos diagnósticos básicos**

#### **Baciloscopía**

La ácido-alcohol resistencia es la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared fucsina fenicada (de color fucsia) o auramina (amarillo fluorescente) y retenerla aun con la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol.

Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen en la pared celular. Así, utilizando una técnica adecuada es posible identificar al bacilo de la tuberculosis en la muestra del enfermo como un bastoncito rojo fucsia.

Esta propiedad no es específica del bacilo de la tuberculosis, sino que la tienen

todos los bacilos del género *Mycobacterium*, aun las micobacterias ambientales y otros pocos microorganismos. De todas formas, en los países de alta endemia de tuberculosis, una baciloscopía positiva en una muestra respiratoria de un paciente inmunocompetente tiene muy alto valor predictivo para el diagnóstico de tuberculosis, es decir, es muy bajo el riesgo de equivocarse al diagnosticar tuberculosis por baciloscopía.

**La baciloscopía se define como:** La ausencia o presencia de bacilos ácido alcohol resistente por campo microscópico.

#### **Tinción de Ziehl- Neelsen**

La coloración de Ziehl-Neelsen es la técnica más apropiada para ser utilizada en todos los laboratorios, ya que tiene como objetivo principal la coloración de bacilos ácido alcohol resistente. (DE LATINI, 2008, 23) (Ver anexo 2)

**Cultivo:** Es el método bacteriológico más sensible y específico para detectar la presencia de micobacterias y en particular a *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra determinada, ya sean estas pulmonares o extrapulmonares.(DE LATINI, 2008, 34)

#### **Casos en los que se indica cultivo microbiológico:**

- Pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar cuyas baciloscopías seriadas son negativas.
- Confirmación de tuberculosis extra pulmonar.
- Pacientes VIH positivos y sospechosos de tuberculosis etc.

## **Diagnóstico de tuberculosis pulmonar a través de métodos moleculares PCR (reacción en cadena de la polimerasa).**

La reacción en cadena de la polimerasa es una herramienta de biología molecular ampliamente utilizada y que permite reproducir múltiples copias de una región seleccionada de ADN, al usar una enzima ADN polimerasa. La eficiencia de este método ha hecho que sea aplicado en diversos estudios que hacen parte de la investigación biológica básica del diagnóstico de muchas enfermedades y de la genética evolutiva. La prueba de PCR fue ideada y probada por primera vez por Kary Mullis en 1983 prueba por la cual recibió el premio nobel de química en 1993.

### **Principios generales**

El principio de la PCR se basa en el hecho de que pequeñas regiones de ADN pueden ser específicamente amplificadas en grandes cantidades de manera in vitro, bajo condiciones metodológicas controladas y que a través de los años han sido modificadas y estandarizadas con el fin de optimizar la aplicabilidad de sus resultados en diferentes estudios genéticos y moleculares.

La PCR permite la síntesis específica y exponencial de una región determinada de ADN a partir de dos fragmentos de ADN específicamente diseñados los cuales hacen parte de los extremos terminales de la molécula de ADN que se desea amplificar. Las reacciones de PCR son altamente específicas, especificidad dada por la hibridación correcta de las secuencias específicas de iniciadores complementarios a la región blanco que va a ser amplificada.

Los iniciadores de la PCR incluyen secuencias de oligonucleótidos específicas, los cuales son diseñados para hibridar en cualquiera de las cadenas paralelas o anti paralelas de la región objetivo de ADN a amplificar dichas secuencias deben ser complementarias a los extremos terminales de la región de ADN.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados

(dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg<sup>+</sup>), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O destilada.

Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa. A continuación se explicarán cada uno de los puntos mencionados.

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice. La carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos.

En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco.

La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas.

- Los primers o iniciadores son secuencias de oligonucleótidos que seleccionan y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta.

Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada sentido y otra antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa.

- El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8). También se usan otros buffers de composición distinta.
- El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM.
- El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

#### **Etapas principales de la PCR:**

- Desnaturalización
- Hibridación
- Extensión

**Desnaturalización:**

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

**Hibridación:**

En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

**Extensión:**

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima Taq polimerasa es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases.

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.

### **PCR en tiempo real:**

El objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

El principio de la técnica se basa en la PCR de punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR de punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos, aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado.

Los compuestos químicos utilizados en la PCR en tiempo real, son:

- la enzima (taq polimerasa),
- dNTP's, Mg<sup>+</sup>, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados.

## **Diagnóstico de tuberculosis pulmonar con métodos moleculares con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) utilizando el equipo GENE-XPRT MTB / RIF**

### **ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

El GENE-XPRT MTB/RIF es un equipo automatizado basado en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, el cual utiliza cartuchos que puede identificar a *Mycobacterium tuberculosis* a través de la multiplicación del ADN de la bacteria y la identificación de un gen específico para determinar sensibilidad o resistencia a rifampicina. Fue desarrollado por el laboratorio del profesor David Alland en la Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey.

En diciembre de 2010, la Organización Mundial de la Salud (OMS) utilizó el equipo GENE-XPRT MTB/RIF en los países endémicos de tuberculosis y lo declaró un hito importante para el diagnóstico global de tuberculosis.

### **FUNDAMENTO DE LA PRUEBA**

El GENE-XPRT MTB/RIF detecta secuencias de ADN específicas para *Mycobacterium tuberculosis* y resistencia a la rifampicina por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR), el GENE-XPRT MTB/RIF purifica y concentra al *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de esputo o lavado bronquial, aísla material genómico de la micobacteria y posteriormente amplifica el ADN genómico por PCR.

El proceso identifica todas las mutaciones de resistencia o sensibilidad a la rifampicina, a través del gen *rpoB* en el genoma del *Mycobacterium tuberculosis*, en un ensayo de PCR en tiempo real, utilizando sondas fluorescentes, obteniendo resultados a los 120 minutos.

### **COMPONENTES DEL SISTEMA GENE-XPRT MTB/RIF**

- Módulo, el cual consta de un sistema térmico y óptico.
- Cartucho, el cual es un contenedor seguro y de un solo uso.

- Reactivos. ( Perlas enzimáticas)
- Computadora, la cual debe constar de software, código de barras, impresora.

Todos los componentes escritos son esenciales para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

#### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS POR EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF

- Se debe decontaminar la muestra de esputo e inactivarla con el reagente que proporciona la casa comercial.
- Transferir 2 ml de muestra ya decontaminada e inactivada al cartucho.
- Insertar el cartucho en el módulo o plataforma.
- En el módulo la muestra es automáticamente filtrada y lavada.
- Por sonicación generalmente ultrasonido el bacilo es capturado para liberar su ADN.
- Las moléculas de ADN liberadas se mezclan con los reactivos para realizar la PCR en tiempo real.
- La amplificación y detección en tiempo real se llevan a cabo en el cartucho.
- Una vez terminado el tiempo de reacción e identificación, la prueba puede ser impresa.

#### VENTAJA DEL USO DEL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF A TRAVÉS DE LA PRUEBA MOLECULAR PCR EN TIEMPO REAL

- Es de fácil uso.
- Proporciona una respuesta rápida.
- Proporciona resultados confiables.

## **Motivos por los que se indica la prueba con el GENE-XPRT MTB/RIF**

- Paciente sintomático respiratorio con 3 baciloscopía negativas y con tuberculosis presuntiva.
  - Persona con VIH.
  - Privados de libertad
  - Paciente sintomático respiratorio con diabetes.
  - Paciente sintomático respiratorio con inmunodeficiencias.
  - Sospecha de tuberculosis extrapulmonar.
  - Niños con sospecha de tuberculosis.
  - Personal de salud.
- (VER ANEXO 3)

## **Epidemiología de la tuberculosis**

Aunque la tuberculosis se puede producir en primates y en animales de laboratorio como los cobayos, el ser humano constituye el único reservorio natural. La enfermedad se transmite por contacto estrecho de una persona con otra mediante la inhalación de aerosoles infecciosos. Las partículas grandes quedan atrapadas en las superficies mucosas y son eliminadas por la acción de los cilios del árbol respiratorio. Sin embargo, las partículas pequeñas que contienen uno a tres bacilos tuberculosos pueden llegar hasta los alvéolos y comenzar una infección.

Según la OMS en el 2012, 8,6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,3 millones murieron por esta causa. Más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos, y esta enfermedad es una de las tres causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años.

En 2013, se estima que 530.000 niños enfermaron de tuberculosis y 74.000 niños seronegativos murieron de tuberculosis, la infección aparece en edad más temprana

en poblaciones urbanas que en las rurales y surge solo en una proporción pequeña de individuos infectados. (HARRISON, 2012, 1340).

### **Tratamiento y control**

En El Salvador se utilizan dos fármacos principales en el tratamiento primario de la tuberculosis, que son la rifampicina y la isoniazida.

Los fármacos de segunda línea son etambutol y estreptomina dichos fármacos son más tóxicos, menos eficaces y se recurre a ellos solo en circunstancias extremas. El control de la enfermedad se hace con vigilancia activa, medidas profilácticas, terapéuticas y un control exhaustivo de cada caso.

## DISEÑO METODOLÓGICO

### **Tipo de estudio**

- Sincrónico.
- Retrospectivo
- Descriptivo.
- Documental

### **Población y muestra**

Los pacientes sintomáticos respiratorios a los que se les indicó la prueba con el equipo GENE-XPRT MTB/RIF.

### **Técnicas recolección de datos**

Los datos fueron obtenidos de pacientes sintomáticos respiratorios que se les refirió la prueba GENE-XPRT MTB/RIF en el año 2014, estos datos fueron proporcionados por el área de tuberculosis del Hospital Nacional Rosales.

### **Plan de tabulación**

Los datos obtenidos se presentan a través de tablas que muestran la frecuencia con la que la tuberculosis pulmonar es diagnosticada por el método molecular que utiliza el equipo GENE-XPRT MTB/RIF, clasificada por sexo, tipo de muestra y resistencia o sensibilidad a la rifampicina.

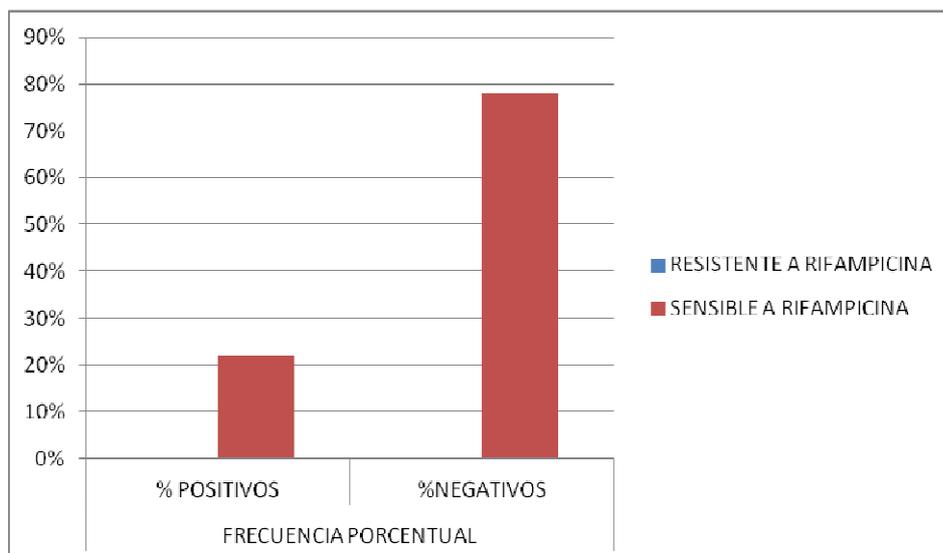
## PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

TABLA Y GRÁFICA N°1

FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS A TUBERCULOSIS PULMONAR CAUSADO POR CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES O SENSIBLES A RIFAMPICINA DETECTADOS POR EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF EN EL AÑO 2014.

RESULTADOS GENE XPRT MTB/RIF	FRECUENCIA ABSOLUTA		TOTAL DE FRECUENCIA ABS.	FRECUENCIA PORCENTUAL		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS		% POSITIVOS	%NEGATIVOS	
RESISTENTE A RIFAMPICINA	0	0	0	0%	0%	0%
SENSIBLE A RIFAMPICINA	13	47	60	22%	78%	100%

FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS A TUBERCULOSIS PULMONAR CAUSADO POR CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES O SENSIBLES A RIFAMPICINA DETECTADOS POR EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF EN EL AÑO 2014.



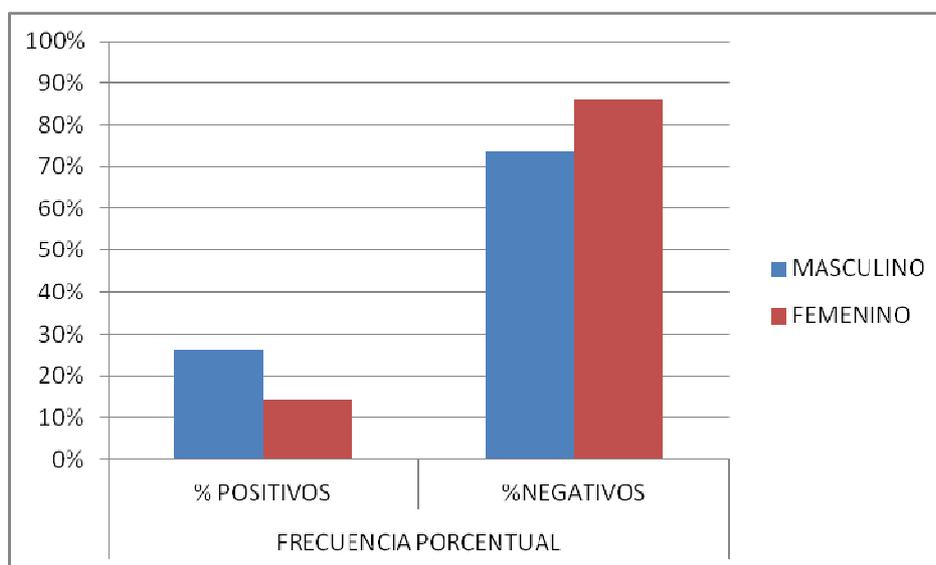
Fuente: Laboratorio clínico Hospital Nacional Rosales.

TABLA Y GRÁFICA N°2

FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS A TUBERCULOSIS PULMONAR DIAGNOSTICADOS CON EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF, SEGÚN SEXO EN LOS PACIENTES SINTOMÁTICOS RESPIRATORIOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL ROSALES EN EL AÑO 2014.

SEXO	FRECUENCIA ABSOLUTA		TOTAL DE FRECUENCIA ABS.	FRECUENCIA PORCENTUAL		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS		% POSITIVOS	%NEGATIVOS	
MASCULINO	10	29	39	26%	74%	100%
FEMENINO	3	18	21	14%	86%	100%
TOTAL	13	47	60	22%	78%	100%

FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS A TUBERCULOSIS PULMONAR DIAGNOSTICADOS CON EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF, SEGÚN SEXO EN LOS PACIENTES SINTOMÁTICOS RESPIRATORIOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL ROSALES EN EL AÑO 2014.



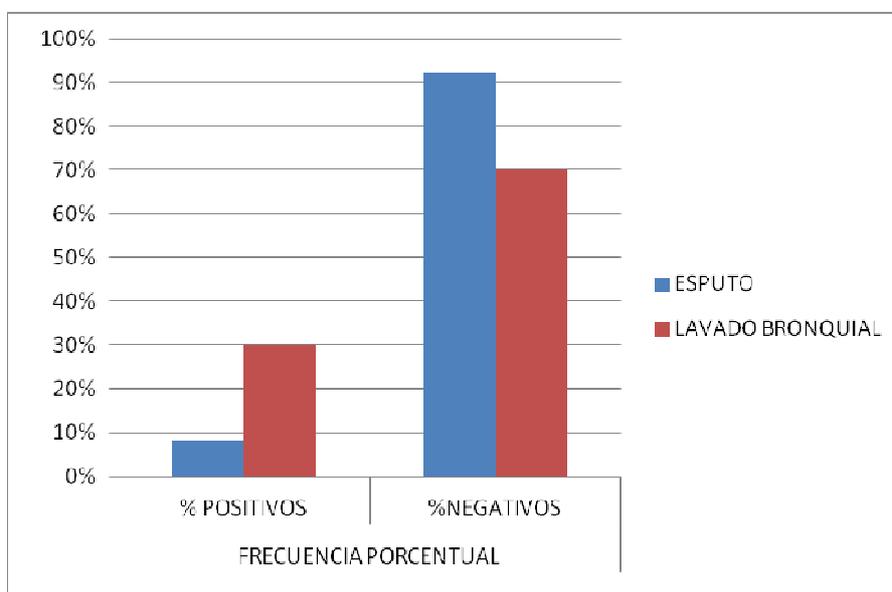
Fuente: Laboratorio clínico Hospital Nacional Rosales

### TABLA Y GRÁFICA N°3

FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS A TUBERCULOSIS PULMONAR DIAGNOSTICADOS CON EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF SEGÚN MUESTRA DE ESPUTO Y LAVADO BRONQUIAL EN PACIENTES SINTOMÁTICOS RESPIRATORIOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL ROSALES EN EL AÑO 2014.

TIPO DE MUESTRA	FRECUENCIA ABSOLUTA		TOTAL DE FRECUENCIA ABS.	FRECUENCIA PORCENTUAL		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS		% POSITIVOS	%NEGATIVOS	
ESPUTO	2	22	24	8%	92%	100%
LAVADO BRONQUIAL	11	25	36	30%	70%	100%
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>	<b>47</b>	<b>60</b>	<b>22%</b>	<b>78%</b>	<b>100%</b>

FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS A TUBERCULOSIS PULMONAR DIAGNOSTICADOS CON EL EQUIPO GENE-XPRT MTB/RIF SEGÚN MUESTRA DE ESPUTO Y LAVADO BRONQUIAL EN PACIENTES SINTOMÁTICOS RESPIRATORIOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL ROSALES EN EL AÑO 2014.



Fuente: Laboratorio clínico Hospital Nacional Rosales

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Durante el año 2014 se analizaron 60(100%) muestras a las cuales se les realizó la prueba molecular GENE-XPRT MTB/RIF, 24(40%) eran muestras de esputo y 36(60%) muestras de lavado bronquial en pacientes clasificados como sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales.

De las 60 muestras a las que se les realizó la prueba, 13(22%) resultaron positivas a *Mycobacterium tuberculosis* sensibles a rifampicina y 47(78%) resultaron negativas. (Tabla y gráfica n°1)

Al clasificar la realización de la prueba molecular GENE-XPRT MTB/RIF según sexo, de las 60 muestras de los pacientes clasificados como sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales, 39 corresponden al sexo masculino de los cuales 10(26%) resultaron positivos a *Mycobacterium tuberculosis* y 29 (74%) resultaron negativos.

En cuanto al sexo femenino que se le realizó la prueba GENE-XPRT MTB/RIF corresponde a 21 muestras, de las cuales 3(14%) resultaron positivos a *Mycobacterium tuberculosis* y 18 (86%) resultaron negativas. (Tabla y gráfica n°2)

En la clasificación según el tipo de muestra, 60 muestras de los pacientes clasificados como sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales, 24 corresponden a muestras de esputo de los cuales 2(8%) resultaron positivos a *Mycobacterium tuberculosis* y 22(92%) resultaron negativos.

De las 36 muestras de lavado bronquial 11(30%) resultaron positivas a *Mycobacterium tuberculosis* y 25(70%) resultaron negativas. (Tabla y gráfica n° 3)

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De las 60 muestras procesadas con el equipo GENE-PERT MTB/RIF de pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014, la frecuencia de muestras positivas *Mycobacterium tuberculosis* fue 13(22%) y la frecuencia de muestras negativas fue de 47(78%). De las muestras analizadas ninguna fue resistente a rifampicina.

La frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar diagnosticados con el equipo GENE-XPRT MTB/RIF según sexo en pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014, fue de 39 muestras para el sexo masculino de los cuales 10(26%) resultaron positivos y 29(74%) resultaron negativos. Con respecto al sexo femenino, de 21 muestras procesadas 3(14%) resultaron positivas y 18 (86%) resultaron negativas; según datos del año 2014 la mayor frecuencia de muestras positivas a *Mycobacterium tuberculosis* a las que se les realizó la prueba pertenecían al sexo masculino.

Según la clasificación tipo de muestras la frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar diagnosticadas con el equipo GENE-XPRT MTB/RIF en muestras de esputo fue 24 de las cuales 2(8%) resultaron positivas y 22(92%) resultaron negativas, de las 36 muestras de lavado bronquial 11(30%) resultaron positivas y 25(70%) resultaron negativas. Según los datos obtenidos en año 2014 la mayor parte de muestras positivas a *Mycobacterium tuberculosis* corresponden a lavados bronquiales.

Con los resultados obtenidos en el año 2014 por medio del método que utiliza el equipo GENE-XPRT MTB/RIF se demuestra la alta especificidad para detectar al *Mycobacterium tuberculosis*, en muestras de esputos y lavados bronquiales.

Además estudios realizados en el extranjero para evaluar la prueba GENE-XPRT MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis pulmonar y la resistencia a rifampicina demuestran la alta especificidad del método para detectar el *Mycobacterium tuberculosis*.

## CONCLUSIONES

- La frecuencia de muestras positivas a *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes atendidos en el Hospital Nacional Rosales en el año 2014 fue 13 (22%) y la frecuencia de muestras negativas fue de 47 (78%) de las muestras analizadas, positivas a *Mycobacterium tuberculosis* ninguna cepa resultó resistente a rifampicina.
- La frecuencia mayor de casos positivos a tuberculosis pulmonar en el año 2014 pertenecen al sexo masculino con relación al sexo femenino.
- La mayor frecuencia de casos positivos a tuberculosis pulmonar en el año 2014 corresponden a muestras de lavados bronquiales.

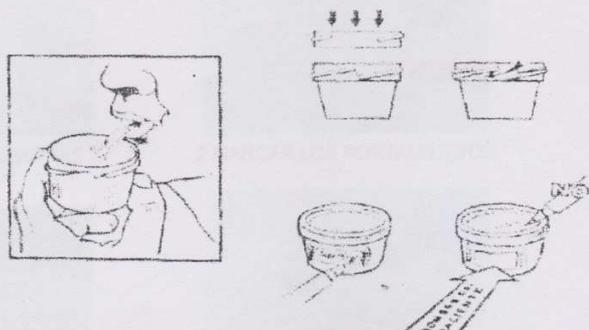
## RECOMENDACIONES

- Se recomienda al personal médico que labora en los diferentes establecimientos de salud indiquen la prueba realizada con el equipo GENE-XPERT MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.
- Se recomienda al personal médico que laboran en los diferentes establecimientos de salud tener en cuenta el tipo de muestra al momento de indicar la prueba ya que presenta más efectividad en lavados bronquiales que en esputo.
- Se recomienda al Programa Nacional de Tuberculosis capacite al personal médico, enfermeros y profesionales de laboratorio clínico sobre la prueba que realiza el GENE-XPERT MTB/RIF.

# ANEXOS

## ANEXO 1

### Toma de muestra de esputo



- La primera muestra debe ser tomada en el momento de la consulta (muestra inmediata), cuando el médico u otro personal del equipo identifica que un consultante al servicio de salud es SR (es decir, con tos persistente durante 2-3 semanas). La muestra debe ser por expectoración después de haber tosido y aclarado en fondo de la garganta; bajo la supervisión de un miembro del personal, en un lugar bien ventilado, independiente de la hora y de comida previa.
- La segunda muestra la debe recolectar el paciente en su casa por la mañana al despertar (muestra matinal).
- La tercera muestra, cuando sea requerida, puede ser tomada en el servicio de salud, cuando el paciente concurre a entregar la segunda. También puede ser recolectada por el paciente al despertar en su casa.

## ANEXO 2



Establecimiento: \_\_\_\_\_ Fecha y hora de recepción de la muestra en el laboratorio: \_\_\_\_\_  
Nombre: \_\_\_\_\_ No de Exp. \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
Procedencia: Consulta Ext. \_\_\_\_\_ Emergencia: \_\_\_\_\_ Hospitalización: \_\_\_\_\_ Otro: \_\_\_\_\_  
Sexo: M \_\_\_\_\_ F \_\_\_\_\_ Grupo de riesgo y vulnerabilidad\*: \_\_\_\_\_  
Dirección Exacta: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_  
Municipio: \_\_\_\_\_ Depto.: \_\_\_\_\_ Área: U \_\_\_\_\_ R \_\_\_\_\_  
Tipo de muestra: ESPUTO \_\_\_\_\_ OTRÁ: \_\_\_\_\_ Especificar: \_\_\_\_\_  
Fecha de Indicación: \_\_\_\_\_

\*Grupos de riesgo y vulnerabilidad: diabetes, EPOC, hipertensión, Insuficiencia Renal Crónica (IRC), VIH, inmunosuprimido; o es trabajador de salud, privado de libertad, contacto, adulto mayor, indigente, alcohólico, drogodependiente, otros.

**EXAMEN SOLICITADO**

<b>BK PARA DIAGNÓSTICO EN S.R.</b>	<b>PRUEBA XPERT MTB/RIF</b>
1ra. _____ 2da. _____ 3ra. _____	Motivo de indicación:
<b>Baciloscopia para control de tratamiento actual:</b>	1. S.R. con 3 BK(-) y con TB presuntiva _____
1ra. _____ 2da. _____	2. Persona con VIH _____
<b>Bk de control de mes:</b> 2° ◇ 4° ◇ 6° ◇	3. Privados de libertad _____
3° ◇ 5° ◇ 8° ◇ Otro ◇	4. S.R. con diabetes _____
<b>DROGAS:</b> H ◇ R ◇ Z ◇ E ◇ S ◇	5. S.R. con inmunodeficiencias _____
Observaciones _____	6. Caso TB que no negativiza al 2 ó 3 mes _____
_____	7. Retratamientos _____
_____	8. Sospecha de TB extrapulmonar _____
_____	9. Contacto de caso TB/MDR _____
	10. Niños _____
	11. Personal de salud _____
<b>CULTIVO PARA DIAGNÓSTICO:</b>	<b>CULTIVO MAS TIPIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD:</b>
1. Alta sospecha de TB. y 3 BK (-) _____	5.1 Fracaso _____
2. Tuberculosis infantil _____	5.2 Pérdida en el seguimiento _____
3. Tuberculosis extrapulmonar _____	5.3 Recaída _____
4. VIH con sospecha de TB _____	6. Contacto de caso TB/MDR _____
10. BK con 1 a 9 bacilos en 100 campos _____	7. Antecedente o estancia actual en Centro penitenciario _____
14. Pacientes con diabetes _____	8. Coinfección TB/VIH _____
<b>MEDIO DE CULTIVO:</b> Löwenstein- Jensen _____	9. No negativiza al 2 ó 3 mes de tratamiento _____
Ogawa Kudoh _____	11. Migrante nacional o extranjero _____
	12. Paciente con tto. Antituberculoso que no se mejora clínicamente, aunque sus BK de control sean neg _____
	13. Caso crónico de tuberculosis _____

**Nota: No olvide que el informe de los resultados de cultivo se dará a los 30, 45 ó 60 días y nunca antes**

Nombre y firma del solicitante: \_\_\_\_\_

Sello

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. 2013. Manual de prácticas de laboratorio. Diagnóstico Bacteriológico. Página 102.
2. GÓMEZ MARÍN JORGE ENRIQUE. 2011. Biología Molecular principios y aplicaciones. 1ª ed. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Capítulo 32. Página 342,3329.
3. JAWETZ MCLNICK Y ADELBERG. 2011. Microbiología Médica 25 ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Capítulo 23. Página 289-295.
4. JORGE IXEN HERNÁNDEZ. 2011. Detección de cepas de Mycobacterium tuberculosis con resistencia a drogas.1º edición. Colombia. Bogotá. Página 7.
5. JOKLIL WOLFGANG. 1994. Microbiología de Zinsser 20ª ed. Editorial Médica Panamericana. Capítulo 31. Página 685-698.
6. MARÍA DELFINA DE LATINI. 2008. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico para la tuberculosis normas y guías técnicas. Parte 1. 1º edición. Organización Panamericana para la Salud. Página 23.
7. PATRICK R.MURRAY.2006. Microbiología Médica 6ª edición. E sevier imprint.cap 28. Página 279-282
8. ROMERO CABELLO RAÚL. 1993. Microbiología y Parasitología Humana.1ª ed. Editorial Médica Panamericana. Capítulo 70.

9. T.R.HARRISON.2012.Harrison principios de medicina interna.18ªedicion.Mc Graw-Hill Interamericana. Editores. S.A de C.V. Página 1340-1348

10. WINN. 2008. Koneman Diagnóstico Microbiológico 6ª ed. Editorial Medica Panamericana. Página 1019-1022.

11. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL, PROGRAMA NACIONAL DE TUBERCULOSIS Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS. 2008. Manual de procedimientos para el diagnostico bacteriológico de la tuberculosis por microscopía directa. El Salvador. Página. 27-33.

12. ARGUETA, JOSÉ ALBERTO, 2013. Metodología de la investigación. Guía para abordar los problemas de salud. Ciudad universitaria, El Salvador. Página 10.