



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
BIOLOGÍA

Detección y Cuantificación de *Mycobacterium tuberculosis* con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en
Biología

Autor:

Bach. Benny Tomás Zuñe Esquén

Asesor:

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfin

Lambayeque - Perú

2022

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

Detección y Cuantificación de *Mycobacterium tuberculosis* con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020

TESIS

Para optar el Título Profesional de licenciado en: Biología

Presentado por:

Bach. Benny Tomás Zuñe Esquén

Aprobado por:

Dra. Ana María del Socorro Vásquez del Castillo


PRESIDENTA DEL JURADO

Dra. Gianina Llontop Barandiarán


SECRETARÍA

MSc. Jhon Wiston García López


VOCAL

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín


ASESOR

DEDICATORIA

*A Dios y a mi Jesús Nazareno Cautivo por
su gran amor y misericordia conmigo*

*A mis padres, Tomás y Nelly, y a mi
hermano Juan José por su dedicación y ser
mi soporte y motivación*

AGRADECIMIENTO

Siempre a Dios y a las siguientes personas

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín

Jefe del Laboratorio de Biología de Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo

Lic. Vanny Judith Soplapuco Vilchez y Bach. Yisela Vásquez Montoya

Especialista y técnica del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNPRG.

Dr. Miguel Villegas, Lic. Lucas Ascencio y Lic. Luz Fonseca.

Médico y biólogos del Hospital Regional de Lambayeque – Chiclayo

A mis padres, hermano y familiares a quienes quiero mucho.

Este trabajo fue financiado por el **CONCYTEC-PROCIENCIA** en el marco de la convocatoria Proyectos de investigación Básica 2019-01 (Convenio N° 416-2019-FONDECYT)

Índice General

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. DISEÑO TEÓRICO	16
2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	16
2.2. BASES TEÓRICAS.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO	23
3.2 TIPO DE ESTUDIOS	24
3.3. METODOLOGÍA	24
3.3.1. Flujo de trabajo.....	24
3.3.2. Procedimiento y muestras	24
3.3.3. Extracción de ADN	26
3.3.4. Cuantificación de ADN.....	27
3.3.5. Cebadores y Sondas.....	28
3.3.6. Especificidad analítica.....	29
3.3.7. PCR digital por gotas.	30
3.3.8. Sensibilidad analítica.....	34
3.4. Estadística.....	36
3.5. Consideraciones éticas.....	36
IV. RESULTADOS	38
4.1. Baciloscopia.....	38
4.2. Extracción y Cuantificación.....	39
4.3. Optimización de la PCR digital por gotas.....	40
4.3.1. Comprobación de cebadores en el NCBI	40
4.3.2. Especificidad analítica.....	40

4.3.3. Sensibilidad analítica.....	42
4.4. Cuantificación de la carga bacteriana de <i>M. tuberculosis</i>	45
4.4.1. Número de copias de IS 6110 por tipo de muestra.....	45
4.4.2. Número de copias en pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar con diferentes tipos de muestras.....	47
4.4.3. Comparación de ddPCR, Baciloscopia y Cultivo para la detección de <i>M. tuberculosis</i>	48
V. DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES.....	54
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
IX. ANEXOS.....	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Información general de los pacientes con sospecha de tuberculosis con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	25
Tabla 2. Estimación de la concentración de las diluciones seriadas.....	34
Tabla 3. Resultado de las pruebas de Baciloscopia por el tipo muestra de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	38
Tabla 4. Concentración de ADN en los diferentes tipos de muestra de los pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	39
Tabla 5. Concentración inicial estimada de la las diluciones.....	43
Tabla 6. Valores de la ddPCR de las diluciones por triplicado.....	44
Tabla 7. Número de copias de IS 6110 por la ddPCR en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	45
Tabla 8. Resultados obtenidos en la PCR digital en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	46
Tabla 9. Valor medio en copias/ μ l de los tipos de muestras detectados por la PCR digital en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	48
Tabla 10. Comparación de la Baciloscopia y la PCR digital en gotas para detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	48

Tabla 11. Estadística descriptiva de la tecnología de la PCR digital en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....49

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Tratamiento de Pre-Extracción por tipo de muestras de los pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.....	26
Cuadro 2. Secuencia del Cebador y sonda para detectar <i>M. tuberculosis</i>	28
Cuadro 3. Microorganismos usados en la especificidad analítica de los cebadores TB 2.1 y TB 3.1.....	29
Cuadro 4. Mezcla de reacción de la PCR digital por gotas de <i>M. tuberculosis</i>	31
Cuadro 5. Programa de amplificación de la PCR digital por gotas en el termociclador.....	31

Índice de Figuras

Figura 1. Flujo de trabajo desarrollado y breve explicación de cada etapa de la PCR digital por gotas	24
Figura 2A. Gráfico de amplitud de fluorescencia y nivel de fluorescencia de las gotas positivas y negativas.....	32
Figura 2B. Histograma asociado para los eventos registrados en el ensayo de ddPCR.....	32
Figura 3. Concentración de las muestras expresada en copias/ μ L	33
Figura 4. Regiones de reconocimiento de los cebadores TB2.1-F y TB3.1-R en la secuencia de inserción IS6110.....	39
Figura 5. Gel de electroforesis del producto de PCR con los cebadores TB 2.1 y TB 3.1 en diferentes microorganismos patógenos	10
Figura 6. Detección de IS6110 por PCR convencional.....	41
Figura 7. Ecuación de regresión y valor de R^2	44
Figura 8. Número medio de copias de ADN de diferentes tipos de muestras positivas detectadas en la PCR digital por gotas	47

RESUMEN

En los últimos años la detección del material genético de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ha permitido tener una mejor alternativa para el diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad. La tuberculosis extrapulmonar, que es de interés en la presente investigación, representa entre un 10 y 20% de los casos confirmados de una región determinada. Este tipo de tuberculosis presenta baja carga bacteriana (paucibacilar), por lo que dificulta su diagnóstico. Las nuevas tecnologías como la PCR digital en gotas (ddPCR) es una alternativa para la detección y cuantificación de infecciones paucibacilares. Puesto que es menos susceptible a los inhibidores de la PCR convencional. El objetivo fue detectar y cuantificar *M. tuberculosis* en muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis atendidos en el Hospital Regional Lambayeque durante el año 2020 - 2021. El estudio implicó analizar mediante la ddPCR, 50 muestras clínicas de diferente origen y con niveles bajos de ADN de *M. tuberculosis*. Anteriormente, se determinó la especificidad y sensibilidad de los cebadores en la ddPCR. Los resultados muestran que la ddPCR tiene un límite de detección de 0.8 copias/ μ L equivale a 3 genomas de la micobacteria. Se demostró que la ddPCR puede usarse para detectar niveles bajos de ADN de *M. tuberculosis* presente en pacientes de carga paucibacilar detectadas por la prueba de baciloscopia y tiene el potencial de usarse para diagnosticar y cuantificar de manera rápida todo tipo de muestras clínicas de tuberculosis extrapulmonar.

Palabras Clave: PCR digital por gotas, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis extrapulmonar, especificidad, sensibilidad, cuantificación absoluta.

ABSTRACT

In recent years, the detection of the genetic material of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR (polymerase chain reaction) has provided a better alternative for diagnosis due to its high sensitivity and specificity. Extrapulmonary tuberculosis, which is of interest in this investigation, represents between 10 and 20% of confirmed cases in a given region. This type of tuberculosis has a low bacterial load (paucibacillary), which makes its diagnosis difficult. New technologies such as digital droplet PCR (ddPCR) are an alternative for the detection and quantification of paucibacillary infections. Since it is less susceptible to conventional PCR inhibitors. The objective was to detect and quantify *M. tuberculosis* in extrapulmonary samples from patients with clinical suspicion of tuberculosis treated at the Lambayeque Regional Hospital during the year 2020 - 2021. The study involved analyzing 50 clinical samples of different origin and with low levels using ddPCR. of *M. tuberculosis* DNA. Previously, the specificity and sensitivity of primers in ddPCR was determined. The results show that ddPCR has a detection limit of 0.8 copies/ μ L, equivalent to 3 genomes of the mycobacterium. It was shown that ddPCR can be used to detect low levels of *M. tuberculosis* DNA present in patients with paucibacillary burden detected by smear microscopy testing and has the potential to be used to rapidly diagnose and quantify all types of clinical samples of extrapulmonary tuberculosis. .

Key Words: Digital droplet PCR, *Mycobacterium tuberculosis*, extrapulmonary tuberculosis, specificity, sensitivity, absolute quantification.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) presenta un cuadro clínico diverso, y cuando no es tratada oportunamente, puede llevar a la muerte al paciente. La enfermedad es causada por el microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y puede afectar a cualquier tipo de órgano, principalmente a los pulmones. La Organización mundial de la Salud (OMS) declara la tuberculosis como emergencia pública global a la tuberculosis por ser la segunda causa de muerte en el mundo, por detrás del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Anualmente, 2 millones de casos nuevos son reportados y afecta a un tercio de la población mundial. (Mandell, Bennet, y Dolin, 2011)

En el 2018, el Perú reportó a la OMS (2020) un total de 31,421 casos de tuberculosis, de los cuales 33% fueron mujeres, 62% hombres y el 5% niños (de 0 a 14 años). Del total de casos nuevos y recaídas de TB, el 81% fue de tipo pulmonar, de los cuales 77 % fueron confirmados bacteriológicamente. La tasa de letalidad de TB fue estimada en 7%.

En el 2018, la OMS indica que la tuberculosis extrapulmonar representó el 15% de los 7 millones de casos, afectando a la población del Pacífico Occidental hasta la región del Mediterráneo Oriental, con 8% y 24%, respectivamente. En los años 2013 y 2014, el Perú reportó el 18% de los casos de tuberculosis de tipo extrapulmonar (ganglionar, meníngea, intestinal, osteovertebral y otros), porcentaje promedio a los estimados a nivel mundial, que varía entre el 10 y 20% (Ministerio de Salud [MINSAL], 2016)

El diagnóstico temprano permite controlar el proceso de la enfermedad y la mitigación de sus consecuencias. Se estima que 3 millones de casos extrapulmonares no logran ser diagnosticados y la detección tardía de TB aumenta el riesgo de transmitir la enfermedad a otras personas. (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2019)

Una detección temprana, rápida y precisa de TB, requiere un sistema de laboratorio de alta calidad que utilice diagnósticos modernos (OMS, 2019; Devoshire, 2016). La baciloscopia, el cultivo y la detección del ADN de la micobacteria por PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa) son los métodos de diagnóstico directos usados en la detección de TB. Estas pruebas, muestran limitaciones en los casos donde la carga bacilar es baja, en pacientes oligosintomáticos y con TB extrapulmonar.

La naturaleza paucibacilar, la falta de volúmenes adecuados de las muestras clínicas y la distribución no uniforme de bacterias en el tejido, así como la localización de la enfermedad en sitios de difícil acceso, vuelven a la tuberculosis extrapulmonar (TBE) de difícil diagnóstico (Mehta, Raj, Singh, y Khuller, 2012). La adopción de nuevas tecnologías de diagnóstico como la PCR, con mayor sensibilidad y especificidad de diagnóstico rápido y eficaz, permite mejorar el control y a disminuir la morbilidad de la tuberculosis. (Furini et al., 2013).

La PCR digital en gotas (ddPCR) es una prueba molecular alternativa para la detección y cuantificación de microorganismos con baja carga de infección, como sucede en los casos de TB extrapulmonar. No se necesita curva estándar de calibración para cuantificar el ADN en la muestra. Esta técnica, se basa en la partición del volumen inicial de la reacción inicial de PCR en microvolumen y cada micro-partición (miles) actúa como una PCR individual, cada microgota es leída como positiva o negativa según la presencia o ausencia de micobacteria y fluorescencia emitida. La estadística de *Poisson* y la proporción de gotas positivas y gotas totales determina la concentración de ADN dentro de una muestra, expresada en unidades de copias/ μ L. Además, cada micro-partición contiene todos los componentes de una PCR individual, por lo tanto, es menos dependiente de los factores que afectan la eficiencia de amplificación, inhibidores. Esto hace la ddPCR una prueba molecular muy robusta de análisis.

El Hospital Regional de Lambayeque ubicado en la ciudad de Chiclayo según datos estadísticos sin publicar proporcionados en el 2018, atendió 160 pacientes con tuberculosis de los cuales la mitad fue de localización extrapulmonar. No obstante, en el 2019 la cifra aumentó considerablemente a 570 nuevos casos detectados, aumentando proporcionalmente la cifra de casos de localización extrapulmonar. Por ello, para el año 2020 se estimó un promedio de 120 casos de tuberculosis extrapulmonar, año de inicio del presente proyecto.

En este contexto se planteó la siguiente investigación cuyo problema fue: ¿Cuál es la frecuencia de detección y cuantificación de *Mycobacterium tuberculosis* con PCR digital en gotas de 50 muestras extrapulmonares de pacientes atendidos en el Hospital Regional de Lambayeque 2020?

El objetivo general fue: Detectar y cuantificar *M. tuberculosis* en muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis atendidos en el Hospital Regional Lambayeque durante el año 2020. Los objetivos específicos fueron: Establecer un protocolo para la extracción de ADN total a partir de muestras extrapulmonares en pacientes con sospecha clínica de tuberculosis. Desarrollar el procedimiento de PCR digital en gotas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

II. DISEÑO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Furini y colaboradores (2013) realizaron una comparación en el rendimiento de la cadena polimerasa anidada (NPCR) con las de los cultivos en la detección del complejo *M. tuberculosis*, al analizar muestras pulmonares (20) y extrapulmonares (78) de 67 pacientes hospitalizados con sospecha clínica de tuberculosis, a quienes se les realizó pruebas moleculares que detectan la secuencia IS 6110 de *M. tuberculosis*. Se usó un sistema microbiano automatizado para la identificación de *Mycobacterium* spp, en cultivos. Se encontró que el NPCR tenía una sensibilidad y especificidad de 100% y 83% respectivamente, en muestras pulmonares, en comparación en muestras extrapulmonares solamente tenía un 83% y 96% de sensibilidad y especificidad.

Devonshire et al., (2016), realizaron una investigación por medio de tres comparaciones experimentales para evaluar el desempeño de la PCR digital en la cuantificación, reproducibilidad y rendimiento de la *M. tuberculosis*. Utilizan tres tipos de materiales de referencia: fragmentos clonados en un plásmido, ADN genómico y micobacterias enteras en esputo sintético. Además, la PCR digital se compara con la qPCR en 3 laboratorios y con el método Xpert MTB/RIF en seis laboratorios. En ambos estudios se demuestran que la PCR digital es un método más preciso para la cuantificación de secuencias de ADN específicas y que puede utilizarse para evaluar métodos moleculares cuantitativos para el monitoreo del tratamiento de la TB.

Velarde (2017) analizó 236 muestras biológicas de heces de niños de 12 años del Instituto Nacional de Salud del Niño con dos métodos de extracción de ADN: FastDNA SPIN kit para suelos y el kit Chelex 100) y la técnica molecular Hemi-Nested “Semi-anidada” PCR con los cebadores: PT8, PT9 y TB290. Los resultados comparados con la prueba de referencia (cultivo microbiológico) mostraron 37,5% de sensibilidad y 100% de especificidad utilizando el kit de extracción de ADN FastDNA SPIN y 31.25% de sensibilidad y 100% de especificidad para el kit “Chelex 100” . Demostrando la estandarización de la técnica de PCR para detección de *M. tuberculosis* en muestras de heces. Tanto Furini (2013) como Velarde (2017) encuentran discordancia con las técnicas tradicionales por su baja sensibilidad y demuestra la variabilidad e importancia del

desarrollo de nuevas técnicas moleculares que ayuden al tratamiento y diagnóstico en pacientes asintomáticos y de carga paucibacilar.

Yang et al., (2017) analizaron igual número de pacientes (28) con tuberculosis pulmonar (TBP), extrapulmonar (TBPE) y saludables por la PCR tiempo real y ddPCR encontraron mayor valor de sensibilidad y especificidad en casos nuevos y de retratamiento para ddPCR. La muestra fue sangre total y se utilizó la región IS6110, marcador molecular bacteriano de *Mycobacterium tuberculosis*. El número de copias de IS6110 en las muestras de ADN fue mayor en los pacientes con TBP (201,8±40,94 copias/uL) versus los casos de TBPE (167,4±40,82 copias/uL). Además, no encuentran diferencias en el número de copias entre las muestras de seis diferentes localizaciones de la TBPE.

La importancia de detectar cargas bacterianas bajas, en diferentes etapas de la infección y la eficacia de una vacuna *in vivo* fue desarrollada por Song et al., (2018). Evalúan muestras de sangre de pacientes con tuberculosis activa procedentes de china, extrapulmonar infantil y en monos Rhesus virulentos infectados con *M. tuberculosis* en diferentes ciclos de tiempo. El método desarrollado por los autores con la PCR digital mejoró la sensibilidad de detección en comparación con la PCR tiempo real y al cuantificar el gen CFP10 (límite de detección = 1.2 copias/ul) virulento específico de *M. tuberculosis* y la secuencia Rv1768 en monos Rhesus. Además, la PCR digital podría detectar el gen y la secuencia a las tres semanas después de la infección y por lo menos dos semanas antes que la qPCR en *M. tuberculosis*.

También, la ddPCR ha sido utilizada para detectar otros microorganismos de importancia epidemiológica. Srisutham y colaboradores (2019) evaluaron la sensibilidad para detectar y cuantificar especies de *Plasmodium sp*, desarrollando dos niveles de detección específica, a nivel de género y a nivel de especie. Se utilizó el ARNr del género 18S de *Plasmodium sp*, para el cual se utilizaron cebadores y sondas específicas, se recogieron muestras de 120 pacientes con malaria del Hospital de Tailandia y de pacientes asintomáticos (N=32) de Camboya. Se identificó especies en muestras con infecciones mixtas, desarrollando una reacción duplex para detectar y cuantificar *P. falciparum/P. vivax* y *P. malariae/P. ovale*. Se encontró que utilizando un alto volumen (1ml) de muestra, la ddPCR tuvo un nivel muy bajo de detección (11 parásitos/ml) y la amplificación de cada especie de *Plasmodium* en la reacción dúplex mostró una

sensibilidad igual a la detección de una sola especie del complejo. El estudio basado en el gen 10 S del ARNr, detectado y cuantificado por PCR digital en gotas demuestra su uso como herramienta para detectar infecciones de malaria asintomáticas y de baja densidad.

Adicionalmente las secuencias IS1081 e IS6110 fueron utilizadas por Nyaruaba Raphael et al., (2020) para optimizar la prueba de PCR digital duplex por gotas en un solo canal de fluorescencia (FAM) los parámetros de temperatura de hibridación, concentración de cebadores y de sondas fueron ajustados para alcanzar 100% de sensibilidad y especificidad en muestras extrapulmonares.

Cao Ziyang et al., (2020) detectaron *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejidos tratados con formalina e incluidas en parafina (FFPE). De un total de 65 muestras fijadas, 45 pacientes fueron clasificadas como “posible tuberculosis” por la PCR tiempo real (qPCR), de las cuales 26 fueron ddPCR-positivas, 12 fueron ddPCR-negativas y 7 fueron indeterminadas. La ddPCR fue más sensible para detectar tuberculosis leve a través de muestras FFPE que la qPCR. El método ddPCR tuvo un valor adicional en el diagnóstico de TB a partir de muestras patológicas.

Cho et al (2020) utilizó la ddPCR para detectar la región IS6110, pero utilizando ADN total y ADN exosomal en 190 muestras respiratorias de pacientes con sospecha de tuberculosis. La sensibilidad y especificidad de la ddPCR con respecto al cultivo de micobacteria fue de 61.5% y 98% respectivamente usando ADN total. Y utilizando ADN exosomal fue de 76.9% sensibilidad y 98% de especificidad. Adicionalmente, obtuvo un límite de detección para la ddPCR de 2.3 copias/ μ L y un límite de 13.8 copias/ μ L para la PCR tiempo real (qPCR).

2.2. BASES TEÓRICAS

Mycobacterium tuberculosis es una micobacteria aerobia de contornos cilíndricos, no formadora de esporas, con un contenido elevado de lípidos de alto peso molecular en la pared celular. Son microorganismos ácido alcohol resistente, se observan en los tejidos como finas estructuras rectas y cilíndrica de 0,4 x 3µm aproximadamente. *M. tuberculosis* causa la tuberculosis y es un patógeno de importancia relevante para los seres humanos, ya que suele infectar personas inmunodeficientes como las que tienen SIDA (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2004).

M. tuberculosis pertenece al complejo *M. tuberculosis* que abarca a siete especies del género *Mycobacterium*, causante de la tuberculosis en seres humanos y en animales. Las especies del complejo *M. tuberculosis* comparte el 99,9% de identidad en las secuencias genómicas y probablemente evolucionaron a partir de un ancestro común. El único reservorio de la bacteria son los seres humanos, aunque varios animales son sensibles a la infección. Posee un crecimiento lento de 15 a 20 horas, comparado con el tiempo inferior de una hora de otros patógenos bacterianos, presenta una envoltura celular compleja, patogénesis intracelular y homogeneidad genética. (Mandell, Bennet, y Dolin, 2011)

El genoma de *M. tuberculosis* es la segunda secuencia bacteriana más grande disponible después de *Escherichia coli*. En 1998, se publicó el genoma completo de la cepa H37Rv con 4 411 529 pares de bases y 3974 genes (actualmente 4011), varios importantes en la patogénesis, virulencia y supervivencia de la infección. El genoma posee un contenido de 65,6% de Guanina y Citosina (G/C). *M. tuberculosis* tiene una gama de moléculas lipofílicas al poseer una elevada cantidad de genes que codifican enzimas implicada en lipogénesis y lipólisis, con aproximadamente 250 enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos (Fontalvo y Gómez, 2015).

La IS6110 es una secuencia de inserción de ADN que puede estar repetitiva hasta 16 veces en todo el genoma de *Mycobacterium sp.* Así mismo, la secuencia de inserción IS1081 está presente con seis copias. La secuencia REP13E12, familia encontrada a lo largo del genoma y presente solo en los miembros de este complejo según la Universidad Autónoma de Barcelona. Todos ellos utilizado en el estudio molecular de la tuberculosis.

El elemento de inserción 6110 (IS6110) es una secuencia promisoría para el estudio epidemiológico de la enfermedad, debido a la presencia en múltiples copias y en diferentes lugares del genoma de la bacteria. El IS6110 es una secuencia dentro del ADN, productora de polimorfismos, capaz de trasponerse a numerosos sitios, de función desconocida de las inserciones en la micobacteria, lleva secuencias que codifican la producción de proteínas esenciales para recombinaciones genéticas (Retamal, Martínez y Abalos, 2003; Capcha, Urbina, Asencios et al., 2005).

La tuberculosis extrapulmonar se establece por diseminación linfohematógena produciendo focos infecciones durante la infección primaria, con 15-20% de todos los casos a nivel mundial. Afecta frecuentemente a niños, inmunocomprometidos sobre todo en re infectados con VIH, influenciada por factores genéticos y de maduración subyacente, así como la edad y el sexo (MINSA, 2016). La tuberculosis extrapulmonar presenta dificultades en su diagnóstico por presentar una población bacilar baja (paucibacilar), una localización inaccesible en órganos y de difícil confirmación bacteriológica. Los órganos y tejidos más frecuentes son la pleural, ganglionar, linfática, urogenital, osteoarticular y meníngea. La tuberculosis pleural (Pleuresía: derrame pleural) representa el 3 al 25% de los pacientes clínicos. Se produce como una reacción de hipersensibilidad a los antígenos de la micobacteria en el espacio pleural. Suele aparecer aislada y para el diagnóstico se realiza un análisis microbiológico del líquido pleural (Ramirez-Lapausa, Menendez-Saldaña y Noguerado-Asensio, 2015).

La tuberculosis osteo-articular representa un 11%, puede afectar a cualquier hueso y a cualquier articulación, siendo las más frecuentes en cadera y rodilla. En afecciones avanzadas, destruye lentamente la articulación y produce deformidad; el diagnóstico se realiza por baciloscopia y biopsia sinovial ambas de baja sensibilidad. Por último, la tuberculosis intestinal y peritoneal compromete a cualquier parte del tracto gastrointestinal. Infección dada por *Mycobacterium bovis* por la ingesta de leche contaminada. (Ramirez-Lapausa et al., 2015). Otras afecciones como la genitourinario, cutánea y del sistema nervioso central presentan dificultades de diagnóstico de sensibilidad y especificidad en función de la localización y la carga bacteriana.

La baciloscopia es una herramienta de detección simple, barato y fácil de realizar, pero de baja sensibilidad (aprox. 10 000 bacilos/mL de muestra). El cultivo de medio es más sensible (10 a 100 bacilos/mL) tiene la desventaja el tiempo lento de crecimiento del

bacilo, que es propio de su biología; con una duración de más de tres semanas. Las nuevas técnicas basadas en la detección de material genético están siendo bastante estudiadas y mejoradas. Existe una gran cantidad de genes blancos de amplificación repetitivos, entre ellos la inserción IS6110 (Baldeviano, Luna, Cáceres & Calderon, 2007), IS1081 (Nyaruba et al, 2020) y regiones conservadas como la 16s RNA (Choi et al., 2015)

Existen dos tipos de la ddPCR, una basada en la generación de microgotas y otra en el uso de microchips. Ambas tecnologías se basan en la partición de la reacción inicial de la PCR en micro-reacciones. En la primera, las microgotas se generan en la emulsión con aceite (ddPCR); la segunda, reacciones en nanofluidos (dPCR). El incremento en el número de reacciones permite la cuantificación absoluta, sin la necesidad del uso de curva estándar. Las microreacciones facilita la concentración de todos los componentes de la PCR.

En la ddPCR existe dos plataformas de análisis, la primera que utiliza fluoróforo el EVAGREEN y la segunda, sondas marcadas con fuoróforos reporteros (FAM, ROX, VIC). Esta última plataforma es más específica y mayor costo para la prueba. Además, la ddPCR presenta mayor sensibilidad y precisión en la determinación de número de copias de ADN debido al alto número de reacciones de PCR: 20 000 (Srisutham et al., 2017).

Cada partición o microgota (mico-reacción de PCR) puede contener una molécula de ADN diana, dos secuencias, tres, cuatro o mas moléculas de ADN. La distribución de Poisson determina la distribución de estos tipos de particiones (con 1, 2, 3, 4, etc) y cada una tiene la misma chance de generar una reacción de PCR. (Majumdar, N., Wessel, T. & Marks, J, 2015).

Tomando en cuenta las particiones positivas y negativas, ajusta el número de moléculas por gotas para cuantificar el ADN blanco, dicho ajuste es utilizando la siguiente fórmula:

$$[x = -\ln(1-p)]$$

donde “x” es el promedio de microgotas con ADN blanco por particiones y “p” es la fracción de microgotas positivas sobre microgotas totales.

La cuantificación absoluta “C” de la PCR digital se basa en el número medio de las particiones positivas “x” sobre el total de particiones “v”, que es el volumen en cada partición (Jacobs, Goetghebeur & Clement, 2014).

$$C = \frac{x}{v}$$

La ddPCR se aplica para detectar ADN o ARN y secuencias de baja abundancia en las muestras (CNV), reduce la susceptibilidad de inhibidores en las reacciones de PCR o ADN de mala calidad o muy degradado (ADN de muestras arqueológicas), baja variabilidad en replicados y cuantificación absoluta (sin necesidad de curva estándar) (Hugget et al., 2013)

Nuevas tecnologías en la detección y cuantificación de todas las formas de tuberculosis proporcionan mejor información de la enfermedad para fortalecer el diagnóstico de la enfermedad en muestras paucibacilares, ofrecer tratamiento, reducir el daño y la transmisión, mejorar las estimaciones de riesgo, sobre todo en casos extrapulmonares, definir los grupos humanos más vulnerables, evaluar el patrón de transmisión, y finalmente, fortalecer los datos epidemiológicos de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo (FCCBB - UNPRG).

3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO

Población: La población del estudio estuvo constituida por pacientes con sospecha de tuberculosis y que acuden al Servicio de Consulta Externa del Hospital Regional de Lambayeque.

Muestras: Las muestras fueron colectadas teniendo en cuenta el tipo de muestreo no probabilístico intencional, para sujetos seleccionados por el médico de turno y bajo los criterios de inclusión y exclusión descritos a continuación:

I. Criterio de Inclusión:

- Paciente con sospecha clínica de tuberculosis en el cual se obtiene muestra biológica extrapulmonar para estudio de descarte de tuberculosis según protocolo del MINSA, atendidos durante el año 2020 y 2021
- Pacientes de ambos géneros y diferentes edades.
- Pacientes con resultados de baciloscopia.
- Paciente o familiar que aceptan en participar en el estudio confirmando el Consentimiento.

II. Criterios de Exclusión:

- Pacientes que niegan o retiran el Consentimiento Informado.
- Pacientes sin sospecha de tuberculosis.
- Pacientes si resultado de baciloscopia.

Se consideró un muestreo por conveniencia, puesto que no hubo interferencia de resultados en la población, en 7 pacientes se tomaron más de un tipo de muestras, analizando en total 43 pacientes. Cada paciente dio su consentimiento por escrito y firmado para usar la muestra en el presente estudio (Ver Anexo 2).

3.2 TIPO DE ESTUDIOS

El presente estudio es una investigación observacional (no experimental), descriptivo simple comparativo de naturaleza prospectiva.

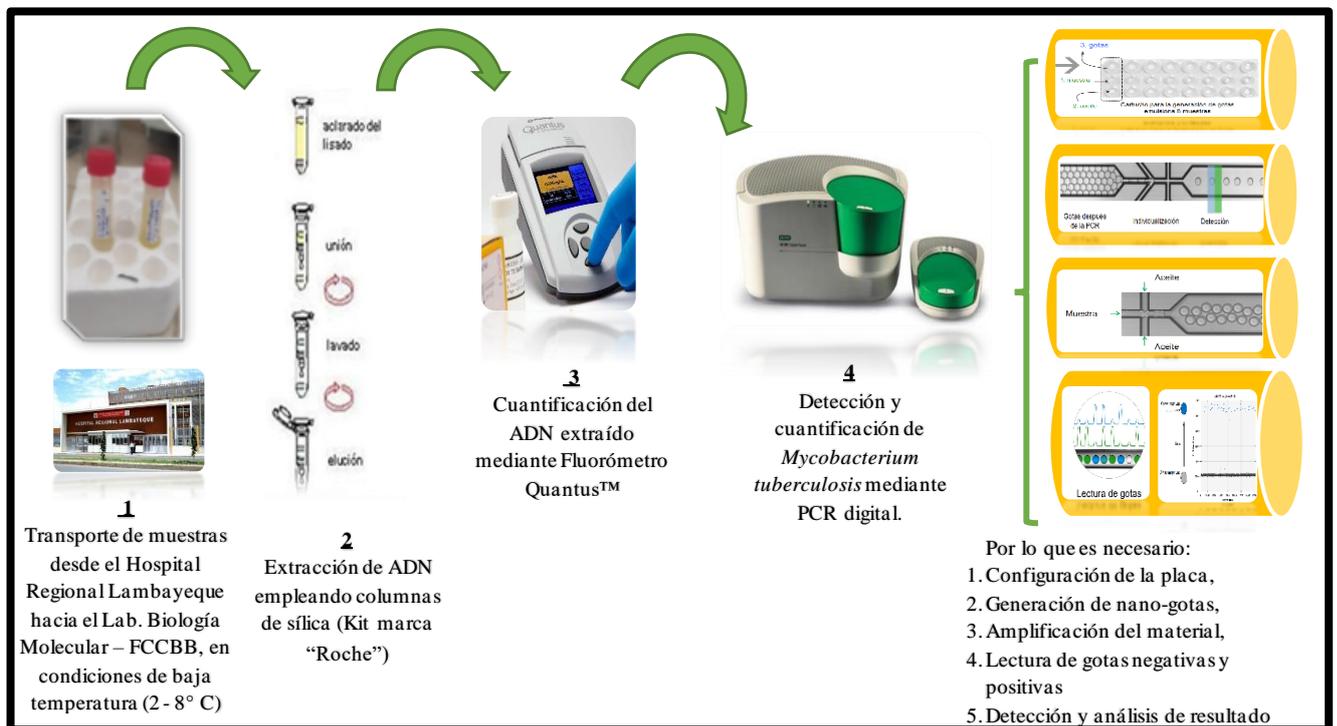
3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Flujo de trabajo

El flujo de trabajo experimental del proyecto sigue la estructura mostrada en la Figura 1. En el primer día se realizó la extracción y cuantificación del ácido nucleico y el segundo día la amplificación y análisis de la ddPCR.

Figura 1

Flujo de trabajo desarrollado y breve explicación de cada etapa de la PCR digital por gotas.



3.3.2. Procedimiento y muestras

Las muestras biológicas fueron obtenidas de los pacientes seleccionados, tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión, indicaciones y procedimientos médicos de rutina para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. Cada muestra pasó por el examen de Baciloscopia y Cultivo en el laboratorio de infectología del Hospital Regional de Lambayeque. Los tipos de muestras fueron las siguientes: heces, orina, fluidos corporales (LCR, líquido pleural, peritoneal, articular, etc.), biopsias (piel, intestino,

hueso, sinovia, etc.). Durante el transporte de las muestras se mantuvieron la cadena de frío según normativa y remitidas al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNPRG para el análisis respectivo.

La manipulación y transporte las muestras biológicas dentro y fuera del hospital (Laboratorios de Hospital Regional de Lambayeque y Laboratorio de Biología Molecular FCCBB - UNPRG) se realizó tomando en cuenta el sistema básico de triple embalaje/envasado siguiendo la norma técnica NTS N°153-MINSA/2019/INS, con estrictas normas de bioseguridad respiratoria (mascarilla N-95) y de contacto: uso de guantes y mandilones. (MINEDU, 2019).

A cada paciente se tomaron datos epidemiológicos en el formato que se presenta en el Anexo 2. Para asegurar el anonimato de los pacientes a cada una de muestras se le asignó un código en el laboratorio siguiendo una nomenclatura en concreto. Las primeras letras del código refieren al tipo de muestra, seguidas del orden de entrada, por ejemplo: LP-01: muestra procedente de líquido pleural, siendo la primera muestra en extraer. LCR-02: muestra procedente de un líquido cefalorraquídeo, siendo la segunda muestra en extraer.

La relación que muestra el nombre de cada muestra y su tipo de origen, resultados de la prueba de Baciloscopia y Cultivo aparece detallada en la Tabla del anexo 6. La tabla 1 presenta la información del sexo y tipo de muestra de cada paciente.

Tabla 1.

Información general de los pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

Variable	Número de pacientes con sospecha de tuberculosis (%)
Sexo	
Masculino	21 (48.8)
Femenino	22 (51.2)
Total	43
Edad	
Menor de 20 años	8 (18.3)
20 - 39	13 (30.2)
40 – 60	7 (16.3)
Mayor a 60 años	14 (32.6)
S/D	1(2.3)
Total	43

Nota. S/D: sin dato.

3.3.3. Extracción de ADN

Se realizó de acuerdo al método de kit de extracción “*High Pure PCR Template Preparation*” de la marca comercial Roche, protocolo modificado de acuerdo al tipo de muestra y descrito a continuación:

Cuadro 1

Tratamiento de Pre-Extracción por tipo de muestras de los pacientes con sospecha de tuberculosis con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

	Tipo de muestra (sigla)	Número de muestras (%)	Cantidad de muestra	Tratamiento de Pre-Extracción
Tejidos	Biopsia (B)	8 (16)	2 mg	Sin tratamiento
	Secreciones (S)	3(6)	10 mg	Sin tratamiento
	Heces (H)	2(4)	---	Se realizó 3 lavados con solución 20:5 TRIS-EDTA (TE)
	Orina (O)	5(10)	---	Se realizó una concentración de
Líquidos	Líquido Pleural (LP)	14(28)	---	la muestra por centrifugación y lavados con TE 20:5. De acuerdo a la cantidad de muestra en ml.
	Líquido Ascítico (LA)	8(16)	---	
	Otros líquidos biológicos	2(4)	---	
	Líquido Cefalorraquídeo (LCR)	8(16)	600-800µl	Sin tratamiento
	TOTAL	50(100)		

1a. En tejidos se tomó la muestra o 200µl del tratamiento de pre - extracción del tejido (heces) y se añadió 200µL de solución de Buffer de lisis de tejido (**Tissue Lysis buffer**)

1b. En muestras líquidas, primero se mezcló la muestra (LCR) o pretratado con 300µL de Tris-EDTA (T.E) y se dejó reposar por unos minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000rpm por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se tomó una alícuota de 200µL.

2. A seguir, se agregó 40µL de **proteínasa K** y 200µL de **Buffer de lisis**. Se incubó en baño maría a 70°C por 10 minutos.

3. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se agregó 250µL de **Isopropanol** helado y homogenizar lentamente. Se utilizaron columnas con matriz de sílica uniendo selectivamente al ADN precipitado con el isopropanol. Centrifugar a 4000 rpm durante 2 minutos.

4. Se realiza un lavado sucesivo con 500µL de **Buffer Inhibidor** y dos lavados sucesivos con 500µL de **Wash Buffer** y centrifugar por 2 minutos a 8000rpm.

5. Por último, un secado a 10000rpm por 3 minutos y se recuperó el ADN mediante un lavado con **Elution** (80µL) y centrifugar a 10000rpm por 1 minuto.

6. Se conservó la solución de ADN a -4° grados.

3.3.4. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se determinó mediante fluorimetría usando el sistema del Fluorómetro *Quantus*TM, siguiendo el protocolo detallado:

1. Preparación de buffer 1x T.E: (Calibración) Se añadió 1ml de 20x T.E buffer + 19ml de H₂O libre de nucleasas.
2. Preparación de solución de trabajo: Se agregó 10ul de dsDNA Dye + 3,990µL de 1x T.E buffer (Estable por 2h a 25°C).
3. Solución Blanco (0.5ml): Se tomó solamente 200µL solución de trabajo (se protegió de la luz con papel aluminio).
4. Standard (200ng): Se agregó 2ul DNA standard a 200µL solución de trabajo (se protegió de la luz).
5. Muestras de ADN: Se agregó 2µL de muestra a 200µL solución de trabajo (protegido de la luz) y se incubó las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Lectura: Se añadió el protocolo en el Fluorómetro (ADN), se calibró leyendo el blanco y el estándar, y se guardaron los datos en el programa y se dio lectura las muestras de ADN.

3.3.5. Cebadores y Sondas

La secuencia de los cebadores y sonda (Cuadro 2) fueron diseñados tomando en cuenta la secuencia del elemento de inserción 6110, “IS6110”, del genoma de *M. tuberculosis*.

Las secuencias de cebadores y sondas, fueron analizadas y verificadas usando software *PRIMER- BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) basados en la secuencia IS 6110 (Gen bank: AF189827.1) del genoma de *M. tuberculosis* (GenBank: AL123456.3)

Se utilizó una sonda específica de tipo hidrólisis, conocidas como sondas 5' nucleasas, marcadas con fluoróforo FAM.

Cuadro 2.

Secuencia del Cebador y Sonda para detectar M. tuberculosis.

Cebador	Secuencia 5' - 3'	Producto PCR	Temperatura de hibridación
TB 2.1 Forward:	5'-CCC GTC TAC TTG GTG TTG G- 3'		
TB 3.1 Reverse:	5'-GGA TTC TTC GGT CGT GGT C -3'	101 pb	55°C
SONDA TB 2/3	5' -/56-FAM/ AGA CGG TGC GTA AGT GGG TG/ 3BHQ_1/-3'		

Las concentraciones de los cebadores y sonda usados en las reacciones fueron previamente estandarizadas a las condiciones del laboratorio. En cada proceso de PCR se usó un control positivo (ADN extraído de cepas *Mycobacterium tuberculosis*) y un NTC “Amplification of the No Template Control” (agua químicamente pura), como control de calidad de la PCR.

3.3.6. Especificidad analítica

Para evaluar la especificidad se utilizaron muestras de varias cepas de bacterias, parásitos y ADN humano (Cuadro 3) y con cada muestra se realizó PCR convencional con los cebadores TB2.1 y TB3.1.

Cuadro 3.

Microorganismos usados en la especificidad analítica de los cebadores TB2.1 y TB3.1.

Grupo	Microorganismos
Bacterias	1. <i>Pseudomona aeuroginosa</i>
	1. <i>Bartonella sp</i>
	2. <i>Helicobacter pylori.</i>
	3. <i>Vibrio cholera</i>
	4. <i>Escherichia coli I</i>
	5. <i>E. coli II</i>
	6. <i>Bacterias Gram + I</i>
	7. <i>Bacterias Gram + II</i>
	8. <i>Bacterias Gram – I</i>
9. <i>Bacterias Gram - I</i>	
Protozooario	10. <i>Leishmania sp.</i>
Platelmintos	11. <i>Tenia sp. I</i>
	12. <i>Tenia sp. II</i>
Virus	13. <i>cDNA: Sars Cov-2</i>
Otros	14. <i>ADN humano</i>
	15. <i>Baciloscopia +</i>
	16. <i>Baciloscopia –</i>
	17. C+: Cepa de <i>M. tuberculosis</i>
	18. C-: H ₂ O de grado molecular

La especificidad se definió como la capacidad de los cebadores TB2.1 y TB3.1 de amplificar exclusivamente la secuencia de interés mediante una reacción de PCR punto final (Anexo 5). La elaboración de un gel de poliacrilamida (Anexo 6) y proceso de electroforesis para evidenciar una banda de 101pb.

3.3.7. PCR digital por gotas.

La metodología de la PCR digital en gotas (ddPCR) utiliza los mismos principios básicos de la PCR punto final y de componentes similares a la PCR tiempo real. Incorporando la generación de microgotas (partición) a partir de la mezcla final de la solución de PCR. Se generan hasta 20,000 microgotas y cada una de ellas actúa como una micro reacción de PCR individual, principal fortaleza y ventaja sobre las otras PCR's.

3.3.7.1. Amplificación

La reacción de ddPCR se realiza en un termociclador convencional, siguiendo el procedimiento que se describe brevemente:

1. En un microtubo de PCR se dispensa los componentes descritos en la tabla 6 de la PCR digital por gotas, luego se agrega 1.5µL de la muestra, sumando 20µL de reacción.
2. Luego, los 20µL del *Mix* de ddPCR se mezcla con 70µL de aceite para sonda (*Droplet generation oil for probes*) en el cartucho DG8™ para generar las microgotas.
3. La placa DG8™ se coloca en el equipo *QX200 Droplet Generator*, donde se genera las microgotas de manera automatizada. En esta etapa se combinan los 20µL del volumen de la reacción con 70µL de aceite. Cada sistema DG8™ puede generar microgotas para 8 reacciones independientes en cada proceso.
4. Las microgotas (emulsión) de cada pocillo de la placa se traspasa en la placa de PCR, la misma que se coloca en el termociclador punto final.

En la cuadro 04 y 05 se observan las concentraciones de las componentes de la PCR y condiciones de temperaturas, obteniéndose el amplificado específico con nivel de fluorescencia optimo del amplicón para detectar y cuantificar.

Finalmente, al término de la PCR, la placa fue llevada al lector gotas para la lectura de fluorescencia individual de cada microgota, en el equipo QX2000 Droplet Reader.

Cuadro 4.

Mezcla de reacción de la PCR digital por gotas de M. tuberculosis

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
<i>2x ddPCR Buffer control for probes</i>	2x	10.0	1x
Cebadores	10 uM	1.8	0.9 µM
Sonda	10 uM	0.5	0.25 µM
H₂O estéril	---	7.7	---
ADN		1.5	60 ng >
Volumen total		20	

Cuadro 5.

Programa de amplificación de la PCR digital por gotas en el termociclador.

Paso	Proceso	Temperatura	Tiempo	Rampa (C°/seg)	Número de ciclos
1	PRE-DENATURACIÓN	95°C	10'	2	1
2	DENATURACION	94°C	30''	2	} 40
3	HIBRIDACIÓN	58°C	1'	2	
4	POST-EXTENSIÓN	98°C	10'	2	1
5	CONSERVACIÓN	12°C	∞		

3.3.7.2. Lectura de la fluorescencia

Terminado el proceso de amplificación, el nivel de fluorescencia de las muestras fue cuantificada en el lector de microgotas *QX200 Droplet Reader*; previamente el equipo fue predeterminado para el canal de lectura FAM. En esta etapa, se realiza el contaje del número de microgotas positivas o negativas, según el nivel de fluorescencia alcanzado

Las microgotas clasificadas como positivas exhiben mayor nivel fluorescencia en comparación con las gotas del control negativo. Las microgotas positivas representan el número o reacciones donde la amplificación ocurre por la presencia del ADN de *M. tuberculosis*, materia de investigación. Las microgotas negativas representan aquellas que no emitieron fluorescencia por la falta del ADN blanco.

El equipo lector discrimina y contabiliza el número de gotas positivas (color azul) y negativas (sin color) para la cuantificación absoluta del ADN en la muestra. Este análisis matemático es posible con el software *QuantsoftTM*.

Configuración del software *QuantsoftTM*

El software *QuantsoftTM* versión 1.7.4.0917 instalado en el ordenador está conectado al lector de fluorescencia, el mismo que clasifica y cuenta el número de microgotas positivas y negativas.

El software presenta una interfaz de configuración que permite definir el experimento de lectura y analizar los resultados, abortar la corrida, salir del programa y opciones de mantenimiento.

El software presenta la opción **SETUP** que permite crear una nueva plantilla, luego utilizando el editor de pocillos y el editor de experimentos se ajustan los detalles del experimento.

3.3.7.3. Resultado de lectura

Terminado la lectura de cada muestra, el software muestra la estadística de los resultados en tres ventanas:

- **Tabla de resultados:** se observa la clasificación, cuantificación y umbral (*threshold*) de cada muestra.
- **Selector de pocillos:** permite seleccionar el análisis específico de cada muestra.
- **Pantalla gráfica de datos procesados:** permite visualizar los datos gráficos para dos parámetros.

Para que una reacción de ddPCR se considere válida, es necesario que el número mínimo de microgotas leídas sea 10,000. Valores por debajo de esa cifra deben ser considerada como una PCR fallida, y debe repetirse la reacción.

Luego, se analiza el gráfico de fluorescencia en 2D, donde se observan los eventos para el canal de fluorescencia FAM, el cual aparece en la *Figura 2*. El gráfico de **Amplification** (Figura 2.A) presenta la fluorescencia relativa (RFU) de cada evento

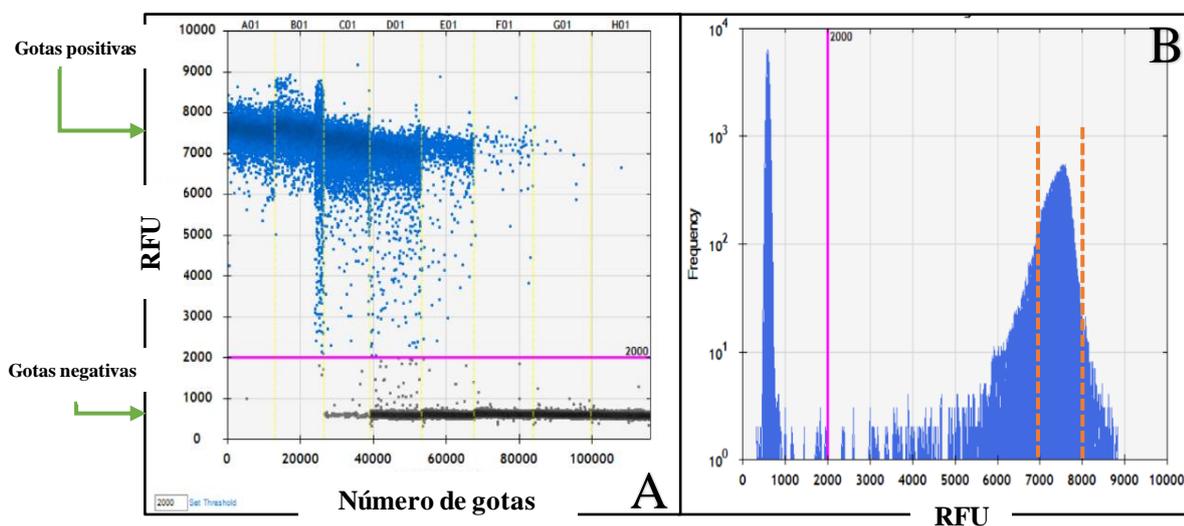
dividido en 8 columnas de la placa de PCR (A01, B01, ..., H01), cada una representa una muestra diferente respectivamente.

En la figura 2B se presenta un histograma, en donde se observa la frecuencia de microgotas con el nivel de fluorescencia (RFU) y su dispersión. La línea color rosada se refiere al umbral (*threshold*) definida manualmente para cada ensayo, significa el nivel mínimo aceptable de fluorescencia de la PCR. Las microgotas por debajo del umbral son consideradas como negativas. Las microgotas por encima del nivel *threshold* son leídas como gotas positivas.

En ambos gráficos, A y B, el umbral se estableció en 2,000 RFU (Unidad Relativa de Fluorescencia), microgotas con un nivel de fluorescencia mayor son considerado como gota positiva. En la gráfica, las microgotas más frecuentes presentan fluorescencia entre 7,000 – 8,000 RFU.

Figura 2.

A: Gráfico de amplitud de fluorescencia y nivel de fluorescencia de gotas positivas y negativas. B. Histograma asociado para los eventos registrados en el ensayo de ddPCR.

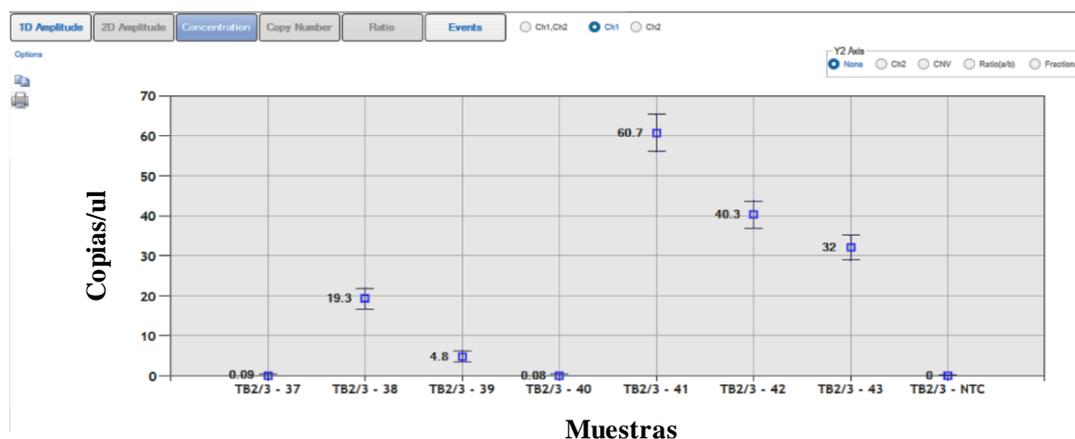


Nota: Cada gota de una muestra presenta el nivel de intensidad de fluorescencia frente al número de gotas. Todas las gotas por encima del umbral o **threshold** (2000) de color rosado son gotas positivas y a cada una se le asigna un valor de 1. Las gotas por debajo del umbral, se califican como negativas y se le asigna un valor de 0. RFU: unidad relativa de fluorescencia.

Finalmente, se abre una ventana con el gráfico que indica la concentración de la molécula de ADN blanco, en unidades de copias/ μ L (Figura 3).

Figura 3.

Concentración de las muestras expresada en copias/uL.



3.3.8. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se definió como el nivel de concentración mínima del número de copias/ μ L del genoma del *M. tuberculosis* detectado, que puede ser leídas y cuantificable mediante ddPCR en las muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha de infección por micobacterias. Consecuentemente, determina la sensibilidad analítica de la ddPCR para analizar las muestras de los pacientes.

Para estimar la sensibilidad analítica de la ddPCR se utilizaron siete diluciones seriadas, en base 10, a partir de una muestra con ADN de *M. tuberculosis* obtenida de un cultivo de micobacteria, que fue previamente inactivada y proporcionada por Laboratorio Regional de Salud de Lambayeque. La cepa presentó concentración de 8.3 ng/ μ L, la misma que fue estimada por fluorometría y estimada para el resto de las diluciones (tabla 2).

Tabla 2

Concentración estimada de ADN de M. tuberculosis de las diluciones seriadas

	Dilución	Concentración (ng/uL)
Cepa	-	8.3
1	10^{-1}	0.83
2	10^{-2}	0.083
3	10^{-3}	0.0083
4	10^{-4}	0.00083
5	10^{-5}	0.000083
6	10^{-6}	0.0000083
7	10^{-7}	0.0000083

3.3.8.1. Determinación del número de copias de la cepa de *M. tuberculosis*

Para estimar el número de copias de *M. tuberculosis* (copias de genoma por microlitro: copias/ μL) se usó la concentración de la micobacteria de cada dilución ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$) Para la cual se emplea la siguiente ecuación (Lee, C. Kim, J. Shin, SG. Hwang, S, 2006):

$$\text{DNA (\# copias)} = \frac{6.02 \times 10^{23}(\text{copias/mol}) \times \text{Cantidad de DNA(g)}}{\text{Longitud del DNA (pb)} \times 660(\text{g/mol/pb})}$$

Donde:

- 6.02×10^{23} : **Número de Avogadro** o **constante de Avogadro** y es el factor de proporcionalidad entre el número de partículas o entidades elementales (de bacteria) y la cantidad de sustancia.
- La cantidad de DNA expresada en gramos de la muestra o dilución
- La longitud del DNA medida en pares de bases del ADN de *M. tuberculosis*.
- 660g/mol/pb : factor de conversión para el DNA de cadena doble. Expresado dalton por cada par de bases y equivale a 660 Da ($\text{Da} = \text{g/mol/pb}$)

3.3.8.2. Determinación del número de copias de las diluciones en la reacción de ddPCR.

El volumen de reacción de ddPCR es $20\mu\text{L}$ y se utiliza $1.5\mu\text{L}$ de ADN en cada una, por lo tanto, es necesario estimar el número de copias del genoma para este volumen.

3.3.8.3. Establecer el límite de detección (LoD) de *M. tuberculosis* en la ddPCR

Para clasificar las muestras como positivas o negativas para TBC en pacientes con sospecha clínica es necesario precisar el límite de detección por PCR digital en gotas (LoD). El valor de LoD es el nivel más bajo de detección de la reacción de PCR. Por lo tanto, empleamos las diluciones seriadas del ADN de *M. tuberculosis*.

Para calcular el número de copias de genoma de la micobacteria de las muestras calculamos la curva de regresión lineal entre el número de copias de las diluciones (copias/ μL) y el valor de la ddPCR para cada dilución, se considera el valor promedio de las tres repeticiones.

La ecuación de regresión lineal fue descrita en Song et al (2018), como se detalla a continuación:

$$y = mx + b,$$

Donde:

- x = número de copias del genoma
- y = valor de la digital
- m = pendiente
- b = valor de intersección

En resumen, se establece la equivalencia en el número de copias y el valor de la ddPCR (genomas equivalentes).

3.4. Estadística.

Para los datos ddPCR, se usó el software de análisis Quanta software™ versión 1.7.4 (Bio-Rad) para analizar las gotas generadas y su fluorescencia. Con base en las herramientas de umbral proporcionadas por el software, se discriminaron las gotas positivas y negativas. Para cada reacción de la ddPCR, se verificó el número mínimo de gotas leídas por el equipo y debían ser mayor o igual a 10,000.

La Estadística descriptiva, las variables cuantitativas se presentarán con estadísticos de resumen como medias, desviación estándar y rangos. Las variables cualitativas se presentarán en porcentajes y mostradas en tablas de distribución de frecuencias o diagrama de barras según corresponda. Los valores de las repeticiones se expresaron en media \pm desviación estándar.

La significancia de las diferencias entre grupos de tipos de muestras se evaluó mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un valor de $p < 0.05$. La diferencia entre la baciloscopia y la ddPCR para diagnosticar casos positivos de *M. tuberculosis* se evaluó mediante la prueba de chi-cuadrado. **Software: IBM SPSS statistics 25.**

3.5. Consideraciones éticas

- Se garantiza la aplicación irrestricta de los principios bioéticos de la investigación:
- Autonomía, mediante la decisión de su participación en forma voluntaria a través de la firma del consentimiento informado, incluso firmado puede rehusar participar.

- Beneficencia, el proyecto solo incluye disponer de una fracción de la muestra tomada por indicación de su médico tratante; por lo tanto, su participación en el mismo está exento de riesgos adicionales.

- El proyecto y sus autores no tiene otro interés o motivación hacia los pacientes que no sea el científico-académico. Asimismo, no se incluye intervención adicional diferente a la que su médico tratante no haya planteado. Nos guiamos también por la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO, aprobada el 16 de octubre del 2000

- Se mantendrá la reserva y confidencialidad de la información y facilitará la oportunidad de acceso a una prueba de PCR de alto costo y difícil acceso.

IV. RESULTADOS

4.1. Baciloscopia

Se incluyeron 50 muestras en el estudio de 43 pacientes, pues algunos de ellos se le tomaron dos o más para los análisis debido a la sospecha de tuberculosis extrapulmonar durante la etapa de estudio. Del total de muestras, 22 (51.2%) provenían de mujeres; el promedio de edad en ambos sexos fue de 43 años (edad mínima: cuatro años, edad máxima: 91 años).

La tabla 10 muestra los resultados de baciloscopia realizadas en el laboratorio del Hospital regional de Lambayeque. El 8% de los pacientes analizados fueron baciloscopia positiva. La mayoría fueron de tipo orina. Las baciloscopias positivas eran de pacientes con edad de 20 a 39 años.

Tabla 3

Resultado de las pruebas de Baciloscopia por tipo de muestra de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

		PRUEBA DE BACILOSCOPIA	
		NEGATIVO	POSITIVO
Tipo de Muestra	Biopsia	6	2
	Heces	0	2
	Líquido ascítico	8	0
	LCR	8	0
	Líquido pleural	13	1
	Orina	1	4
	Secreciones	3	0
	Otros	2	0
	TOTAL	41 (82%)	9 (8%)
Sexo	Hombres	20	5
	Mujeres	21	4
	TOTAL	41	9
Edad	< 20 AÑOS	6	3
	20 - 39	10	6
	40 - 60	10	0
	> 60 AÑOS	14	0
	S/D	1	0
TOTAL	41	9	

4.2. Extracción y Cuantificación

Todas las muestras fueron procesadas y analizadas dos días después de haber sido recolectadas las muestras de los pacientes y se utilizó el Kit “*High Pure PCR template preparation*” versión: 25 de la marca “Roche” para la extracción de los ácidos nucleicos.

Las biopsias, líquido pleural y otros líquidos biológicos presentaron mayor concentración de ADN con valores de 120.5, 26.1 y 74.5 ng/μl respectivamente. Las heces, líquidos ascíticos y LCR fueron de menor concentración (Tabla 4). Así mismo, las muestras de biopsia y líquido pleural presentaron mayor variación entre ellos. Las biopsias y líquido pleural presentaron mayor desviación estándar.

Tabla 4

Concentración de ADN en los diferentes tipos de muestra de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

Tipo de Muestra	Numero de muestras (N)	Media (ng)	Rango	
			Mínimo	Máximo
BIOPSIA	8	120.50 ± 118.52	15.00	336.00
HECES	2	7.91 ± 5.79	3.81	12.00
LÍQUIDO ASCÍTICO	8	6.60 ± 7.84	0.50	23.00
LCR	8	7.97 ± 14.21	0.04	31.00
LÍQUIDO PLEURAL	14	26.11 ± 30.88	0.19	89.00
ORINA	5	6.94 ± 4.96	0.01	14.00
SECRECIONES	3	12.40 ± 3.42	9.20	16.00
OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS	2	74.50 ± 2.12	73.00	76.00
Cepa “11059”	1	8.30		
Total	50	33.66 ± 63.02		

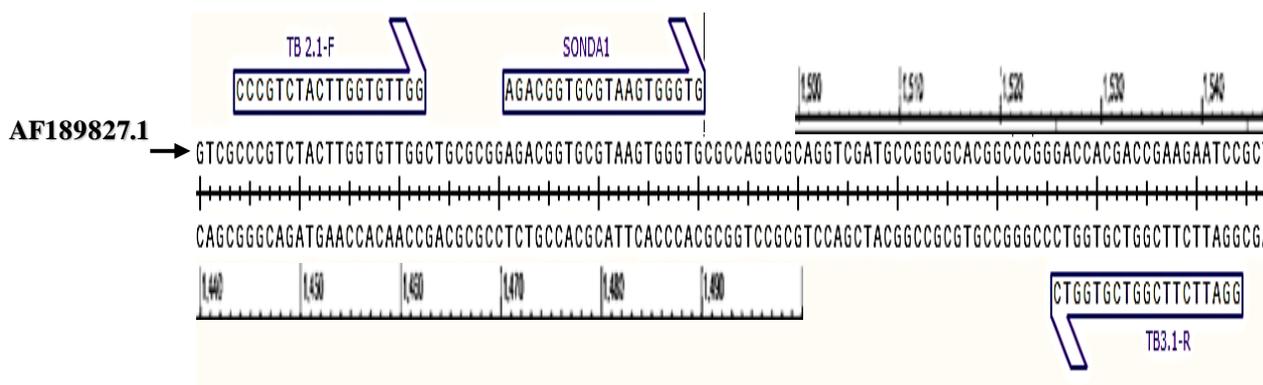
4.3. Optimización de la PCR digital por gotas

4.3.1. Comprobación de cebadores en el NCBI

Los cebadores TB 2.1-F y TB 3.1-R flanquean la secuencia de 101 pares de base (pb), comprendida entre los nucleótidos (C1444) y (C1544), de la secuencia de inserción IS6110 de 2872 pb (Gen Bank: AF189827.1).

Figura 4

Regiones de reconocimiento de los cebadores TB2.1-F y TB3.1-R en la secuencia de inserción IS6110



Nota. Las flechas azules indican las secuencias flanqueadas por los cebadores TB2.1-F: citosina 1444 – guanina 1462 (C1444 – G1462) y TB3.1-R: guanina 1526 – citosina 1544 (G1526 – C1544).

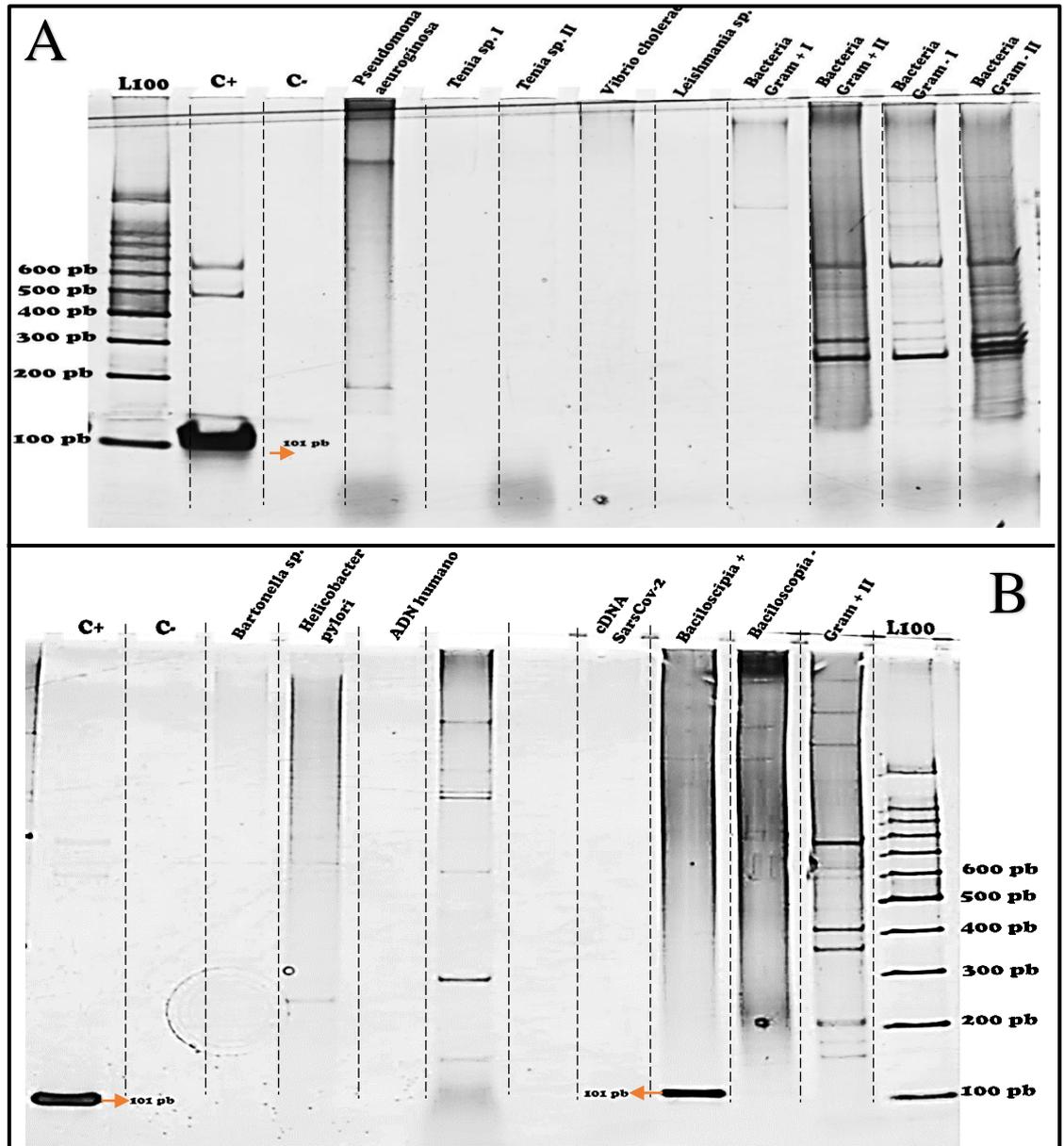
4.3.2. Especificidad analítica

4.3.2.1. PCR convencional en diferentes muestras de ADN genómico con los cebadores TB2.1 y TB 3.1.

Con el propósito de examinar la especificidad de los cebadores TB2.1 y TB3.1 se realizaron PCR convencional, usando ADN proveniente de microorganismos patógenos (Tabla 5). Solo se observó amplificación del gen de interés en las muestras que contenían ADN de *M. tuberculosis*.

Figura 5

Gel de electroforesis del producto de PCR con los cebadores TB 2.1 y TB 3.1 en diferentes microorganismos patógenos.



Nota. L100: Ladder o Marcador molecular de ADN de 100 -1000 pb, C+: control positivo, C- : control negativo.

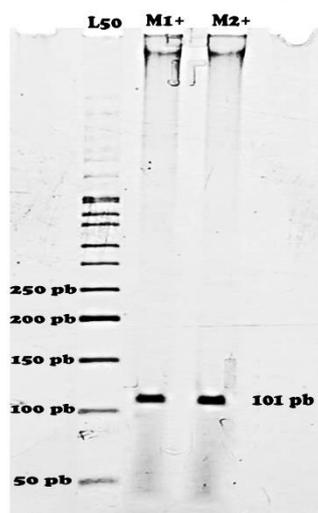
Solo se obtuvo un PCR positivo, confirmado por electroforesis con un tamaño de 101 pb en el gel de poliacrilamida en el Control positivo y la muestra de Baciloscoopia positiva.

4.3.2.2. Amplificación de un fragmento IS6110 de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*.

Mediante amplificación del ADN utilizando PCR convencional, se obtuvo un producto final de 101 pb, visualizado en un gel de poliacrilamida al 4% (Protocolo de PCR y electroforesis Anexo 4 y 5), como se observa en la *Figura 6*.

Figura 6

Detección de IS6110 por PCR convencional.



Nota. L50: Ladder o Marcador de peso molecular de ADN de 50 – 1000pb, M1+: Muestra de M. tuberculosis 1, M2+: Muestra de M. tuberculosis 2, pb: pares de bases.

4.3.3. Sensibilidad analítica

4.3.3.1. Determinación del número de copias de la cepa de *M. tuberculosis*

El número de copias del genoma de micobacterias fue determinado a partir de la concentración de las diluciones de la siguiente manera:

4.3.3.1.1. Determinación del número de copias de la cepa de micobacterias.

A partir de la concentración inicial 8.3 ng/μL de la cepa de micobacteria, se calculó el número de copias para las siete diluciones seriadas.

$$\text{DNA (\#copias)} = \frac{6.02 \times 10^{23}(\text{copias/mol}) \times \text{Cantidad de DNA(g)}}{\text{Longitud del DNA (pb)} \times 660(\text{g/mol/pb})}$$

Donde:

Cantidad de DNA de la cepa *M. tuberculosis* = 8.3 x10⁻⁹g (cepa)

Longitud del DNA = 4 x 10⁶ pb aproximadamente (Fontalvo, R. 2014)

660g/mol/pb = Factor de conversión para DNA de cadena doble.

Entonces:

$$= \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ (copias/mol)} \times 8.3 \times 10^{-9} \text{ (g)}}{4 \times 10^6 \text{ (pb)} \times 660 \text{ (g/mol/pb)}}$$

$$= 0.02 \times 10^8 \text{ copias}$$

Número de copias de ADN es 2×10^6 copias/ μl de la cepa de micobacteria

La concentración de 8.3 ng/ μl de la cepa de *M. tuberculosis* corresponde a **2×10^6 copias/ μl** de ADN de la bacteria

4.3.3.1.2. Cálculo y estimación del número de copias de las diluciones en la reacción de ddPCR.

Considerando 2×10^6 copias/ μl de micobacteria se calculó las concentraciones en las siete diluciones y tomando en cuenta el 1.5 μl de dilución que se usa para la ddPCR, como se observa en la tabla.

Tabla 5

Concentración inicial estimada de la las diluciones

	Dilución	Concentración ng/ μl	Concentración	Volumen ADN en la reacción	Número de copias de micobacteria en la dilución
Cepa	-	8.3	2×10^6 copias/ μl	} X 1.5 μl =	3×10^6 copias/ μl
1	10^{-1}	0.83	2×10^5		$3 \times 10^5 = 300\ 000$
2	10^{-2}	0.083	2×10^4		$3 \times 10^4 = 30\ 000$
3	10^{-3}	0.0083	2×10^3		$3 \times 10^3 = 3\ 000$
4	10^{-4}	0.00083	2×10^2		$3 \times 10^2 = 300$
5	10^{-5}	0.000083	2×10^1		$3 \times 10^1 = 30$
6	10^{-6}	0.0000083	2×10^0		$3 \times 10^0 = 3$
7	10^{-7}	0.00000083	2×10^{-1}	$3 \times 10^{-1} = 0.3$	

Como se esperaba. El número de copias disminuye gradualmente con los valores menores de la concentración. La muestra de ADN de la cepa presenta 3×10^6 copias/ μl (genomas).

4.3.3.2. Determinación del límite de detección (LoD) de *M. tuberculosis* en la ddPCR

Para determinar el número de microgotas positivas o negativas primero establecemos el límite de detección para ddPCR. Para la cual realizamos la ddPCR usando 1.5 μl de ADN de cada dilución y los cebadores TB 2.1 y TB 3.1. Los resultados se observan en la tabla 6.

El valor igual a 1,000,000 de gotas positivas en la ddPCR indican una sobresaturación de la reacción de PCR por exceso de ADN de la micobacteria, invalidando el resultado de la reacción. La tecnología de ddPCR está diseñado para la detección mínima concentraciones de ADN en la reacción. El exceso de la misma altera la interpretación estadística de la reacción química, no cumple la distribución de Poisson. Por lo tanto, no se toma en cuenta para fijar el LoD.

Con los resultados de la ddPCR se determinó la curva de regresión lineal como se observa en la figura 7. El valor promedio se consideró para establecer la gráfica de regresión.

La lectura de 0.8 copias/ μ l de la ddPCR equivale a tres (03) genomas de *M. tuberculosis*, aproximadamente 12.5 fg. Esto se interpreta como la sensibilidad analítica de la ddPCR es detectar hasta 3 micobacterias en las muestras extrapulmonares.

En la Figura 7, se determina la ecuación de regresión lineal igual a $R^2 = 0.998$; $y = 0.1697x + 0.7726$, ecuación que permite detectar y cuantificar el número de genomas de *M. tuberculosis* en las muestras del proyecto, usando los cebadores TB 2.1 y TB 3.1 y la sonda diseñada para esta investigación.

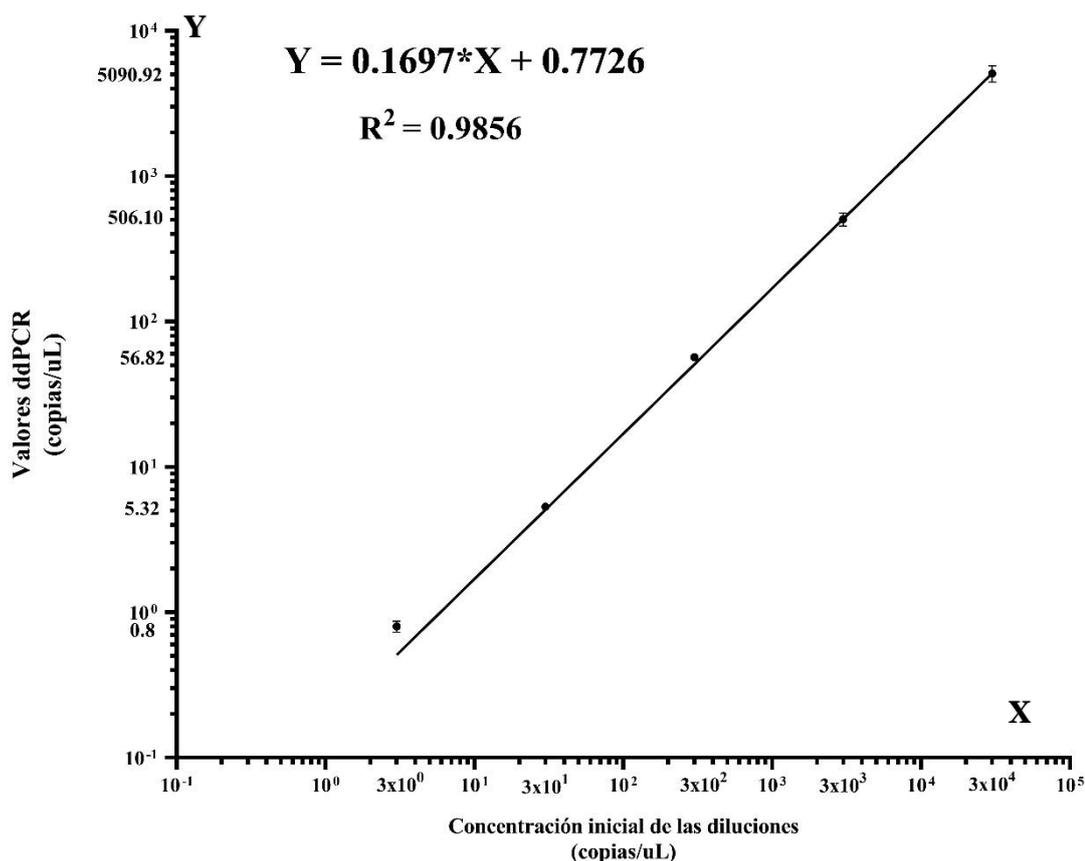
Tabla 6

Valores de la ddPCR de las diluciones por triplicado.

Dilución	Número de micobacteria (copias/ μ l)	Concentración ng/ μ l	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Concentración Promedio (copias/ μ l)
Cepa 11159	3×10^6	12.5	11159,73	1 000 000	1 000 000	-
1	3×10^5	1.25	9897,49	1 000 000	1 000 000	-
2	3×10^4	0.125	5765,34	4456,77	5050,65	5090,92 \pm 655.21
3	3×10^3	0.0125	498,00	561,65	458,64	506,10 \pm 51.98
4	3×10^2	0.00125	57,59	56,81	56,19	56,86 \pm 0.70
5	3×10^1	0.000125	5,20	5,25	5,50	5,32 \pm 0.16
6	3×10^0	0.0000125	0,74	0,78	0,88	0,80 \pm 0.07
7	3×10^{-1}	0.00000125	0	0	0	0

Figura 7

Ecuación de regresión y valor de R²



Nota. La curva de regresión lineal fue estimada entre la concentración inicial de las diluciones (3.0×10^6 a 3.0×10^{-1}) y su lectura por ddPCR.

4.4. Cuantificación de la carga bacteriana de *M. tuberculosis* en muestras clínicas mediante ddPCR de pacientes del Hospital Regional de Lambayeque.

4.4.1. Número de copias de IS 6110 por tipo de muestra.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la cuantificación de *M. tuberculosis* en las muestras extrapulmonares de los pacientes, expresada en número de copias genómicas por μ l. Las pruebas fueron realizadas por duplicados para cada muestra.

El número de copias del genoma de ADN de *M. tuberculosis* de las muestras fue estimada a partir de $x = (y - 0,7726) / 1,697$, donde y el valor obtenido por la ddPCR. Las muestras positivas para *M. tuberculosis* presentaron un número de copias del genoma mayor a 0.

Tabla 7

Número de copias de IS 6110 por la ddPCR en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

Número de muestra	Código	Número Promedio de Gotas +	PROMEDIO (ddPCR) Copias/ μ L	Número de genomas/ μ l ($x = (y - 0.77) / 0.17$)	Resultado LOD $\leq 0,8$ copias/ μ l
1	LP-01	1	0.07 \pm 0	-4.12	NEGATIVO
2	LCR-02	5	0.39 \pm 0.06	-2.25	NEGATIVO
3	B-03	2	0.17 \pm 0.01	-3.52	NEGATIVO
4	LP-04	7	0.55 \pm 0.15	-1.32	NEGATIVO
5	B-05	7	0.46 \pm 0.13	-1.84	NEGATIVO
6	LCR-06	4	0.3 \pm 0.15	-2.76	NEGATIVO
7	B-07	17	1.36 \pm 0.06	3.46	POSITIVO
8	LP-08	1	0.04 \pm 0.04	-4.30	NEGATIVO
9	LA-09	121	9.45 \pm 0.13	51.13	POSITIVO
10	LCR-10	4	0.35 \pm 0.2	-2.46	NEGATIVO
11	LP-11	1	0.09 \pm 0.09	-4.04	NEGATIVO
12	B-12	433	34.5 \pm 10.8	198.75	POSITIVO
13	LA-13	1	0.08 \pm 0	-4.07	NEGATIVO
14	LA-14	6	0.51 \pm 0.2	-1.52	NEGATIVO
15	LAR-15	12	0.92 \pm 0.32	0.88	POSITIVO
16	LP-16	25	2.01 \pm 0.05	7.29	POSITIVO
17	LA-17	336	28.95 \pm 0.15	166.04	POSITIVO
18	LP-18	167	14.65 \pm 0.35	81.78	POSITIVO
19	O-19	47	3.39 \pm 0.27	15.39	POSITIVO
20	H-20	354	38.8 \pm 7.3	224.09	POSITIVO
21	O-21	66	4.93 \pm 1.23	24.50	POSITIVO
22	LCR-22	63	5.19 \pm 0.59	26.00	POSITIVO
23	LA-23	15	1.25 \pm 0.06	2.78	POSITIVO
24	SA-24	8	0.61 \pm 0.01	-0.95	NEGATIVO
25	LCR-25	9	0.68 \pm 0.29	-0.53	NEGATIVO
26	LA-26	0	0 \pm 0	-4.55	NEGATIVO
27	B-27	2	0.12 \pm 0.04	-3.87	NEGATIVO
28	H-28	368	31.2 \pm 6.6	179.30	POSITIVO
29	LCR-29	1	0.08 \pm 0	-4.09	NEGATIVO
30	SA-30	2	0.11 \pm 0.04	-3.88	NEGATIVO
31	LA-31	1	0.07 \pm 0.07	-4.14	NEGATIVO
32	LP-32	1	0.09 \pm 0.01	-4.05	NEGATIVO
33	LP-33	310	23.65 \pm 1.55	134.81	POSITIVO
34	O-34	54	4.72 \pm 0.05	23.26	POSITIVO
35	O-35	1	0.04 \pm 0.04	-4.32	NEGATIVO
36	B-36	630	54.70 \pm 6.00	317.78	POSITIVO
37	SM-37	566	45.55 \pm 5.25	263.86	POSITIVO
38	LPE-38	402	33.65 \pm 1.65	193.74	POSITIVO
39	LP-39	23	2.04 \pm 0.22	7.44	POSITIVO
40	LP-40	68	5.74 \pm 0.11	29.24	POSITIVO
41	LP-41	5	0.41 \pm 0.09	-2.15	NEGATIVO

42	O-42	21	1.59 ± 0.45	4.82	POSITIVO
43	B-43	1380	117.5 ± 5.5	687.85	POSITIVO
44	LCR-44	4	0.27 ± 0.12	-2.98	NEGATIVO
45	B-45	2	0.11 ± 0.11	-3.93	NEGATIVO
46	LCR-46	3	0.23 ± 0.01	-3.21	NEGATIVO
47	LA-47	5	0.32 ± 0.1	-2.65	NEGATIVO
48	LP-48	3	0.25 ± 0.16	-3.09	NEGATIVO
49	LP-49	5	0.35 ± 0.08	-2.47	NEGATIVO
50	LP-50	3	0.29 ± 0.03	-2.87	NEGATIVO

Los números de copias se obtuvieron a partir del promedio de resultados de ddPCR. Los resultados de las dos pruebas repetidas para 50 muestras están altamente correlacionados ($R= 0.930$, $p<0.001$), según la correlación de Spearman.

De los 50 casos clínicos estudiados, 22 (44%) fueron detectados por la PCR digital en gotas, para la presencia de *M. tuberculosis* (Tabla 8). El número promedio de copias en las muestras positivas fue de **22.72 ± 28,70 copias/μl** y el número promedio de copias de muestras negativas fue de **0.25 ± 0,20 copias/μl**, valor inferior al límite de 0.8 copias/μl. En el grupo control blanco (NTC) encontramos que *M. tuberculosis* fue indetectable

Tabla 8

Resultados obtenidos en la PCR digital en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

	Frecuencia	Porcentaje (%)
NEGATIVO	28	56,0
POSITIVO	22	44,0
Total	50	100,0

4.4.2. Número de copias en pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar por tipo de muestras.

Los pacientes detectados con *M. tuberculosis* incluidos en nuestro estudio tuvo 8 tipos de muestras positivas.

Tabla 9

Valor medio en copias/ μ l de los tipos de muestras detectados por la PCR digital en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

	Tipo de Muestra	Media (copias/ μ l)	Mínimo	Máximo	Porcentaje (%)
1	BIOPSIA	52.01 \pm 48.88 n = 4	1.36	117.50	18.18
2	HECES	35.00 \pm 5.37 n = 2	31.20	38.80	9.10
3	LÍQUIDO PLEURAL	9.62 \pm 9.38 n = 5	2.01	23.65	22.72
4	LÍQUIDO ASCÍTICO	13.22 \pm 14.23 n = 3	1.25	28.95	13.60
5	LCR	5.19 n = 1	5.19	5.19	4.54
6	ORINA	3.66 \pm 1.54 n = 4	1.59	4.93	18.18
7	LÍQUIDO ARTICULAR	0.92 n = 1	0.92	0.92	4.50
8	LÍQUIDO PERICARDICO	33.65 n = 1	33.65	33.65	4.50
9	SECRECIONES	45.55 n = 1	45.55	45.55	4.54
	Total	22.13 \pm 28.86 n = 22	0.92	117.50	100

Nota. n = número de muestra.

4.4.3. Comparación de ddPCR, Baciloscopia y Cultivo para la detección de *M. tuberculosis*.

El valor de chi-cuadrado para la comparación de resultado de PCR digital por gotas y la baciloscopia proporcionada por el Hospital Regional de Lambayeque fue de 13.97 (Tabla 15). Esto indica que la ddPCR posee ventajas sobre la baciloscopia para detectar un bajo número de copias de ADN en muestras de diferentes orígenes de pacientes con tuberculosis extrapulmonar. La ddPCR es 2.4 veces más sensible para detectar *M. tuberculosis* en las muestras extrapulmonares.

Tabla 10

Comparación de la Baciloscopia y la PCR digital por gotas para detección de Mycobacterium tuberculosis de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

		ddPCR		Total	
		POSITIVO	NEGATIVO		
Baciloscopia	POSITIVO	9	0	9	
	NEGATIVO	13	28	41	
	Total	22	28	50	
		$\chi^2 = 13.97$	$P < 0.001$	$\chi^2 = 10.82$	$g.l = 1$
Cultivo	POSITIVO	3	0	3	
	NEGATIVO	19	28	47	
	Total	22	28	50	
		$\chi^2 = 4.0619$	$P < 0.05$	$\chi^2 = 3.84$	$g.l = 1$

Nota. χ^2 : Chi cuadrado observado; χ^2 : chi cuadrado esperado; g.l: grados de libertad

La sensibilidad y especificidad del método fueron medidas mediante la tabla de contingencia (tabla 18) el cual indica la distribución de los resultados obtenidos mediante el método de ddPCR utilizando como referencia los métodos de baciloscopia y cultivo.

Tabla 11

Estadística descriptiva de la tecnología de la PCR digital en gotas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020.

	Baciloscopia vs ddPCR	Cultivo vs ddPCR
SENSIBILIDAD	100%	100%
ESPECIFICIDAD	68.29%	59.57%
VPP	40.91%	13.64%
VPN	100%	100%
Clasificación correcta (exactitud)	0.74	0.62
Clasificación incorrecta	0.26	0.38

Nota. VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

El análisis demostró que, tomando la prueba de baciloscopia como prueba de referencia, la ddPCR obtuvo valores de 100% y 68.29% de sensibilidad y especificidad respectivamente. Considerando el cultivo como referencia fue de 100% y 59.27%. Los análisis estadísticos muestran que el método de ddPCR tiene una especificidad de 69% y 60% para los cebadores TB 2.1/ TB 3.1 que son 100% específicos. La tabla de contingencia indica que la ddPCR detecta muestras positivas de *M. tuberculosis* en aquellas reportadas como negativas por la prueba de baciloscopia y cultivo. Resultados que sugieren que la prueba molecular tendría una menor especificidad en comparación a los métodos tradicionales, por la cual se demuestra que la ddPCR, es capaz de detectar una baja carga de micobacterias respecto al cultivo y baciloscopia.

V. DISCUSIÓN

La ddPCR digital es una técnica relativamente nueva, diseñada para detectar pequeñas cantidades de ADN y de rápida cuantificación sin el uso de curva estándar. La implementación de la prueba es importante para garantizar el diagnóstico confirmativo de la tuberculosis, de manera rápida y precisa en muestras extrapulmonares.

El procedimiento de la ddPCR es similar las pruebas de PCRs, las mismas que fueron tomadas en cuenta en la estandarización del método y selección de los reactivos. En la extracción de ADN, el kit usado que permite procesar diferentes tipos de muestras extrapulmonares, con obtención de concentraciones de ácidos nucleicos deseables para la prueba de PCR (Ushio, 2016; Yang, 2017 y Luo, 2019). Las concentraciones de ADN obtenidas varían de 6,6 a 120.5 ng/ μ L (tabla 4), obteniendo resultados de ddPCR confiables, incluso con bajísima concentración de hasta 0.000125 ng.

En la literatura especializada se observa diversidad de regiones del genoma usada para la detección de *M. tuberculosis*, que van secuencias únicas, conservadas a muy repetitivas del genoma de las micobacterias; las mismas que son analizadas con distintos cebadores y sondas (cuadro 2). En este estudio se diseñó los cebadores TB 2.1-F, TB 3.1-R y la sonda TB 2/3 para amplificar 101 pb (figura 6) de la región repetitiva IS6110 (Gen Bank: AF189827.1). La sonda Tb2/3 detecta 20 pb de esta región IS6110. La especificidad de los cebadores fue verificada usando ADN de cultivo de micobacterias y analizando varias especies taxonómicas cercanas, de parásitos y ADN humano (figura 5).

La sensibilidad analítica y diagnóstica de la ddPCR es importante para su implementación como nueva prueba molecular de tuberculosis. Al respecto, se realizó siete diluciones seriadas, en base 10 de una muestra de ADN estándar de cultivo de micobacteria, y de concentración conocida (8.3 ng/ μ L; tabla 2). Luego se determinó el límite inferior de detección (por amplificación) del ADN de *Mycobacterium*, denominado como valor *LoD* (*limite of detection*, tabla 6). El valor de *LoD* para la prueba ddPCR fue de 0.80 ± 0.07 copias/ μ L, que equivale a detectar tres genomas (3×10^0) de *M. tuberculosis* en muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha de tuberculosis. Asimismo, representa de 10 microgotas positivas detectadas por ddPCR corresponden a 12.5 fentogramos de ADN.

Toda prueba molecular de diagnóstico debe previamente estandarizarlas a las condiciones de cada laboratorio antes de aplicar al análisis clínico de la enfermedad. El límite de detección estimado de la ddPCR para muestras extrapulmonares del presente estudio fue de 0.80 copias/uL, diferente a los resultados por Song et al (2018) y Cho et al (2020), que fueron 1.2 y 0.115 copias/uL.

Con relación a la cantidad de ADN detectada, usando el gen 16S ARN ribosomal y las pruebas qPCR y RT-qPCR, Choi et al (2015), detectan entre 10,000 a 100 fentogramos de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*, en muestras extrapulmonares. Los resultados obtenidos en el presente estudio con ddPCR alcanzar detectar hasta 12.5 fentogramos. Mostramos mayor sensible respecto a la qPCR en la detección de *M. tuberculosis*, entre 10 000 y 10 veces más respectivamente.

La optimización de la reacción de ddPCR es muy importante para una clara separación del nivel de fluorescencias de las gotas positivas y negativas en la prueba diagnóstica. Al respecto, Nyaruaba et al (2020) analiza varios factores que pueden alterar la reacción química, citando la elección de la región del genoma a detectar, concentración de los cebadores y sonda, concentración de ADN de la muestra, entre otras como principales factores que deben estandarizarse en la prueba. Concentraciones de ADN por encima de 60 ng/ μ L, sobresatura la reacción química de la PCR digital, obteniendo lecturas hasta 1000 000 copias/ μ L positivas. Resultados similares que obtuvimos en la estandarización química de la ddPCR, cuyo valor que carece de interpretación diagnóstica. A la concentración de 0.125 ng/ μ L encontramos lecturas de 5,090.9 copias/ μ L de gotas positiva. Concentraciones mayores a 1.25 ng/ μ L dan lecturas alrededor de 10^6 copias/ μ L (tabla 13).

Considerando como valor del LoD igual a 0.80, obtuvimos que 22 muestras fueron positivas para *M. tuberculosis*, representando 44% de positividad. La presencia de 10 o más gotas positivas por ddPCR en la reacción de la ddPCR debe ser considerar como un caso positivo para *Mycobacterium tuberculosis*. En el trabajo de Cao et al (2020), toma en cuenta los valores de 1 y 2 gotas positivas como resultado indeterminado o no definido, sustentando con los resultados de baciloscopia, histología y PCR tiempo real positivo. Es necesario determinado los valores críticos para aquellas muestras con valores de ddPCR muy próximo a 0.80 copias/ μ L (muestras LAR-15), análisis que no fue considerado en el presente estudio. Análisis de un mayor número de muestras clínicas, permitirán establecer

un rango intermedio, entre los resultados positivos y negativos como casos indeterminados que puede estar entre los límites de 3 a 9 gotas positivas para ddPCR.

Al comparar los resultados de la ddPCR con las pruebas convencionales se encontró que 41 muestras negativas por baciloscopia 13 fueron positivas (32%) y de las 47 muestras negativas por cultivo 19 fueron positivas (40%). En ambos análisis, la ddPCR presentaron mayor eficiencia en la detección de micobacterias en muestra extrapulmonares y concordante con los estudios publicados por Cao et al., (2020), Devonshire et al., (2016), Song et al., (2018).

La carga bacteriana no se relaciona directamente con el tipo de muestra extrapulmonar o la cantidad de ADN extraído de la muestra o el tipo de tuberculosis. Al respecto, las muestras con mayor concentración de ácidos nucleicos no siempre presentan mayor número de copias de micobacterias. Mediante la técnica de extracción se extrae la totalidad de ADN, incluyendo de las micobacterias (tablas 4). Cuando agrupamos y comparamos el tipo de tuberculosis y la concentración de ADN, los resultados obtenidos de las muestras presentan menor concentración de ADN respecto al reportado por Yang et al (2017).

VI. CONCLUSIONES

- De los 50 casos clínicos estudiados, 22 (44%) fueron detectados por la PCR digital en gotas, para la presencia de *M. tuberculosis* (Tabla 8) y se cuantificó el número promedio de copias en las muestras positivas con un valor de $22.72 \pm 28,70$ copias/ μ l y el número promedio de copias de muestras negativas fue de $0.25 \pm 0,20$ copias/ μ l, valor inferior al límite de 0.8 copias/ μ l

- Se estableció 02 protocolos de extracción y purificación de ácidos nucleicos según el origen y tipo de muestra: 1. Muestras líquidas y 2. Tejidos biológicos. Las muestras de biopsia obtuvieron el valor promedio más alto de concentración de ADN con $120,500 \pm 118,518$ ng/uL y la concentración más baja fue del tipo de muestra Orina $6,943 \pm 4,959$ ng/uL.

- Se estandarizó y se desarrolló un protocolo para detectar *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar usando la técnica de PCR digital en gotas utilizando sondas. El límite de detección de la ddPCR con los cebadores TB2.1 y TB 3.1 utilizando la sonda TB 2/3 fue de 0.8 copias/ μ L equivalente a tres genomas (12.5 fg) de la micobacteria. La sensibilidad de la prueba permitió aumentar la positividad de las muestras estudiadas por baciloscopia y cultivo de 18% y 6% respectivamente a 44% por ddPCR. Estos bajos valores se deben que la ddPCR detecta niveles bajos de carga bacteriana.

- Se determinó que un ensayo de ddCPR dirigido a la secuencia IS6110 es una prueba rápida y precisa para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. Es más sensible que las pruebas rutinarias de baciloscopia y tiene un potencial considerable para mejorar el diagnóstico y tratamiento.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio con una mayor cantidad de población y de muestras; así como revisar factores que demuestren el uso amplio de la PCR digital por gotas, de esta forma se podría establecer un nivel indeterminado, entre muestras positivas y negativas, la cual estaría por debajo del límite de detección (10 gotas) y por encima de las 2 gotas positivas leídas por la ddPCR.

- Calcular y medir la calidad de ADN extraído para optimizar los resultados de la PCR digital.

- Realizar un gradiente de Temperatura de hibridación y un gradiente de concentración de primer´s y sondas y establecer las condiciones óptimas para una mejor amplificación.

- Evaluar los costos para viabilizar el uso de la PCR digital como medio de diagnóstico, en todos los pacientes con sospecha de Tuberculosis extrapulmonar.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldeviano, V. C. Luna, C. C. Cáceres, T. Calderón, E. R. (2007) Detección sensible y específica de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras clínicas, mediante la amplificación de un elemento repetitivo de la familia REP13E12. Rev. perú. med. exp. salud pública. Ene [citado 2020 Feb 11]; 24(1): 5-12. Disponible en: "http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342007000100002&lng=es"http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342007000100002&lng=es.
- Barron, H. Monteghirfo, M. Rivera, N. (2006). Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. Lima, Perú. Pags. 11 - 18 Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v67n1/a03v67n1>
- Capcha, L. Urbina, M. Vásquez, L. Asencios, L. Quispe T. et al. (2005) Perfiles genéticos (IS6110) y patrones de resistencia en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. Lima Sur, Perú. Rev. perú. med. exp. salud publica; 22(1):4-11. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000100002&lng=es
- Cao, Z., Wu, W., Wei, H., Gao, C., Zhang, L., Wu, C. y Hou, L. (2020). Uso de PCR digital de gotitas en la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras FFPE. Revista Internacional de Enfermedades Infecciosas , 99 , 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.045>
- Cho, S. M., Shin, S., Kim, Y., Song, W., Hong, S. G., Jeong, S. H., Kang, M. S., & Lee, K. A. (2020). A novel approach for tuberculosis diagnosis using exosomal DNA and droplet digital PCR. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 26(7), 942.e1–942.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.012>
- Choi, Y. y Hong, SR. y Jeon, BY. y Wang, HY. y Lee, GS. y Cho, SN. y Shim, TS y Lee, H. PCR convencional y en tiempo real dirigida al ARN ribosomal 16S para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. 2015 . DOI: doi:10.5588/ijtld.14.0472
- Devonshire AS, O'Sullivan DM, Honeyborne I, et al. (2016) The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. BMC Infect Dis.;16:366. Published 2016 Aug 3. doi:10.1186/s12879-016-1696-7

- Fontalvo D, Gómez D. (2015) Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *MÉD.UIS*. 28(1). p. 39-51.
- Furini, A. A., Heloisa da Silveria, P. P., Rodrigues, J. F., Montengro, L. M., Machado, R. L., Franco, C., . . . Rossit, A. R. (2013). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 39(6), 711-718. doi:<https://doi.org/10.1590/S1806-37132013000600010>
- Huggett JF, Foy CA, Benes Y, et al., (2013) The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem* 59(6):892-902.
- Jawetz E, Melnick, J y Adelberg E. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 2004. 25ª Edición. México. Editorial Mc Graw Hill. p. 289- 297.
- Jacobs, B. K., Goetghebeur, E., y Clement, L. (2014). Impact of variance components on reliability of absolute quantification using digital PCR. *BMC bioinformatics*, 15(1), 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-283>
- Kanagal-Shamanna R. (2016). Digital PCR: Principles and Applications. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1392, 43–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_5.
- Luo, J., Luo, M., Li, J., Yu, J., Yang, H., Yi, X., Chen, Y., & Wei, H. (2019). Rapid direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* based on culture droplet digital polymerase chain reaction. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 23(2), 219–225. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0182>
- Majumdar, N., Wessel, T. y Marks, J. (2015). Modelado digital de PCR para máxima sensibilidad, rango dinámico y precisión de medición. *PloS uno* , 10 (3), e0118833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118833>
- Mandell, G. L., Bennet, J. E., y Dolin, R. (2011). Mandell, Douglas y Bennett Enfermedades infecciosas principios y prácticas. En D. W. Fitzgerald, T. R. Sterling, & D. W. Hass, *Mycobacterium tuberculosis* (págs. 3126-3161). Philadelphia: El Servier Saunders.

Mehta, P. K., Raj, A., Singh, N., y Khuller, G. K. (October de 2012). Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(1), 20-36. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00987.x>

Ministerio de Salud. (Febrero de 2016). Analisis de la Situacion epidemiológica de la tuberculosis en el Perú, 2015. Lima, Perú. Obtenido de Direccion General de Epidemiologia: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3446.pdf>.

Nyaruaba, R., Xiong, J., Mwaliko, C., Wang, N., Kibii, BJ, Yu, J. y Wei, H. (2020). Desarrollo y evaluación de un ensayo de PCR digital de gotitas dúplex de un solo colorante para la detección y cuantificación rápidas de Mycobacterium tuberculosis . *Microorganismos* , 8 (5), 701. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050701>

Organización Mundial de la Salud. (13 de Junio de 2020). *Perfil de Tuberculosis: Perú*. Obtenido de https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&lan=%22ES%22&iso2=%22PE%22&main_tabs=%22out_tab%22

Organización Mundial de la Salud. (2019). Informe mundial sobre tuberculosis 2019. Organización Mundial de la Salud. Francia. Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/329368>.

Peñata, Adrián, Salazar, Richard, Castaño, Tatiana, Bustamante, Julián, & Ospina, Sigifredo. (2016). Diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a rifampicina con un método automatizado en tiempo real. *Biomédica* , 36 (Suplemento 1), 78-89. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3088>

Publicación del genoma. Disponible en: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm#:~:text=En%201998%20se%20publica%20el,la%20virulencia%2C%20patog%20supervivencia%2C

Ramírez-Lapausa, M., Menéndez-Saldaña, A., y Noguerado-Asensio, A.. (2015). Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. *Revista Española de Sanidad*

Penitenciaria, 17(1), 3-11. <https://dx.doi.org/10.4321/S1575-06202015000100002>

RETAMAL M PATRICIO, MARTÍNEZ T M. ANGÉLICA, ABALOS P PEDRO. (2003) Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Rev. chil. infectol.*; 20(3):166-170. Obtenido en:https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003000300003&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003000300003>.

Ruelas LC. (2015). Tuberculosis extrapulmonar: Incidencia y factores asociados en pacientes del Hospital Goyeneche, Arequipa 2009 – 2013. Perú.

Sah AK, Joshi B, Khadka DK, Gupta Birendra, et al. (2017). Comparative study of GeneXpert MTB/RIF Assay and Multiplex PCR assay for direct Detection of *Mycobacterium* in suspected pulmonary tuberculosis patients. *Current Microbiology*. 74: 2016-1032. DOI: 10.1007/s00284-017-1279-x

Song, N., Tan, Y., Zhang, L., Luo, W., Guan, Q., Yan, MZ, Zuo, R., Liu, W., Luo, FL y Zhang, XL (2018). Detección de ADN circulante específico de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR digital de gotitas para evaluación de vacunas en monos desafiados y diagnóstico de TB. *Microbios e infecciones emergentes*, 7 (1), 78. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0076-3>

Srisutham, S., Saralamba, N., Malleret, B., Rénia, L., Dondorp, AM e Imwong, M. (2017). Cuantificación de cuatro especies de *Plasmodium* humano mediante PCR digital de gotas. *PloS one*, 12 (4), e0175771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175771>

Ushio, R., Yamamoto, M., Nakashima, K., Watanabe, H., Nagai, K., Shibata, Y., Tashiro, K., Tsukahara, T., Nagakura, H., Horita, N., Sato, T., Shinkai, M., Kudo, M., Ueda, A., & Kaneko, T. (2016). Digital PCR assay detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pulmonary tuberculosis patient plasma. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland), 99, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.04.004>

Velarde, K. (2017) Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en heces de niños del Instituto Nacional de Salud del Niño mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Citado 2020 Jan 15. Obtenido de: HYPERLINK

"http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6301/Velarde_ga.pdf?sequence=2&isAllowed=y"

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6301/Velarde_ga.pdf?sequence=2&isAllowed=y

- Yang, J., Han, X., Liu, A., Bai, X., Xu, C., Bao, F., Feng, S., Tao, L., Ma, M. y Peng, Y. (2017) Uso de PCR digital de gotas para detectar ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de ADN derivadas de sangre completa de pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Fronteras en microbiología celular e infección*, 7, 369. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00369>
- Z. Li, L. Pan, L. Lyu, J. Li, H. Jia, B. Du, Q. Sun, Z. Zhang, Diagnostic accuracy of droplet digital PCR analysis of cerebrospinal fluid for tuberculous meningitis in adult patients, *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 26, Issue 2, 2020, Pages 213-219, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.015>.



IX. ANEXOS

Anexo 1

Constancia de Aprobación del proyecto Fondecyt 416-2019 en el Hospital Regional de Lambayeque



GOBIERNO REGIONAL LAMBAYEQUE
DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD
HOSPITAL REGIONAL LAMBAYEQUE - CHICLAYO



PERÚ
Ministerio de Salud

“AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD”

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

El Comité de Ética en Investigación, luego de haber revisado de manera expedita el proyecto de investigación: “**VALOR CLÍNICO DE LA PCR DIGITAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE M. tuberculosis EN MUESTRAS EXTRA-PULMONARES.**”, otorga la presente constancia a los autores:

DR. MIGUEL VILLEGAS CHIROQUE (Personal Del HRL)
DR. RODRÍGUEZ DELFÍN, LUIS ALBERTO (Investigador Externo)

Y se resuelve:

1. Aprobar la ejecución del mencionado proyecto.
2. Se extiende esta constancia para que el proyecto pueda ser ejecutado en **Servicio de Emergencia, Medicina, Infectología, UCI, Cirugía General, Cirugía de Cabeza y cuello, entre otros servicios donde se presente casos con sospecha de TB extrapulmonar. Además el procesamiento de las muestras se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Biología UNPRG Lambayeque.**
3. El investigador deberá presentar el informe de la investigación.
4. La presente constancia es válida hasta el mes hasta **Enero del 2022.**

Chiclayo, 30 de enero del 2020

NOTA. Cabe mencionar que la presente investigación es una investigación financiada por CONCYTEC, que cuenta con carta de compromiso de fecha 19 de Junio del 2019 firmada por el Director del Hospital Regional y el Director de Investigación de esa fecha

GOBIERNO REGIONAL LAMBAYEQUE
DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD
HOSPITAL REGIONAL LAMBAYEQUE

M. I. FIRMADA POR: MARRIAGA DEZA
PTE. L. P. DE LA COM. INVESTIGACION HRL
CEL. 973 10 719

Código_Inv: 0212-104-19CEI

Prolg. Augusto B. Leguía N°100 -Esquina Av. Progreso N°110-120 – Lambayeque-Chiclayo

Teléfono: 074- 480420 Anexo: 1060



Anexo 2

Ficha de Datos Clínicos y consentimiento informado

Código del Paciente: _____

1. **Género:** Femenino () Masculino ()
2. **Edad:** _____ años
3. **Ocupación:** _____
4. **Procedencia:** _____
5. **Contacto de Tuberculosis:** No () Si () Quién (es): _____
6. **Antecedente de BCG:** No () Si () Cicatriz en brazo derecho ()
7. **Comorbilidad:** VIH () DM () Cáncer () ERC ()
Otros: _____
8. **Forma de Presentación Clínica:** _____

9. **Tiempo de Enfermedad:** _____
10. **Radiografía de tórax:** Normal () Alterada () Patrón:

11. **PPD:** No realizado () Negativo () Positivo () Valor: _____
12. **Tipo de Muestra:** _____ Fecha: _____
_____ Fecha: _____
13. **Resultados de BK:** _____ Fecha: _____
14. **Resultados de Cultivos:** _____ Fecha: _____
15. **Resultados de PCR digital:** _____ Fecha: _____
16. **Recibió tratamiento anti-TBC:** No () Si ()
Esquema: _____ Fecha: _____

Firma del Investigador /Fecha:



Anexo 3

Protocolo de extracción de ADN en muestras líquidas y tejidos.

Extracción de ADN en muestras líquidas

1. Dejar la muestra a temperatura ambiente y trasladar 200µl de la muestra a un tubo de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 6000rpm por 5 minutos
3. Descartar el sobrenadante y homogenizar el precipitado.
4. **Añadir a la muestra 200ul Binding buffer y 40ul proteinaza K**, mezclar inmediatamente, incubar por 40 minutos a 70°C.
5. Dejar reposar o centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos y utilizar el sobrenadante.
6. Verter el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml.
7. **Añadir 250ul isopropanol (bajo congelación)**, mezclar y aplicarlo a un tubo de filtro High Pure, centrifugar por 1 minuto a 3000rpm. Descartar flujo y tubo colector.
8. **Añadir 500ul Buffer "Inhibitor Removal"**. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar flujo y tubo.
9. **Añadir 500ul Buffer "Wash"**. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar flujo y tubo colector.
10. **REPETIR PASO ANTERIOR**
11. Centrifugar por 3 minutos a 10000rpm. Descartar Tubo colector.
12. **Verter a un nuevo tubo y agregar 50ul Elution buffer (70°C)**. Centrifugar por 1 minuto a 10000rpm
13. Repetir el paso anterior, con 70µl de Elution buffer.
14. Descartar la membrana y colectar el líquido (ADN) en un tubo de 0.5ml.



Extracción de ADN en muestras líquidas

1. Dejar la muestra en Tris- EDTA 0.5M durante 1 día a 4°C
2. Decantar la muestra y trasladar 200µl de la muestra a un tubo de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 6000rpm por 5 minutos
4. Descartar el sobrenadante y homogenizar el precipitado
5. **Añadir a la muestra 200ul Tissue Lysis buffer y 40ul proteinaza K**, mezclar inmediatamente, incubar por 1hora a 55°C
6. **Tejidos mamíferos**
7. **25-50mg**
8. **Añadir a la muestra 200ul Binding buffer y 40ul proteinaza K**, mezclar inmediatamente, incubar por 40 minutos a 70°C.
9. Dejar reposar o centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos y utilizar el sobrenadante.
10. Verter el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml.
11. **Añadir 250ul isopropanol (bajo congelación)**, mezclar y aplicarlo a un tubo de filtro High Pure, centrifugar por 1 minuto a 3000rpm. Descartar flujo y tubo colector.
12. **Añadir 500ul Buffer "Inhibitor Removal"**. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar flujo y tubo.
13. **Añadir 500ul Buffer "Wash"**. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar flujo y tubo colector.
14. **REPETIR PASO ANTERIOR**
15. Centrifugar por 3 minutos a 10000rpm. Descartar Tubo colector.
16. **Verter a un nuevo tubo y agregar 50ul Elution buffer (70°C)**. Centrifugar por 1 minuto a 10000rpm
17. Repetir el paso anterior, con 50µl de Elution buffer.
18. Descartar la membrana y colectar el líquido (ADN) en un tubo de 0.5ml.



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – UNPRG
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
TESIS

“Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas
pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020”



de muestras extrapulmonares de



Anexo 4.

Resumen de los resultados numéricos analizados en el ensayo de ddPCR de la muestra 1 al 50 Primera repetición

Repetición 1						Repetición 2					
Número de muestra	Copias/μl	Copias/20μl	Gotas Totales	Gotas +	Gotas -	Número de muestra	Copias/ul	copias/20ul	Gotas Totales	Gotas +	Gotas -
1	0,08	1,56	15088	1	15087	1	0,07	1,4	16765	1	16764
2	0,09	1,89	12451	1	12450	2	0,33	6,64	14173	4	14169
3	0,19	3,73	12612	2	12610	3	0,16	3,24	14522	2	14520
4	0,4	7,92	14864	5	14859	4	0,7	14	15102	9	15093
5	0,33	6,59	14279	4	14275	5	0,59	11,80	16056	8	16048
6	0,16	3,1	15170	2	15168	6	0,45	9,07	15573	6	15567
7	1,42	28,3	15790	19	15771	7	2,29	45,7	7211	14	7197
8	0	0	13924	0	13924	8	0,08	1,68	13981	1	13980
9	9,32	186	15078	119	14959	9	9,58	192	15038	122	14916
10	0,15	3,01	15646	2	15644	10	0,56	11,2	10530	5	10525
11	0	0	16077	0	16077	11	0,17	3,46	13584	2	13582
12	23,7	474	14063	281	13782	12	45,3	907	15448	584	14864
13	0,08	1,62	14496	1	14495	13	0,08	1,63	14446	1	14445
14	0,31	6,27	15006	4	15002	14	0,71	14,3	13180	8	13172
15	0,6	12,1	15583	8	15575	15	1,24	24,7	14273	15	14258
16	1,96	39,3	14984	25	14959	16	2,06	41,2	13720	24	13696
17	28,8	576	13388	324	13064	17	57,6	1152	13390	640	12750
18	15	300	14356	182	14174	18	24,1	482	14408	292	14116
19	3,12	62,3	16637	44	16593	19	9,57	191	16786	136	16650
20	31,5	629	14586	385	14201	20	46,1	922	15814	608	15206
21	3,7	74	14971	47	14924	21	6,16	123	16095	84	16011



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – UNPRG
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
TESIS



“Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020”

Repetición 1						Repetición 2					
Número de muestra	Copias/ μ l	Copias/20 μ l	Gotas Totales	Gotas +	Gotas -	Número de muestra	Copias/ μ l	copias/20 μ l	Gotas Totales	Gotas +	Gotas -
22	4,6	91,9	14108	55	14053	22	5,77	115	14304	70	14234
23	1,19	23,8	14840	15	14825	23	3,28	65,7	11118	31	11087
24	0,6	12	13741	7	13734	24	0,62	12,5	17013	9	17004
25	0,39	7,8	15093	5	15088	25	0,98	19,5	14452	12	14440
26	0	0	15588	0	15588	26	0	0	13167	0	13167
27	0,15	3,08	15276	2	15274	27	0	0	15631	0	15631
28	17,7	355	15835	237	15598	28	37,8	757	14309	453	13856
29	0,08	1,67	14107	1	14106	29	0,07	1,48	15928	1	15927
30	0,15	3,06	15384	2	15382	30	0	0	14691	0	14691
31	0	0	11123	0	11123	31	0,14	2,81	16735	2	16733
32	0,09	1,86	12666	1	12665	32	0,08	1,58	14854	1	14853
33	19,3	386	12959	211	12748	33	25,2	504	14263	302	13961
34	4,77	95,4	13592	55	13537	34	7,16	143	15830	96	15734
35	0,08	1,58	14875	1	14874	35	0	0	15962	0	15962
36	60,7	1214	13462	677	12785	36	48,70	975,00	14370	583	13787
37	40,3	805	15869	534	15335	37	36,6	732	14239	436	13803
38	32	641	15480	416	15064	38	35,3	706	13127	388	12739
39	1,82	36,4	13579	21	13558	39	2,25	45,1	13065	25	13040
40	5,63	113	12565	60	12505	40	5,84	117	15154	75	15079
41	0,5	9,98	14152	6	14146	41	0,32	6,29	14965	4	14961
42	1,14	22,8	14472	14	14458	42	2,04	40,8	16177	28	16149
43	123	2468	14753	1469	13284	43	112	2239	14212	1290	12922
44	0,15	2,99	15726	2	15724	44	0,38	7,67	15342	5	15337
45	0	0	15213	0	15213	45	0,21	4,23	16697	3	16694
46	0,24	4,79	14726	3	14723	46	0,22	4,35	16239	3	16236



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – UNPRG
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
TESIS

“Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas
pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020”



de muestras extrapulmonares de



Repetición 1						Repetición 2					
Número de muestra	Copias/ μ l	Copias/20 μ l	Gotas Totales	Gotas +	Gotas -	Número de muestra	Copias/ μ l	copias/20 μ l	Gotas Totales	Gotas +	Gotas -
47	0,43	8,5	16617	6	16611	47	0,22	4,41	16022	3	16019
48	0,09	1,73	13640	1	13639	48	0,41	8,21	14333	5	14328
49	0,43	8,69	16252	6	16246	49	0,27	5,47	17217	4	17213
50	0,26	5,1	13830	3	13827	50	0,31	6,29	11226	3	11223



Anexo 5

Reactivos y condiciones de temperatura de PCR convencional

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)	Concentración
	inicial		final
5x Green Buffer Promega	5x	5.0 ul	1x
MgCl	25mM	2.0 ul	2.0 nM
dNTP	2.5mM	2.0 ul	200 µM
Cebadores	10 uM	0.5 ul	0.4 uM
Enzima	5u/ul	0.2 ul	1u/ul
H₂O estéril	---	12.8 ul	---
ADN		2.0 ul	
Volumen total		25.0 ul	

Condiciones de ciclo de PCR

Paso	Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	PRE-DENATURACIÓN	94°C	3'	1
2	DENATURACION	94°C	30''	30
3	HIBRIDACIÓN	59°C	40''	
4	EXTENSIÓN	72°C	1'	
5	POS-EXTENSIÓN	72°C	3'	1



Anexo 6

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Gel de poliacrilamida:

- 6ml de solución de poliacrilamida 20:1 (acrilamida: bisacrilamida)
 - 6ml TBE 5X
 - 375ul de solución de Persulfato de Amonio 10%
 - 37.5ul TEMED (NNNN Tetrametil Etilen Diamin)
 - 18ml de Agua
- } 30ml
- Se utilizará solo 20ml

Preparación del sistema para PAGE

- ✓ Se vierte la mezcla de los siguientes componentes mencionados a los cristales previamente unidas con los slips, se coloca el peine y se deja polimerizar por un periodo de 20-20 minutos.
- ✓ Después de 20 minutos se retira el peine
- ✓ Se adiciona a las placas de vidrio vaselina con una jeringa
- ✓ Se coloca la placa en el sistema, uniendo las placas y el sistema con los slips.
- ✓ Se llena las cubetas del sistema con buffer TBE 1X
- ✓ Se colocan los cables que unen el sistema con la fuente de alimentación y se comprueba la funcionalidad con el burbujeo presente.
- ✓ Se programa el voltaje de la fuente de poder. Se apaga y se procede a colocar las muestras en los pocillos

Siembra de muestra

- ✓ En cada muestra se adiciona 2ul de buffer de carga
- ✓ Se toma 2ul de muestra y se siembra en cada pocillo

Coloración del Gel

- ✓ Se coloca el gel en solución fijadora por un lapso de tiempo de 10-15 minutos
- ✓ Se retira el fijador y se procede a colocarlo en Nitrato de plata por un periodo de 15-20 minutos.
- ✓ Posteriormente se enjuaga el gel dos veces con agua corriente
- ✓ Se le adiciona al gel el revelador, se mantendrá en esta solución hasta la aparición de las bandas respectivas.
- ✓ Para la conservación del gel se coloca el fijador



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – UNPRG
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
TESIS



“Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020”

Anexo 7

Datos epidemiológicos y resultados reales de Baciloscopia y Cultivo de las 50 muestras.

N° Código	N° de Registro de Laboratorio - HRL	SEXO	EDAD	TIPO DE MUESTRA	FECHA DE OBTENCIÓN DE MUESTRA	PRUEBA DE CULTIVO	EXAMEN BACILOSCOPIA
1	953	M	42	Líquido pleural	7/02/2020	Negativo	Negativo
2	1008	F	6	LCR	8/02/2020	Negativo	Negativo
3	1009	M	77	Biopsia de ganglio cervical	8/02/2020	N/R	Negativo
4	1045	F	30	Líquido pleural	10/02/2020	N/R	Negativo
5	1086	F	23	Biopsia de ganglio cervical	11/02/2020	Negativo	Negativo
6	1087	F	12	LCR	11/02/2020	Negativo	Negativo
7	1088	F	23	Biopsia de ganglio cervical	12/02/2020	Positivo 2 colonias	Negativo
8	1201	M	51	Líquido pleural	15/02/2020	Negativo	Negativo
9	1198	M	72	Líquido Ascítico	14/02/2020	N/R	Negativo
10		F	40	LCR	17/02/2020	Negativo	Negativo
11	1412	M	79	Líquido pleural	20/02/2020	Negativo	Negativo
12	1494	M	31	Biopsia de ganglio cervical	22/02/2020	Negativo	Negativo
13	1505	F	15	Líquido Ascítico	24/02/2020	Negativo	Negativo
14	1509	M	51	Líquido Ascítico	24/02/2020	Negativo	Negativo
15	1535	M	15	Líquido Articular Cad. Izq.	24/02/2020	Negativo	Negativo
16	1570	M	34	Líquido pleural	25/02/2020	Negativo	Negativo
17	1575	M	51	Líquido Ascítico	25/02/2020	Negativo	Negativo
18	1638	F	62	Líquido pleural	26/02/2020	Negativo	Negativo
19	1647	F	21	Orina	27/02/2020	Positivo (++)	Positivo (++)
20	1648	M	25	Heces	27/02/2020	Negativo	1 BAAR
21	1716	F	21	Orina	28/02/2020	Positivo (+)	Positivo (+)
22	1790	F	21	LCR	3/03/2020	Negativo	Negativo
23	1793	M	59	Líquido Ascítico	3/03/2020	Negativo	Negativo
24	1799	M	10	Secreción de absceso	3/03/2020	Negativo	Negativo
25	1818	M	83	LCR	3/03/2020	Contaminado	Negativo
26	1793	M	59	Líquido Ascítico	3/03/2020	Negativo	Negativo
27	1817	F	39	Biopsia de ganglio cervical	3/03/2020	Negativo	Negativo
28	1858	M	29	Heces	5/03/2020	N/R	Positivo (++)
29		F	63	LCR	6/03/2020	Negativo	
30	1879	F	58	Secreción de absceso	6/03/2020	Negativo	Negativo
31	1916	M	67	Líquido Ascítico	7/03/2020	Negativo	Negativo
32	2385	F	79	Líquido pleural	5/08/2020	Negativo	Negativo
33	2422	F	18	Líquido pleural	15/08/2020	Negativo	2 BAAR
34	2652	F	24	Orina	23/09/2020	N/R	Positivo (+)
35	2753	M		Orina	19/10/2020	Negativo	Negativo



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – UNPRG
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
TESIS



“Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020”

36	2784	M	5	Biopsia de ganglio cervical	27/10/2020	Negativo	3 BAAR
37	2842	F	26	Secreción de mama	7/11/2020	N/R	Negativo
38	2853	F	70	Líquido pericárdico	15/11/2020	Negativo	Negativo
39	2896	M	63	Líquido pleural	24/11/2020	Negativo	Negativo
40	2962	F	69	Líquido pleural	2/12/2020	Negativo	Negativo
41	2963	F	26	Líquido pleural	2/12/2020	Negativo	Negativo
42	3025	M	23	Orina	15/12/2020	N/R	7 BAAR
43	11	M	5	Biopsia de ganglio cervical	5/01/2021	Negativo	Positivo (+)
44	92	F	49	LCR	9/01/2021	Negativo	Negativo
45	91	F	51	Biopsia de ganglio cervical	19/01/2021	Negativo	Negativo
46	194	M	4	LCR	2/02/2021	N/R	Negativo
47	253	F	26	Líquido Ascítico	13/02/2021	Negativo	Negativo
48	354	M	69	Líquido Pleural	24/02/2021	Negativo	Negativo
49	368	M	83	Líquido pleural	26/02/2021	Negativo	Negativo
50	401	F	91	Líquido pleural	1/03/2021	Negativo	Negativo

Nota. BAAR: Bacterias ácido alcohol resistente, +: 10 a 99 BAAR en 100 campos microscópicos, ++1 a 10 BAAR en 50 campos microscópicos, +++: Más de 10 BAAR por campo en 20 campos microscópicos.
N/R: No registró.



ACTA DE SUSTENTACIÓN
ACTA DE SUSTENTACION VIRTUAL N° 017-2022-FCCBB-UI

Siendo las 18:30 horas del día 13 de julio de 2022, se reunieron vía plataforma virtual, meet.google.com/mrb-wsdy-mgf los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada “**Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020**”, designados por Resolución 001-2020-VIRTUAL-UI-FCCBB de fecha 04 de junio de 2020, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Ana María del Socorro Vásquez Del Castillo	Presidenta
Dra. Gianina Llontop Barandiaran	Secretaria
MSc. Jhon Wistón García López	Vocal
Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín	Asesor

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 177-2022-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 11 de julio de 2022.

La Tesis presentada y sustentada por el **Bachiller BENNY TOMÁS ZUÑE ESQUÉN** tuvo una duración de 30 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de EXCELENTE (19.84) en la escala vigesimal.

Por lo que el Bachiller **BENNY TOMÁS ZUÑE ESQUÉN** queda **APTO** para obtener el título profesional de Licenciado en Biología, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 20:14 horas se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman

Dra. Ana María del Socorro Vásquez Del Castillo
Presidente

Dra. Gianina Llontop Barandiaran
Secretaria

MSc. Jhon Wistón García López,
Vocal

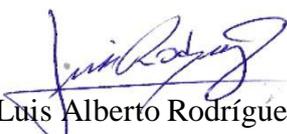
Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
Asesor

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Luis Alberto Rodríguez Delfín, asesor de la tesis del Bachiller Benny Tomás Zuñes Esquén, titulada: Detección y Cuantificación de *Mycobacterium tuberculosis* con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud del 5% verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecida por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 11 Agosto del 2022


Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
DNI: 08068320
ASESOR

Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%

EN

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	corona-propaganda.de Fuente de Internet	1%
2	www.researchsquare.com Fuente de Internet	<1%
3	pubs.acs.org Fuente de Internet	<1%
4	issuu.com Fuente de Internet	<1%
5	Scheper, Christoph Tobias(Hummel, Thomas). "The role of Drosophila Apaf-1-related-killer (dark) in establishing synaptic specificity in the olfactory system", Münster University, Germany, Document Server, 2010. Publicación	<1%
6	Submitted to University of Western Sydney Trabajo del estudiante	<1%

7	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
8	Submitted to De La Salle University Trabajo del estudiante	<1 %
9	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1 %
10	Adriana Antônia da Cruz Furini, Heloisa da Silveira Paro Pedro, Jean Francisco Rodrigues, Lilian Maria Lapa Montenegro et al. "Detection of Mycobacterium tuberculosis complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens", <i>Jornal Brasileiro de Pneumologia</i> , 2013 Publicación	<1 %
11	Submitted to University of Suffolk Trabajo del estudiante	<1 %
12	Submitted to Flinders University Trabajo del estudiante	<1 %
13	www.dominiodelasciencias.com Fuente de Internet	<1 %
14	jcm.asm.org Fuente de Internet	<1 %
15	repository.unair.ac.id Fuente de Internet	<1 %

16

Yixin Liao, Fan Wu, Fahui Dai, Qin Huang, Yanling Feng, Yun Ling, Hongzhou Lu. "Mycobacterium tuberculosis and Pseudoramibacter alactolyticus coinfection in brain after dental extraction", Medicine, 2019

Publicación

<1 %

17

nemertes.library.upatras.gr

Fuente de Internet

<1 %

18

Amy Oreskovic, Nuttada Panpradist, Diana Marangu, M. William Ngwane et al. "Diagnosing Pulmonary Tuberculosis by Using Sequence-Specific Purification of Urine Cell-Free DNA", Journal of Clinical Microbiology, 2021

Publicación

<1 %

19

Jun Luo, Mengwei Jiang, Jin Xiong, Junhua Li, Hongping Wei, Junping Yu. "Rapid ultrasensitive diagnosis of pneumonia caused by Acinetobacter baumannii using a combination of enrichment and phage-based qPCR assay", Research Square, 2020

Publicación

<1 %

20

Submitted to London Metropolitan University

Trabajo del estudiante

<1 %

21

Ziyang Cao, Wei Wu, Haiting Wei, Caixia Gao, Liping Zhang, Chunyan Wu, Likun Hou. "Using droplet digital PCR in the detection of

<1 %



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Benny Tomas Zuñe Esquen
Título del ejercicio: Tesis Benny
Título de la entrega: Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis c...
Nombre del archivo: INFORME_DE_TESIS_FINAL_10.09.2022.docx
Tamaño del archivo: 5.79M
Total páginas: 71
Total de palabras: 15,617
Total de caracteres: 82,597
Fecha de entrega: 11-ago.-2022 09:46p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 1881580291

