



**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia
Departamento Bacteriología Micología
Laboratorio Nacional Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y
Micobacterias**

**Diagnóstico rápido de la tuberculosis en Cuba: evaluación de
pruebas diagnósticas para su introducción en el Programa
Nacional de Control**

Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. María Rosarys Martínez Romero, MSc.

La Habana, 2025



**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia
Departamento Bacteriología Micología
Laboratorio Nacional Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y
Micobacterias**

**Diagnóstico rápido de la tuberculosis en Cuba: evaluación de
pruebas diagnósticas para su introducción en el Programa
Nacional de Control**

Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. María Rosarys Martínez Romero, MSc.

Tutores: Dr. Amilcar Duquesne Alderete, Dr.C
Lic. Raúl Díaz Rodríguez, Dr.C

La Habana, 2025

AGRADECIMIENTOS

Quiero darles las gracias a todas las personas que de una manera u otra han contribuido en mi formación como profesional en el IPK, no voy a nombrar a ninguno porque temo que me quede alguien por mencionar y no me alcanzaría esta hoja para ello.

Agradezco a mis padres, por todo su apoyo y amor incondicional, a mi papá que desde el cielo está orgulloso de lo que he logrado; mi mamita linda, como le digo cariñosamente, que siempre está a cada paso junto conmigo, a mis hermanos que siempre me dan aliento para seguir adelante. A mi esposo por su apoyo y estar siempre presente, por todo su amor, cariño y comprensión.

A mis tutores, en especial a Amilkar, por brindarme sus conocimientos y su apoyo incondicional, tantas horas de trabajo y desvelo. A mi tutor Raúl por su profesionalidad y por las horas dedicadas de su precioso tiempo.

Quiero agradecer a alguien muy especial por su ayuda incondicional, la Dra. María Eugenia Romaní, gracias por todas sus enseñanzas.

A mis compañeras y amigas Misle y Grechen por su amistad, su apoyo para seguir adelante. La abuela Lily, por sus continuas charlas y aliento para terminar esta etapa de mi vida profesional. A todos mis compañeros del departamento, que de una forma u otra me ayudaron a terminar este trabajo.

A todos,

Muchas Gracias...

DEDICATORIA

A mis padres,

A mi querido esposo,

A mis hermanos, mi querida Bibi y familia.

ABREVIATURAS

BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente

BK: Baciloscopía

CMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

MF LED: Microscopía de fluorescencia LED

MNT: Micobacterias no tuberculosas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PNC: Programa Nacional de Control

PVV: personas que viven con VIH

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RIF: Rifampicina

TB: Tuberculosis

TB-MDR: tuberculosis multidrogoresistente

TB-RR: tuberculosis resistente a la rifampicina

ZN: Zielh Neelsen

SÍNTESIS

En el marco de la estrategia para la eliminación de la tuberculosis como problema de salud en Cuba, se realizó en el Instituto Pedro Kourí (IPK) una investigación en servicios y sistemas de salud de tipo evaluativa. El propósito de la investigación estuvo dirigida a avalar la introducción del ensayo Xpert® MTB/RIF (para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina) y de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED, en el algoritmo que se utiliza en el país para su diagnóstico. En el Laboratorio Nacional de Referencia para la Tuberculosis del IPK, entre el 2014 y 2018, se estudiaron un total de 1296 muestras clínicas (1233 pulmonares y 63 extrapulmonares). Se realizó la evaluación de la capacidad y la precisión diagnóstica de ambos métodos. El cultivo se utilizó como prueba de referencia. Se ratificó la superioridad del ensayo Xpert® MTB/RIF sobre la tinción de Zielh Neelsen y el cultivo convencional para el uso propuesto. De igual forma, se comprobó que la tinción fluorescente resultó más sensible que la tinción de Zielh Neelsen para la detección de bacilos ácido alcohol resistentes, incluso en frotis paucibacilares. En este documento se resumen los resultados que conforman el cuerpo de evidencias que así lo acreditan.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación / Fundamentación teórica	3
1.2 Problema científico:	4
1.3 Hipótesis:.....	4
1.4 Objetivos	4
1.5 Novedad y actualidad científica	5
1.6 Valor metodológico.....	6
1.7 Valor práctico	6
2 CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Breve historia de la tuberculosis	8
2.2 Epidemiología de la Tuberculosis	8
2.2.1 Estrategia Fin a la Tuberculosis.....	8
2.2.2 Situación Epidemiológica de la tuberculosis a nivel mundial	10
2.2.3 Situación Epidemiológica de la tuberculosis en Las Américas ..	11
2.2.4 Situación Epidemiológica de la tuberculosis en Cuba.....	12
2.2.5 Tuberculosis resistente a fármacos.....	14
2.2.6 Vigilancia de la resistencia a los medicamentos antituberculosos en Cuba.....	14
2.3 Taxonomía y características generales de las micobacterias	15
2.3.1 Taxonomía.....	15
2.3.2 Morfología y características de las micobacterias	17
2.3.3 Medios de cultivo y características de las colonias de las micobacterias.....	18
2.3.4 Estructura celular de las micobacterias	19
2.4 Diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis	20
2.4.1 Pruebas para el diagnóstico de la infección por <i>M. tuberculosis</i>.....	20
2.4.2 Baciloscopia.....	20
2.4.3 Pruebas diagnósticas recomendadas por la OMS para el diagnóstico de la TB y TB resistente	21
2.4.4 Diagnóstico rápido para la detección de tuberculosis.....	23
2.4.5 Pruebas diagnósticas iniciales para el diagnóstico de TB sin detección de farmacorresistencia	28

2.4.6	Pruebas basadas en hibridación inversa de alta complejidad para la detección de resistencia a la pirazinamida	29
2.5	Validación de pruebas diagnósticas	30
3	CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1	Diseño general de la investigación.....	34
3.2	Población de estudio, técnicas y procedimientos para el procesamiento, cultivo de las muestras e identificación en especies.....	35
3.2.1	Población de estudio del ensayo Xpert® MTB/RIF	35
3.2.2	Población de estudio de la tinción fluorescente por MF LED.....	37
3.3	Técnicas y procedimientos	38
3.4	Procesamiento y análisis de la información.....	49
3.4.1	Ensayo Xpert® MTB/RIF. Evaluación de la capacidad y la precisión diagnóstica.....	49
3.4.2	Tinción fluorescente mediante microscopía de fluorescencia LED Evaluación de la capacidad diagnóstica y rendimiento de la técnica.....	49
3.5	Análisis de la información.....	50
3.6	Control de sesgos	51
3.7	Operacionalización de las variables.....	52
3.8	Consideraciones éticas	53
3.9	Estructura de la tesis y presentación de los resultados	54
4	CAPÍTULO 3. RESULTADOS	55
4.1	Validación de la capacidad diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para la detección del <i>CMTB</i>	55
4.2	Precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico rápido de la tuberculosis en muestras pulmonares y extrapulmonares	59
4.2.1	Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis. (Estudio 1).....	60
4.2.2	Evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares (Estudio 2)	66
4.2.3	Evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF para la detección de resistencia a la Rifampicina.....	69
4.3	Validación de la capacidad diagnóstica de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED	71
4.4	Rendimiento de la tinción fluorescente mediante la MF LED, en muestras de esputos, para el diagnóstico de la tuberculosis	75
5	CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	79

6	CONCLUSIONES.....	95
7	RECOMENDACIONES.....	96
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
9	ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las diez principales causas de muerte en todo el mundo y la principal causa de fallecimiento por un solo agente infeccioso, clasificado por encima del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El agente causal es el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). La enfermedad afecta los pulmones, pero también puede afectar otros sitios.¹

La pandemia de la COVID-19 revierte años de progreso en la prestación de servicios esenciales y en la carga de la TB. El impacto más obvio es una gran caída mundial entre las personas de reciente diagnóstico y las que se informan con la enfermedad. En 2019, se notifican 7,1 millones de personas y en el 2020 disminuye a 5,8 millones, muy por debajo de la estimación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La TB resistente a fármacos representa un problema de salud pública y para el control mundial de la enfermedad. La resistencia a isoniazida y rifampicina (RIF), dos medicamentos de primera línea más efectivos, es la mayor preocupación.¹

En Cuba, la TB constituye una enfermedad de declaración obligatoria y su programa de control es priorizado. En los últimos 5 años la tasa de incidencia se mantiene por debajo de 10 por 100 000 habitantes. En los años 2022 y 2023 la incidencia de esta enfermedad, en todas sus formas, alcanza el 6,2 y 6,9 por 100 000 habitantes, en ese orden. En 2022 se notifican 719 casos (662 nuevos y 57 recaídas) y se incrementa a 755 (706 nuevos y 49 recaídas) en el 2023.²

En el 2014, durante la 67ª Asamblea Mundial de Salud, se adopta una estrategia mundial y metas para la prevención, la atención y el control de la TB después del 2015. Consta de 10 componentes organizados en tres pilares y cuatro principios. El pilar tres aborda el tema de la innovación e investigación intensificada, donde se expone que para poner fin de la epidemia de TB se necesita la introducción de métodos rápidos y precisos para el diagnóstico de esta enfermedad.³

La principal limitación de los Programas Nacionales de Control de la TB es la dificultad para realizar su diagnóstico rápido. La baciloscopía (BK) se utiliza como prueba inicial en la mayoría de los países en vías de desarrollo, por ser una técnica sencilla, rápida y de bajo costo. Sin embargo, la sensibilidad varía entre el 22 - 43% para un solo frotis y puede alcanzar hasta 60% en condiciones óptimas en comparación con el cultivo, lo que limita la utilidad de esta técnica, sobre todo en muestras paucibacilares, personas con déficit inmunológico y muestras extrapulmonares. El cultivo es más sensible que la BK, pero requiere de técnicas más complejas que demoran entre 30 y 60 días para que las colonias sean detectables y se pueda realizar la identificación de especie.^{4,5}

Desde el año 2007 la OMS evalúa varias tecnologías para realizar un diagnóstico rápido de la TB. Una de ellas es la tinción fluorescente con auramina O mediante la microscopía de fluorescencia LED (*Light-Emitting Diodes, por sus siglas en inglés*), donde se sustituye la lámpara de mercurio, que se utiliza en la microscopía de fluorescencia convencional, por una fuente de luz LED. Tiene la ventaja que utiliza adaptadores que convierten cualquier microscopio óptico en un microscopio de fluorescencia, además no se necesita de un cuarto oscuro para la lectura de los frotis. Por otro lado, la tinción fluorescente, permite la

observación y lectura de los frotis en un menor tiempo cuando se compara con la tinción de Zielh Neelsen (ZN).⁶⁻⁸

El ensayo Xpert® MTB/RIF (*Cepheid, Sunnyvale, EE. UU*), es una prueba molecular que se basa en la amplificación de ácidos nucleicos. Es una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real, semicuantitativa y semianidada. Detecta el ácido desoxirribonucleico (ADN) del *CMTB* y, de forma simultánea, la resistencia a RIF, una de las drogas de primera línea para el tratamiento de la TB.⁹⁻¹¹

En 2011, la OMS recomienda el ensayo Xpert® MTB/RIF como prueba inicial para el diagnóstico de TB⁹. En el mismo año, se realiza la recomendación de utilizar la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED (MF LED), como una alternativa a la microscopía convencional con la tinción de ZN.^{6,7}

1.1 Justificación / Fundamentación teórica

Cuba se encuentra entre los diez países de la región de Las Américas con una tasa incidencia estimada por debajo de 10 por 100 000 habitantes, y puede avanzar a eliminar la enfermedad como problema de salud pública, antes de 2035.¹² Para ello es necesario introducir técnicas rápidas y más sensibles que los métodos convencionales (BK con tinción de ZN y cultivo).

Dada la prioridad otorgada al propósito de eliminación, se necesita compilar evidencias científicas sobre la validación, estimación de la precisión diagnóstica y rendimiento del ensayo Xpert® MTB/RIF y de la tinción fluorescente con auramina O con la tecnología de la MF LED, en las condiciones del laboratorio. Las evidencias sustentan la toma de decisión de incorporar ambas tecnologías en el algoritmo diagnóstico de la TB en el Laboratorio Nacional de Referencia

(LNR) y extenderlo al resto de la red, para mejorar la calidad y la rapidez del diagnóstico de la TB en Cuba.

1.2 Problema científico:

¿Qué evidencias científicas provenientes de la validación de pruebas diagnósticas (precisión y rendimiento), soportan la decisión de la introducción del ensayo Xpert® MTB/RIF y la tinción fluorescente con auramina O con la tecnología de la MF LED en el algoritmo diagnóstico de la TB en Cuba?

1.3 Hipótesis:

La introducción del Xpert® MTB/RIF y la tinción fluorescente con auramina O mediante la MF LED, en el algoritmo diagnóstico de la TB, resultan alternativas de elevada precisión para mejorar la detección oportuna de la enfermedad en Cuba.

1.4 Objetivos

General: Evaluar la precisión diagnóstica y el rendimiento del ensayo molecular Xpert® MTB/RIF y la tinción fluorescente, mediante la microscopía de fluorescencia LED, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis de Cuba para la detección oportuna de casos de tuberculosis.

Específicos

1. Validar la capacidad diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a rifampicina, en muestras de esputo en las condiciones del Laboratorio Nacional de Referencia de tuberculosis de Cuba.
2. Evaluar la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico rápido de la tuberculosis y tuberculosis resistente a rifampicina en muestras

pulmonares y extrapulmonares, comparado con el cultivo bacteriológico como método de referencia.

3. Validar la capacidad diagnóstica de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED para la identificación de bacilos ácido alcohol resistente, en muestras de esputos, en el Laboratorio Nacional de Referencia de tuberculosis de Cuba.

4. Evaluar el rendimiento de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico rápido de la tuberculosis, en muestras de esputos, en el Laboratorio Nacional de Referencia de tuberculosis de Cuba.

1.5 Novedad y actualidad científica

➤ Se demuestran mediante evidencias científicas (validación, evaluación de la precisión diagnóstica y rendimiento) la toma de decisiones, por parte del Programa Nacional de Control (PNC), de la introducción del ensayo Xpert® MTB/RIF y de la tinción fluorescente con auramina O con la tecnología de la MF LED en el algoritmo diagnóstico de la TB en Cuba.

➤ Se introducen, por primera vez en Cuba, tecnologías novedosas que se recomiendan por la OMS como prueba inicial para el diagnóstico rápido de la TB.

➤ Esta investigación responde a los lineamientos 126-128, de la política económica y social del Partido Comunista de Cuba para el período 2016-2021.¹³ El lineamiento 126 aborda el uso eficiente de los recursos. En el contexto de esta investigación se tiene en cuenta el uso más adecuado y racional de los métodos para el diagnóstico. El lineamiento 127 refleja la promoción y prevención como

elementos vitales para el mejoramiento del estilo de vida, mientras que el lineamiento 128 el mejoramiento de las condiciones higiénico-epidemiológicas.

➤ Con este estudio se da respuesta al artículo 72 de la actual Constitución de la República de Cuba,¹⁴ que refleja el hecho que la salud pública es un derecho de todas las personas y que es responsabilidad del Estado garantizar el acceso, la gratuidad y la calidad de los servicios de atención. En el mismo se aborda la intersectorialidad entre todos los niveles de atención de salud. El algoritmo propuesto por el autor refleja la importancia de la interrelación de todos los niveles de atención de salud para un adecuado diagnóstico de la TB.

1.6 Valor metodológico

➤ El procedimiento de síntesis de evidencias científicas avala la toma de decisiones del Programa Nacional de Control de la TB para la introducción de nuevas tecnologías en el algoritmo diagnóstico de Cuba.

➤ Se demuestra la aplicabilidad de los marcos metodológicos propuestos por la OMS, para la introducción del ensayo Xpert® MTB/RIF como prueba inicial para el diagnóstico de la TB en sustitución de la BK con la tinción de ZN, así como la tinción fluorescente con la MF LED, en sustitución de la técnica de ZN.

1.7 Valor práctico

➤ **Beneficios para la salud de la población:**

Permite detectar la TB y conocer el patrón de susceptibilidad/ resistencia de la RIF en menos de 2 horas, lo que contribuye a detectar los casos infecciosos en la comunidad, comenzar con el tratamiento específico de forma rápida y precisa,

así como evitar las complicaciones graves de la enfermedad y la aparición de variantes resistentes en la población general, en particular a personas viviendo con VIH.

➤ **Beneficios para el Sistema de Salud:**

Se disponen de dos herramientas sensibles y rápidas para la detección de TB, que permite establecer estrategias para lograr un mejor manejo y control epidemiológico de la enfermedad y contribuir a la eliminación de la enfermedad como problema de salud en Cuba.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

2 CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

2.1 Breve historia de la tuberculosis

Existen fuertes evidencias que demuestran que el *CMTB* evoluciona como patógeno humano en el este del continente africano. Su aparición en otras regiones ocurre con las primeras migraciones humanas. Los hallazgos más antiguos de la afectación humana por TB se descubren en momias pertenecientes a la pre-dinastía egipcia (3500-2650 a.C.) y en restos humanos ubicados en Suecia e Italia que datan del período Neolítico.^{15,16}

Esta enfermedad no se convierte en un problema importante hasta la Revolución Industrial, cuando el hacinamiento y las condiciones socio-económicas favorecen su difusión. En los siglos XVII y XVIII, la TB causa la cuarta parte de todas las defunciones de adultos en la región de Europa.¹⁶

En el año 1946 se demuestra la eficacia de la estreptomina para el tratamiento de la TB. En 1952 se introduce la isoniacida y se logra curar a la mayoría de los pacientes. En 1970 se adiciona la RIF al tratamiento, que permite la cura más efectiva de la enfermedad. Con la combinación de la isoniacida y la RIF, la duración de la quimioterapia disminuye de dos años a nueve meses, y luego a seis meses cuando se introduce en el esquema de tratamiento la terapia multi-medicamentos al añadir la pirazinamida.¹⁷

2.2 Epidemiología de la Tuberculosis

2.2.1 Estrategia Fin a la Tuberculosis

La TB continúa como una de las causas más importante de muerte a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos en las últimas décadas en la lucha para acabar

con la enfermedad, existen muchas brechas que obstaculizan estos esfuerzos, sobre todo en países con recursos limitados.¹⁸

Uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible es poner fin a la epidemia de la TB. Para ello se requieren de acciones intensivas por parte de todos los países, en especial a los territorios con una alta carga de la enfermedad. Reducir el 90% de muertes y disminuir el 80% de la tasa de incidencia para 2030, son objetivos de esta estrategia.¹⁹ Está organizada en tres pilares: atención y prevención centradas en el paciente, políticas audaces y sistemas de apoyo e intensificar la investigación e innovación. Estos pilares deben adaptarse a nivel de cada país y se requiere la implementación de una combinación de actividades biomédicas, de salud pública y socioeconómica, que permitan acelerar la disminución de las tasas globales de incidencia y mortalidad. También se necesita abordar todas las determinantes de la epidemia de TB con compromiso de alto nivel y un enfoque multisectorial.¹⁸

A nivel mundial, la reducción neta en la tasa de incidencia de TB entre el 2015 y en 2023 fue del 8,3%, lejos del objetivo de la Estrategia propuestos para el 2025 (50%). En relación al número de muertes en 2023 respecto al 2015, la reducción es del 23%, casi un tercio del camino hacia el objetivo de la Estrategia (75% en 2025). Las regiones de África y Europa de la OMS logran los mayores avances (reducciones del 42% y el 38%, en ese orden) y 79 países reducen al menos el 20%.²⁰

El 22 de septiembre de 2023, en la reunión de alto nivel sobre la lucha contra la TB, los líderes mundiales reiteran el compromiso de poner fin a la enfermedad y se establecen nuevos objetivos para el 2027. En los avances logrados hasta la

fecha, se informa que el 48% de las personas diagnosticadas con TB se sometieron a una prueba rápida recomendada por la OMS (del 100% estimado para el 2027), con una cobertura del tratamiento del 75% de los casos (90% para el 2027) y un 56% de la cobertura del tratamiento preventivo de la TB latente en personas que viven con VIH (PVV), 90% para el 2027.²⁰

2.2.2 Situación Epidemiológica de la tuberculosis a nivel mundial

La TB es una enfermedad transmisible y la principal causa de muerte en el mundo por un solo agente infeccioso (reemplazando a la COVID-19). El agente causal es el *CMTB*. El contagio se produce cuando la persona enferma expulsa bacterias al aire (por ejemplo, al toser, cantar, hablar). Se estima que una cuarta parte de la población mundial está infectada por TB.²⁰

En el 2023, la tasa de incidencia de TB (casos nuevos por 100 000 habitantes) fue de 134, un aumento de solo 0,2 %, si se compara con el 2022. El número de muertes disminuyó en el 2023. Se estima que 1,25 millones fallecieron por TB, de ellos 1,09 millones entre personas VIH negativas y 161 000 entre PVV. El total fue inferior a las mejores estimaciones de 1,32 millones en 2022 y 1,40 millones en 2020, y por debajo del nivel pre-pandémico de 1,34 millones en 2019.²⁰

Durante el 2023 se diagnostican 8,2 millones de personas en todo el mundo, cifras superiores si se compara con el 2022 (7,5 millones en 2022) y 2019 (7,1 millones) y muy por encima de lo que se informa en 2021 (6,4 millones). Los casos de diagnóstico reciente en 2022 y 2023, es posible que incluyan una acumulación considerable de personas que desarrollaron la TB en años anteriores, pero cuyo diagnóstico y tratamiento se retrasaron debido a la COVID.²⁰

La brecha mundial entre el número estimado de personas que desarrollan la TB y el número notificado de personas de reciente diagnóstico, se reduce a una mejor estimación de 2,7 millones en 2023, frente a 4 millones en 2021, pero por debajo del nivel pre-pandémico de 3,2 millones en 2019.²⁰

2.2.3 Situación Epidemiológica de la tuberculosis en Las Américas

La región de las Américas (Norteamérica, Latinoamérica y el Caribe) es la primera en cumplir la meta definida para el 2015 por los Objetivos de Desarrollo Sostenible de disminuir en 50% la mortalidad y la incidencia de la TB en comparación con 1990. A pesar de este logro, en los últimos años presentan una desaceleración de la tasa de declinación anual de la incidencia de esta enfermedad, en particular en la subregión de Latinoamérica y el Caribe.²¹

En el 2020, durante el primer trimestre, se afecta la prestación de los servicios de salud en general, debido a las medidas de confinamiento, al temor de la población a contagiarse en los servicios de salud y al re-direccionamiento del personal hacia la atención de la pandemia de la COVID 19. Esto afecta a las intervenciones de prevención y control en todos los países. En las Américas se observa un descenso en la notificación de casos del 16,8% en relación con el 2019, entre los 28 países que notifican.²²

En la región en el 2020 se diagnostican 291 000 casos nuevos y recaídas, que representa 3% de la carga mundial, con una tasa de incidencia de 28,5 por 100 000 habitantes. En 2019 se notifican 239 121 casos y en 2020 pasan a 197 364. La brecha entre los casos estimados y notificados casi se duplica en el 2020 con respecto al año anterior (de 52 500 a 93 600 casos). Sin embargo, se evidencian avances en la introducción y expansión de las pruebas moleculares rápidas en la región. Se diagnostican 4007 casos de TB resistente a la RIF (TB-RR) o TB

multidrogoresistente (TB-MDR), de los cuales el 89% inician tratamiento antituberculoso. La proporción de casos de TB-RR estudiados para determinar la resistencia a las fluoroquinolonas disminuye a 29%, en comparación con 53% del año anterior.²²

En cuanto a la TB extensamente resistente (TB-XDR), se diagnostican y notifican 210 casos en 14 países. Se estima que hubo 29 000 casos nuevos (10%) en PVV, así como 27 000 muertes por TB (29% corresponden a PVV). Siete países concentran 80% de los casos con coinfección TB/VIH: Brasil, México, Colombia, Haití, Perú, la República Dominicana y la República Bolivariana de Venezuela.²²

En este panorama, la región no cumple el hito del 2020 y se aleja mucho más para el año 2025. La mortalidad por TB se incrementa de manera importante, pasa de 24 000 decesos en el 2019 a 27 000 en el 2020. En cuanto a la tasa estimada de incidencia, tampoco se cumple el hito del 2020, sin embargo, se mantiene estable en los últimos años, con un descenso promedio anual de 0,10% entre el 2000 y el 2019, y un leve aumento en el último año. Para lograr el hito del 2025, la velocidad de descenso debe ser de 14% anual en los próximos tres años.²²

2.2.4 Situación Epidemiológica de la tuberculosis en Cuba

En Cuba la TB constituye una enfermedad de declaración obligatoria. La evolución de la TB de 1971 a 1991 muestra una tendencia descendente como expresión del resultado de la lucha contra esta enfermedad, el fortalecimiento del Sistema Nacional de Salud y las transformaciones socioeconómicas operadas en el país. Similar situación ocurre con la resistencia a los medicamentos. El reto de PNC es lograr una incidencia anual de un bacilífero

por cada millón de habitantes, equivalente a una prevalencia anual en la población general del uno por ciento.¹⁷

A partir del año 1994, la búsqueda de casos se recupera de forma gradual con una adecuada detección y estudio de sintomáticos respiratorios. La coinfección VIH/TB se incrementa, sobre todo en la provincia de La Habana, donde se evidencian debilidades en la adherencia al tratamiento antirretroviral y la terapia preventiva con la isoniacida en las PVV. Para mejorar algunas de estas deficiencias, se actualiza el manejo de casos en función de las nuevas pautas internacionales y se fortalece el trabajo inter-programático en todos los niveles del sistema de salud.¹⁷

En el país se logra disminuir la tasa de incidencia de la TB, pero en los últimos años mantiene un estancamiento en valores cercanos de seis por 100 000 habitantes. Entre 2004 y 2012 la incidencia de TB en niños menores de 15 años se incrementa desde 0,3 a 0,9 por 100 000 habitantes.²³

En el año 2016 se registran 689 enfermos para una tasa de 5,7 por 100 habitantes.²⁴ En 2017 se notifican 653 casos y en 2018 un total de 651, para una tasa de 5,8 por 100 000, en ambos casos, lo que evidencia un detenimiento del incremento de la TB en ese período.²⁵

En los últimos 5 años se mantiene la tasa de incidencia de TB por debajo de 10 por 100 000 habitantes. En los años 2022 y 2023, se informa una tasa, en todas sus formas, es 6,2 y 6,9 por 100 000 habitantes, en ese orden. La notificación de casos al PNC en el año 2022 es de 719 (662 nuevos y 57 recaídas, y se incrementa a 755 (706 nuevos y 49 recaídas) en el 2023.²

2.2.5 Tuberculosis resistente a fármacos

La TB resistente a los fármacos antituberculosos, es una amenaza para la salud pública y para su control a nivel mundial. Entre 2020 y 2021 se incrementa la carga de TB resistente, con 450 000 casos nuevos con resistencia a RIF. Se estima que el porcentaje de casos con TB-RR y TB-MDR es de 3,6% entre los casos nuevos y 18% entre los pacientes antes tratados. Tres países representan el 42% de los casos globales en 2021: India (26%), la Federación Rusa (8,5%) y Pakistán (7,9%). Las proporciones más altas (>50% de los casos con tratamiento previo y TB RR/MDR se encuentran en la Federación Rusa y en varios países en Europa del Este y Asia Central.²⁶

En 2023, se diagnostican y se tratan a nivel mundial 175 923 personas por TB-MDR o TB-RR; que representa el 44 % de las 400 000 personas que se estima que desarrollaran TB-RR/MDR en 2023.²⁰

2.2.6 Vigilancia de la resistencia a los medicamentos antituberculosos en Cuba

En Cuba, la vigilancia de la resistencia a fármacos antituberculosos comienza en 1982, por el LNR-TB del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. En sus inicios se utiliza el método de las proporciones. Luego se incorporan otras pruebas moleculares para drogas de primera (GenoType® MTBDR*plus*) y segunda línea (GenoType® MTBDR*s*).²⁷

Durante el período del 2010 al 2011, el 95,6 % de los aislados recuperados de casos nuevos y el 72,6 % de los antes tratados, resultan sensibles a la isoniacida y RIF. Se detecta TB-MDR en el 1,03 % para los casos nuevos y este porcentaje se incrementa a 10,3 %, para aislados de pacientes con tratamiento previo. Se

detectan, además, dos aislados con comportamiento extremadamente resistente. De 2012 al 2014 se reporta TB-MDR en el 0,8% de los casos diagnosticados como nuevos y 5,2% de los antes tratados, solo se identifica un aislado con resistencia a drogas de primera y segunda línea. La vigilancia sostenida permite demostrar que la resistencia del *CMTB* a los medicamentos utilizados en el tratamiento de la TB, no constituye un problema de salud en Cuba.^{27,28}

2.3 Taxonomía y características generales de las micobacterias

2.3.1 Taxonomía

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae* orden *Corynebacteriales*, filo/clase *Actinobacteria* y reino *Bacteria*. Posee un solo género: *Mycobacterium* que consta de más de 190 especies que se dividen en tres grupos²⁹:

- Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, incluye: *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. mungi*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, y *M. surricatae*.
- Micobacterias no tuberculosas (MNT): Son aquellas especies de micobacterias diferentes del *CMTB* y se denominan MNT. También son conocidas como micobacterias atípicas o anónimas, o micobacterias distintas de la TB.
- Complejo lepra: incluye *M. leprae* (lepra humana) y *M. leprae – murinum* (lepra en roedores).

Las especies del complejo *CMTB* comparten una identidad de secuencia del 99,9 % y es probable que evolucione a partir de un solo ancestro clonal. La especie

M. tuberculosis sensu stricto causa la gran mayoría de la TB humana en todo el mundo. *M. africanum* causa TB humana en el Occidente África, donde representa hasta el 50% de los casos. *M. canetti* es una causa muy rara de TB humana en el Cuerno de África Oriental.¹⁶

Otros de los patógenos pertenecientes al complejo *CMTB*, como *M. bovis*, causa enfermedades en el ganado y se propaga a través del contacto con animales y el consumo de alimentos no pasteurizados como la leche. Sin embargo, investigaciones sobre el tema demuestran que rara vez puede transmitirse de humano a humano.²⁹

M. caprae es un patógeno del ganado, *M. microti* de los roedores, y se informa que *M. pinnipedii*, afecta a las focas y puede causar una TB zoonótica.¹⁵ La cepa atenuada de *M. bovis*, *M. bovis* BCG (*Bacille Calmette Guérin*), se usan como vacuna en muchos países con alta carga, aunque su eficacia es cuestionable.²⁹

Los avances en el análisis genético, incluida la secuenciación del genoma completo, da una nueva visión más amplia sobre la filogenética del *CMTB*. Estos estudios muestran que *M. tuberculosis sensu stricto* y *M. africanum*, comprenden ocho linajes filogenéticos (L1–L8). Los linajes L1–L4 y L7–L8 pertenecen a *M. tuberculosis sensu stricto*, y L5 y L6 al *M. africanum*. En cuanto a su repartición geográfica, L2 y L4 son las más extendidas, mientras que L1 y L3 se distribuyen de forma intermedia, L5 y L6 se restringen a África Occidental, y L7 se encuentra sólo en Etiopía. *M. africanum* es responsable de hasta el 40% de la TB en África Occidental.²⁹ El linaje de Asia oriental es comúnmente llamada cepa de *Beijing*. Existen evidencias de que diferentes linajes varían en virulencia, transmisibilidad

o capacidad para adquirir resistencia a los medicamentos, pero se necesita más investigación para aclarar la importancia clínica de tales diferencias.¹⁶

Existe otra clasificación de las micobacterias según su infectividad, y se dividen en tres categorías. En la primera categoría se incluyen los patógenos estrictos (*CMTB* y *M. leprae*), que tienen un mayor impacto en la salud pública; en la categoría dos los patógenos oportunistas, como *M. avium* (se encuentran en el medio ambiente y pueden causar enfermedades en personas con condiciones predisponentes o inmunidad comprometidas) y en la categoría tres los saprofitos como *M. gordonae* (son ubicuos y se pueden encontrar en fuentes ambientales, pero rara vez o nunca causan infección).²⁹

2.3.2 Morfología y características de las micobacterias

Las micobacterias son bacilos inmóviles en forma de bastón. Miden de 0,2 - 0,6 por 1-10 μm , en el caso particular de los bacilos tuberculosos se observan como finas estructuras rectas, cilíndricas que miden 0,4 x 3 μm . En medios artificiales pueden observarse en formas cocoides y filamentosas, cuya morfología varía con la especie. Son bacterias no encapsuladas, inmóviles y no producen esporas. Son considerados aerobios estrictos y obtienen la energía de la oxidación de compuestos sencillos del carbono.³⁰

La pared celular es rica en lípidos, sobre todo ácidos micólicos, que le dan la propiedad de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR). Esta denominación es debido a que resisten la decoloración con alcohol ácido después de la tinción con colorantes fenicados como la fucsina. Las micobacterias no deben confundirse con los miembros de los géneros relacionados como la *Nocardia*,

Corynebacterium o *Rhodococcus*, que tienen ácidos micólicos de cadena más corta y pueden teñirse como BAAR.³⁰

2.3.3 Medios de cultivo y características de las colonias de las micobacterias

Los medios para el aislamiento primario de las micobacterias incluyen un cultivo no selectivo y otro selectivo. Los tipos selectivos contienen antibióticos para evitar la proliferación excesiva de bacterias y hongos contaminantes. Se conocen tres fórmulas generales: medio de agar semi-sintético (como el middlebrook 7H10 y 7H11), medios de huevo espesado (Löwenstein Jensen) y los caldos (Middlebrook 7H9 y 7H12).³⁰

La velocidad de crecimiento de las micobacterias es mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. El *CMTB* tiene un tiempo de generación de 18 horas, por lo que necesita de 3 a 4 semanas de incubación a 37 °C, para formar colonias macroscópicas visibles. Las formas saprófitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan bien entre 22-37 °C, producen más pigmento y son menos ácido-resistentes que las formas patógenas. *M. leprae* no crece in vitro.³⁰

Las características de las colonias de diferentes especies varían de acuerdo a la producción de pigmentos, así como la morfología macroscópica y microscópica. Pueden ser rugosas, color hueso crema, elevadas convexas y de bordes irregulares (como *CMTB*); lisas y transparentes (Complejo *M. avium-intracellulare*), o de aspereza intermedia. La temperatura ideal para el crecimiento es de 32-37°C y un pH óptimo entre 6,5 - 6,8. Las micobacterias no tuberculosas se clasifican en dependencia de la producción de pigmentos en: fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmentos),

escotocromógenas (forman pigmento con y sin presencia de luz) y no cromógenas (no producen pigmentos).³⁰

2.3.4 Estructura celular de las micobacterias

Las características más importantes del género *Mycobacterium*, se basan en la complejidad de la pared celular rica en lípidos (50-60%), ver figura 1. Es una barrera efectiva frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales. Está compuesta por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano. Esta estructura es la responsable de muchas de las propiedades características del género: ácido alcohol resistencia, crecimiento lento, resistencia a los detergentes y a los medicamentos antibacilares.³¹

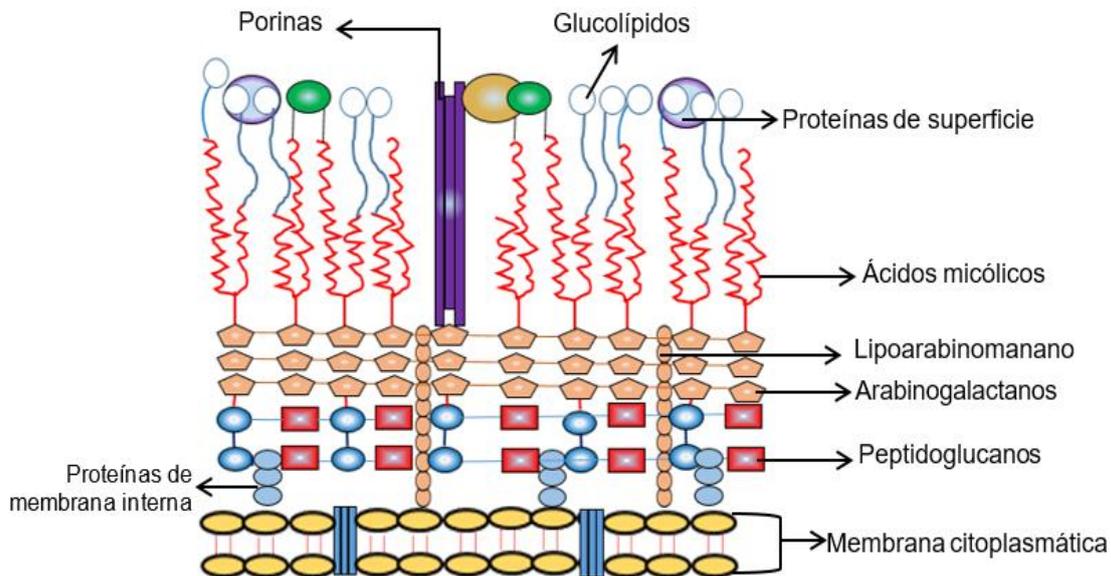


Figura 1. Esquema de la pared celular de las micobacterias. Elaboración propia de la autora.

2.4 Diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis

2.4.1 Pruebas para el diagnóstico de la infección por *M. tuberculosis*

La infección de TB es un estado que se caracteriza por una respuesta inmune persistente a estimulación por antígenos del *CMTB*, sin evidencia de manifestación clínica de la enfermedad. En 2011, la OMS recomienda el uso del ensayo de liberación de interferón-gamma para el diagnóstico de la infección de TB. En el 2018, se actualizan las recomendaciones donde se plantea que este ensayo, la prueba cutánea de la tuberculina, o ambos, se pueden utilizar para la detección de la TB latente y en 2021, se amplían para las siguientes tecnologías: TB-IGRA de Beijing Wantai y QIAGEN QuantiFERON-TB Gold Plus.^{31,32}

2.4.2 Baciloscopía

La BK, en muchos entornos, continúa como la técnica inicial para el diagnóstico de la TB. Es una técnica sencilla y fácil de realizar, sin embargo, la sensibilidad es menor que los métodos de cultivo. El umbral de detección es de 5000-10 000 bacilos por mililitro de esputo para que tengan un 50% de posibilidades de que sea positiva. También influyen otros factores como el tipo de muestra, técnica de coloración utilizada, tiempo dedicado a la observación, así como la actitud y perseverancia del microscopista.³³⁻³⁵

Las dos tinciones más utilizadas son la clásica de ZN, mediante la observación con un microscopio óptico de luz brillante y la tinción con fluorocromos (auramina O) que se observa por un microscopio de fluorescencia convencional, un microscopio de epifluorescencia o un microscopio óptico al que se acopla un adaptador y lo convierte en uno fluorescente.^{34,36}

La tinción fluorescente, con el microscopio de fluorescencia convencional, es 10% más sensible que la tinción de ZN para la detección de BAAR en muestras clínicas. Sin embargo, tiene la desventaja del alto costo de los equipos y que utiliza lámparas de mercurio con una vida útil corta (200 a 300 horas), además necesita de una fuente de alimentación continua y de un cuarto oscuro.³⁷

En la MF LED se sustituye la lámpara de mercurio, que utiliza en el microscopio de fluorescencia convencional, por un diodo emisor de luz. Están disponibles en el mercado varios sistemas comerciales, uno de ellos es el adaptador QBC ParaLens™. Este aditamento convierte cualquier microscopio óptico en un microscopio de fluorescencia. Tiene un diseño único y se divide en dos partes: 1-objetivos de alta calidad 20x y 40x para la observación en seco (para el diagnóstico de TB) y objetivos de 60x y 100x que se utilizan con aceite de inmersión. 2-brazo de filtros desmontables que contiene todos los filtros necesarios para la microscopía de fluorescencia³⁸. Las partes y principios del funcionamiento se muestran y se describen en el anexo 1.

La MF LED tiene la ventaja que la fuente de luz tiene una vida media de 20 000-30 000 horas y no se requiere de una habitación oscura para su funcionamiento. Estudios de evaluación en países de alta carga de TB demuestran que tiene un rendimiento y tiempo de observación del frotis, similar a los microscopios fluorescentes convencionales, que son mucho más caros.^{6,38}

2.4.3 Pruebas diagnósticas recomendadas por la OMS para el diagnóstico de la TB y TB resistente

El cultivo en medios líquidos, es el método de referencia para la confirmación bacteriológica de la TB a partir de muestras clínicas.²⁹ Sin embargo, no se utiliza como prueba diagnóstica primaria en muchos países debido al alto costo, los

requisitos de infraestructura y el período de tiempo requerido para generar resultados. No obstante, la BK y el cultivo siguen siendo necesarios para monitorear la respuesta de un paciente al tratamiento.³²

El cultivo incrementa la confirmación del diagnóstico en el 15-20% del total de casos y en 20-30% en la TB pulmonar. Permite identificar al *CMTB* y realizar las pruebas de sensibilidad fenotípica a los medicamentos antituberculosos y detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. Su rol es de vital importancia en escenarios con mediana o baja incidencia de TB, así como en contextos de alta coinfección TB/VIH.³⁴

Los medios de cultivo sólidos a base de huevos, como el Löwenstein Jensen y el Ogawa, son los más utilizados para cultivo de micobacterias. Las colonias se hacen visibles en un tiempo aproximado de 3 a 4 semanas después que se inocula la muestra y se incuba a 37°C. La introducción de los medios líquidos (Middlebrook 7H9, entre otros) significa una mejora en la recuperación de las micobacterias, con una disminución del tiempo de detección y la obtención de los resultados de las pruebas de sensibilidad.^{39,40}

El método convencional para detectar la resistencia a los medicamentos antituberculosos se basa en pruebas fenotípicas, sin embargo, requieren mucho tiempo para generar resultados debido al lento crecimiento del *CMTB*. A pesar de las desventajas, las pruebas fenotípicas son esenciales para aquellos fármacos, como la bedaquilina, donde no existen pruebas moleculares confiables, y si necesitan de pruebas precisas y reproducibles.^{39,40}

2.4.4 Diagnóstico rápido para la detección de tuberculosis

En las últimas recomendaciones de la OMS, se recomienda la transición de la BK a las pruebas moleculares rápidas como prueba diagnóstica inicial para el diagnóstico de la TB.^{39,40}

Las pruebas de diagnóstico rápido se utilizan como diagnóstico inicial y detecta el *CMTB* o un biomarcador. Las tecnologías aprobadas por la OMS son: 1- reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real, como el Xpert® MTB/RIF Ultra (basada en cartuchos) y Truenat™ (basada en chips), 2- pruebas con sondas en línea, como GenoType® MTBDR*plus* (versiones 1 y 2), el Genoscholar™ NTM+MDRTB II y el GenoType® MTBDR*sl*; 3- amplificación isotérmica mediada por bucles, conocida como TB LAMP; 4- detección de antígenos en un formato de flujo lateral (detección basada en biomarcadores) como el Alere Determine™ TB LAM Ag.^{41,42}

Plataforma GeneXpert

El ensayo Xpert® MTB/RIF, es una RCP en tiempo real, automatizada, integrada y semi-cuantitativa, que utiliza la plataforma GeneXpert (de la Cepheid). Detecta el *CMTB* y las mutaciones más frecuentes en el gen *rpoβ* que se asocian con la resistencia a la RIF en menos de dos horas, a partir de muestra clínicas.³² Tiene un límite de detección de 131 unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra.^{35,42}

Es un sistema cerrado de biología molecular que utiliza cartuchos de un solo uso (ver figura 2). De esta manera se reduce al mínimo el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras y permite realizar un examen con bajos

requerimientos de bioseguridad e infraestructura.^{32,42} (ver anexo 2 para descripción más detallada)

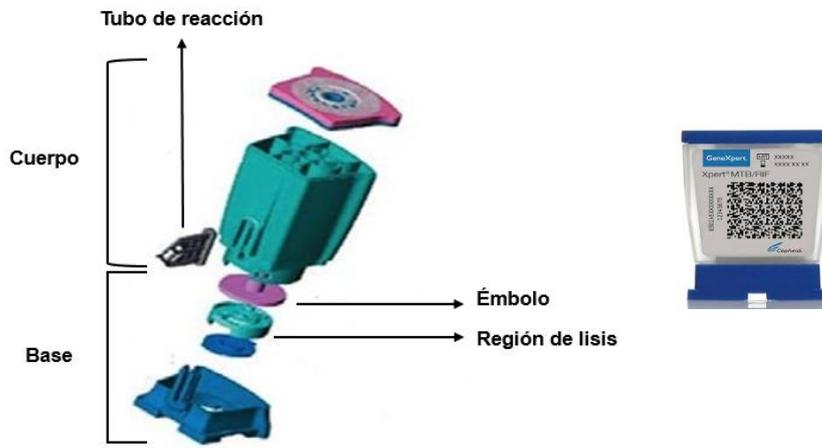


Figura 2. Cartucho Xpert® MTB/RIF y sus componentes. Imagen adaptada de internet por la autora

La prueba molecular utiliza cinco sondas correspondientes a distintos segmentos de la región RRDR del gen *rpoβ* que contienen un fluoróforo reportero, el cual se mantiene apagado por acción del supresor. Cuando estas sondas encuentran su segmento diana, se libera el fluoróforo de la proximidad del supresor y se emite fluorescencia (ver figura 3). El sistema óptico del equipo detecta la luminiscencia y el software interpreta el resultado.^{32,43}

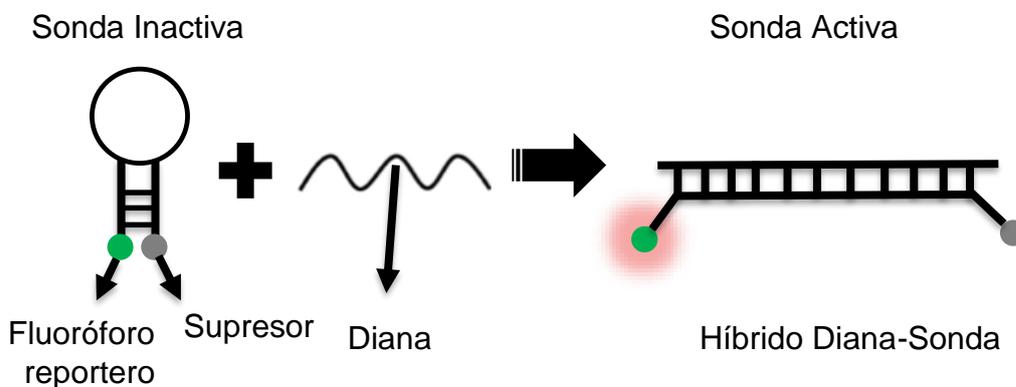


Figura 3. Unión de la sonda inactiva con el segmento diana del ADN. Elaboración propia de la autora

Cuando todas las sondas reconocen a su diana en la secuencia de la región RRDR significa que se detecta el *CMTB*, pero no la resistencia a RIF (no hay mutaciones). Si algunas sondas no se unen a su diana y otras sí, quiere decir que está presente el *CMTB* y alguna mutación en el gen, o sea una resistencia genética a la RIF. Si ninguna de las sondas se une a su diana, no está presente el *CMTB* y la prueba se da como negativa.^{32,43}

El ensayo Xpert® MTB/RIF Ultra utiliza la misma plataforma GeneXpert. Cepheid la desarrolla para superar las limitaciones en la sensibilidad del cartucho Xpert® MTB/RIF. Para ello incorpora dos objetivos de amplificación multicopia (*IS6110* e *IS1081*), la amplificación del ácido nucleico anidada, ciclos térmicos más rápidos, fluidos y enzimas mejoradas. El ensayo tiene un límite de detección de 16-18 bacilos por mililitro de muestra. Para mejorar la precisión en la detección de la resistencia a la RIF, incorpora el análisis basado en la temperatura de fusión. Consta de cuatro sondas que identifican la resistencia a la RIF por mutaciones en el gen *rpoβ* mediante la detección de cambios en la temperatura de fusión lejos del rango de referencia de tipo salvaje.^{32,40}

Ensayos Truenat MTB, MTB Plus y MTB-RIF Dx

Los ensayos Truenat MTB, MTB Plus y MTB-RIF Dx (de la *Molbio Diagnostics*, Goa, India), se pueden utilizar en el mismo nivel de sistema de salud que Xpert® MTB/RIF Ultra. El Truenat MTB y MTB Plus se usan como pruebas iniciales para el diagnóstico de la TB, mientras que MTB-RIF Dx para detectar mutaciones seleccionadas asociadas a la resistencia a la RIF, a partir de muestras de esputo.^{32,40}

Pruebas con sondas en línea (LPA)

Las LPA utilizan tiras reactivas que pueden detectar al *CMTB* y determinar su perfil de resistencia. Se realiza mediante el patrón de unión de productos de amplificación con las sondas que tienen como diana partes específicas del genoma, mutaciones comunes asociadas a la resistencia a los medicamentos o la correspondiente secuencia de ADN de tipo salvaje (no mutada). Son más complejas de realizar que la prueba Xpert® MTB/RIF y Xpert® MTB/RIF ULTRA, sin embargo, detectan la resistencia a una gama más amplia de fármacos de primera y segunda línea, además los resultados se obtienen en 5 horas.^{32,40}

Existen dos grandes grupos: las que detectan el *CMTB* y la resistencia a fármacos contra la TB de primera línea, como el GenoType MTBDR_{plus} (v.1 y v.2) y Genoscholar NTM+MDRTB II; y las que detectan la resistencia a fármacos antituberculosos de segunda línea, como GenoType MTBDR_{sl}.^{32,40}

En 2021 se emite por la OMS, otra clasificación de las nuevas tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de la TB: las automatizadas de complejidad moderada para la detección de TB y resistencia a la RIF e isoniacida, las automatizadas de baja complejidad para la detección de resistencia a isoniacida y agentes antituberculosos de segunda línea y las que se basan en hibridación inversa de alta complejidad para la detección de resistencia a la pirazinamida.⁴⁰

Estas tecnologías se desarrollan en plataformas de alto rendimiento, son más rápidas y menos complejas de realizar que las pruebas de sensibilidad fenotípicas y las LPA. Tienen el potencial de proveer resultados rápidos y precisos.⁴⁰

La plataforma *Abbott Molecular* se conforma de los ensayos el RealTime MTBt para la detección del *CMTB*, que utiliza como diana el elemento de inserción *IS6110* y el gen *pab*. El segundo es RealTime BTT RIF/INH para la detección de resistencia a la RIF e isoniacida, con ocho sondas marcadas con colorantes para detectar mutaciones en la región RRDR del gen *rpoβ* y cuatro sondas para resistencia a la isoniacida (dos sondas para los genes *katG* y dos para la región promotora *inhA*).⁴⁰

La plataforma *Becton Dickinson* es una RCP en tiempo real multiplexada (BD MAX™ MDR-TB). Esta metodología usa cinco sondas para la detección del *CMTB*. Como diana utiliza los elementos genómicos multicopia *IS6110* e *IS1081*, así como un objetivo genómico de una sola copia. Para la detección de resistencia a RIF, la prueba se dirige a los codones RRDR 507–533 *Escherichia coli* nomenclatura (426–452 nomenclatura *CMTB*) del gen *rpoβ*. Para la detección de resistencia a la isoniacida, utiliza la región promotora *inhA* y el codón 315 del gen *katG*.⁴⁰

Otra plataforma es la *Bruker-Hain Diagnostics* (por sus siglas en inglés), que utiliza dos pruebas en tiempo real: el FluoroType® MTB, que detecta *CMTB* y el FluoroType MTBDR, que detecta *CMTB* y resistencia a RIF e isoniacida. Los genes diana son el *rpoβ* para la detección de TB, así como la resistencia a la RIF y el promotor *inhA* y el gen *katG* para detectar la resistencia a la isoniacida. Las plataformas utilizadas para la amplificación y detección son FluoroCycler® para el ensayo MTB y FluoroCycler XT para el ensayo MTBDR.⁴⁰

La plataforma *Roche Diagnostics* dispone de dos ensayos: el *Cobas® MTB* que detecta tanto el ARN ribosómico 16S (ARNr) como los genes *esx* como genes

diana para la detección del *CMTB*. Para detectar la resistencia el Cobas® MTB RIF/INH, usa como diana la región RRDR, para la RIF y región promotora *inhA* y el gen *katG* para la isoniacida.⁴⁰

2.4.5 Pruebas diagnósticas iniciales para el diagnóstico de TB sin detección de farmacoresistencia

Amplificación isotérmica mediada por bucles

El ensayo Loopamp™ *Mycobacterium tuberculosis kit* (Eiken Chemical Company, Tokio, Japón), se basa en la reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles, conocido como TB-LAMP. Se recomienda como prueba de reemplazo de la BK de frotis de esputo en adultos con signos y síntomas compatibles con la TB. Es una prueba manual y la lectura es a simple vista, bajo la luz ultravioleta. Detecta el *CMTB* a partir de muestras de esputo en 1 hora. Tiene la ventaja de que no requiere instrumentación sofisticada, por lo que se puede utilizar en centros de salud periféricos. Sin embargo, no detecta la resistencia a medicamentos, no existen evidencias documentadas de su utilidad en muestras extrapulmonares, ni de su rendimiento para el diagnóstico de la TB en muestras de niños. Por otro lado, tiene poca sensibilidad en muestras de PVV.

32,40,43

Ensayo de flujo lateral para la detección del lipoarabinomano (LAM) en orina

La prueba se basa en la detección del antígeno LAM, lipopolisacárido presente en las paredes celulares de las micobacterias, que se libera metabólicamente activo o por degeneración de células bacterianas durante la enfermedad. La tira disponible en el mercado es el Alere Determine TB LAM Ag (EE.UU.). Este ensayo tiene resultados subóptimos de sensibilidad, por lo que no son adecuados como pruebas diagnósticas. Sin embargo, a diferencia de los

métodos tradicionales, demuestran una sensibilidad mejorada entre las personas coinfectadas con el VIH; y la sensibilidad estimada es aún mayor en pacientes con recuentos de células T CD₄ bajos. Se utiliza para detección TB en pacientes con enfermedad avanzada e inmunosupresión inducida por el VIH, lo que facilita el inicio temprano del tratamiento antituberculoso.⁴⁰

2.4.6 Pruebas basadas en hibridación inversa de alta complejidad para la detección de resistencia a la pirazinamida

La pirazinamida es un antibiótico importante para el tratamiento de la TB sensible debido a su capacidad de erradicar los bacilos persistentes, así como las propiedades sinérgicas con otros antibióticos. La resistencia a este fármaco es rara, sin embargo, con frecuencia se asocia con la TB-MDR y TB-RR. Es importante detectar también la resistencia a este antibiótico, porque es de ayuda a los médicos en la toma de decisión sobre incluir o excluir este medicamento en el tratamiento del paciente.⁴⁰

Las pruebas moleculares para la detección de resistencia se realizan a partir de aislados de pacientes. Una de estas tecnologías es el Genoscholar™ PZA-TB (se desarrolla por la Nipro, Osaka, Japón). Se basa en prueba de hibridación inversa. Cuando se compara con el Genotype MTBDR*plus* y MTBDR*sl*, no incluye una sonda mutante específica. En cambio, tiene como objetivo un fragmento de 700 pares de bases que cubre todo el gen *pncA* y la región promotora hasta el nucleótido-18 del tipo salvaje de la cepa de referencia H37Rv.⁴⁰

2.5 Validación de pruebas diagnósticas

Las pruebas de diagnóstico permiten realizar una valoración más adecuada de la condición clínica de una persona. Determina la presencia o no de una determinada enfermedad y facilita la toma de decisiones en el beneficio del paciente.⁴⁴

En el ámbito clínico, la decisión de incorporar una nueva prueba diagnóstica debe llevar un proceso de validación para determinar su desempeño. Desde la introducción de una nueva prueba, y hasta su incorporación, se lleva un proceso sistemático de evaluación. Se debe tener en cuenta la factibilidad, reproducibilidad, validez, el impacto socioeconómico, así como el contexto clínico donde se aplicará la misma. Un proceso riguroso de evaluación, reduce el número de consecuencias clínicas no deseadas, secundarias a las estimaciones erróneas de la precisión diagnóstica.^{44,45}

La validez de una prueba, es la capacidad diagnóstica de identificar de forma correcta a las personas que presentan o no una determinada enfermedad. Se requiere de la comparación de los resultados de la prueba que se evalúa con la de referencia, que se considera como la más eficaz para establecer el diagnóstico. Se cuantifica con las proporciones de sensibilidad y especificidad. Se expresan en porcentajes, y determina la capacidad de la prueba para clasificar correcta o erróneamente a una persona, según la presencia o ausencia de una enfermedad.^{46,47}

La sensibilidad, es la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad. Es la probabilidad de clasificar de forma correcta a un individuo enfermo. La especificidad, es la capacidad de una prueba para detectar a las personas sanas,

es decir, la proporción de individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo. Indica la utilidad de la prueba para identificar a los individuos que no están enfermos.^{45,47} Sin embargo, la confianza que asignamos a una prueba diagnóstica no depende solo de su validez, se debe tener en cuenta, además, la precisión o fiabilidad de la prueba.^{48,49}

La precisión diagnóstica es el grado de concordancia entre los resultados de la prueba diagnóstica que se evalúa (prueba índice), frente a la prueba de referencia. Es decir, la capacidad de la prueba para reproducir los mismos resultados cada vez que se aplica en condiciones similares.⁴⁸⁻⁵⁰

Los métodos estadísticos más robustos, para determinar la precisión de una prueba, tienen en cuenta la correlación entre sensibilidad y especificidad. Uno de los más usados es la estimación del área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*, por sus siglas en inglés). Las pruebas perfectas, tienen un ABC cercano a 1 y las pruebas con poca discriminación tienen un valor de 0,5. Es la probabilidad de la prueba diagnóstica para clasificar de forma correcta a dos sujetos seleccionados al azar, uno con la enfermedad y otro sin ella. La curva de ROC se utiliza con tres propósitos: a) establecer el punto de corte de una escala continua en el que se alcanza los valores de sensibilidad y especificidad más altos; b) evaluar la capacidad discriminativa de una prueba (capacidad de diferenciar sujetos sanos de sujetos enfermos) y c) comparar la capacidad discriminativa de dos o más pruebas.^{50,51}

Otro parámetro es el índice de Kappa (K). Incluye el cálculo de la concordancia esperada, que incorpora los valores marginales de cada prueba. Un valor de $K=1$ representa una concordancia perfecta, más allá de la intervención de azar, si el

$K=0$, no hay concordancia. En la comparación entre pruebas diagnósticas, se necesita como mínimo un K de 0,50 para indicar un nivel de acuerdo moderado.^{50,51}

En los estudios epidemiológicos hay que tener en cuenta los posibles sesgos inherentes al diseño de la investigación. En la fase 3 de los estudios de validación de una prueba, los sesgos más relevantes son los relacionados con el espectro. Pueden aparecer cuando la prueba de interés se lleva a cabo en una población de estudio con un espectro clínico diferente al que se utiliza en la práctica.⁵²

Los sesgos de selección de los sujetos que participan en el estudio, puede ocasionar una sobreestimación de la sensibilidad o de la especificidad. Es importante tener especial cuidado en el mecanismo de selección; la muestra de participantes debe ser representativa de la población en la que se aplicará la prueba.⁵²

El sesgo más común es el de confirmación diagnóstica. Se produce cuando el estudio se limita a participantes que ya tienen un resultado de la prueba por el método de referencia. Puede pasar que los sujetos tengan la enfermedad y, por tanto, los resultados positivos se ven sobrerrepresentados (sobreestimación de la sensibilidad) y los resultados negativos se subestiman (subestimación de la especificidad). Con frecuencia, los sesgos de espectro y de selección están relacionados y afectan todas las medidas de discriminación.⁵²

En el sesgo de interpretación de las pruebas o sesgo de sospecha diagnóstica, los observadores que aplican la prueba diagnóstica y la prueba de referencia deben emitir los resultados de forma independiente y cegada. Se debe considerar si los resultados de la prueba dependen de la destreza del observador

o si las pruebas se realizan por uno o más observadores, porque puede existir variabilidad inter-observador. Se recomienda que antes del inicio del estudio se realice una capacitación al personal que aplicará o interpretará la prueba.⁵²

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

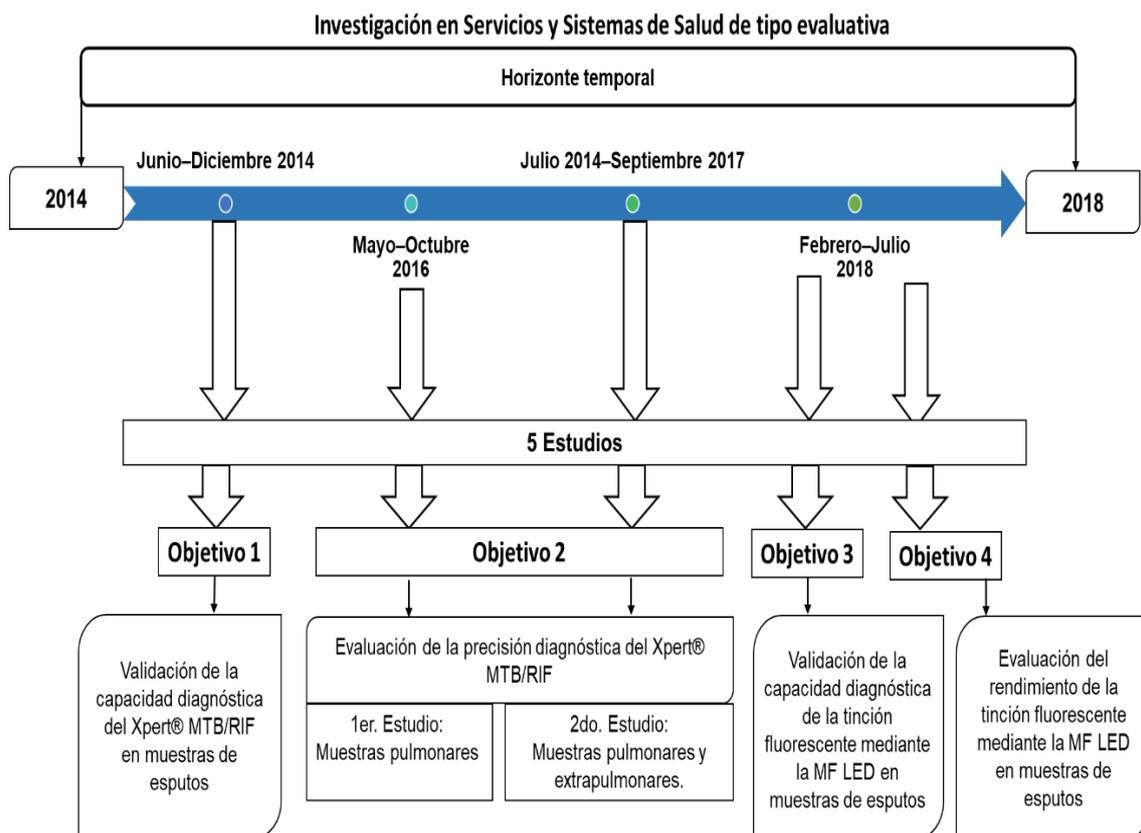
3 CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño general de la investigación

Se realizó una investigación en servicios y sistemas de salud de tipo evaluativa, que se inserta en el PNC de la TB de Cuba. El horizonte temporal abarcó del año 2014 al 2018.

Se conforma el marco de evidencias que soportan la toma de decisión para la introducción de dos técnicas, recomendadas por la OMS, para el diagnóstico rápido de la TB. Se combinan estudios de evaluación de la capacidad y precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para la detección del *CMTB* y de la resistencia a RIF, así como la capacidad diagnóstica y el rendimiento de la tinción fluorescente mediante la MF LED para el diagnóstico de la TB, en el contexto de un país de baja prevalencia, para conocer su factibilidad en las condiciones del laboratorio. Todas las investigaciones se desarrollaron en el LNR-TB de Cuba.

El diseño general de la investigación se muestra en la figura 4.



Legenda: MTB: *Mycobacterium tuberculosis*/ MF LED: microscopía de fluorescencia LED

Figura 4. Diseño general de la investigación

3.2 Población de estudio, técnicas y procedimientos para el procesamiento, cultivo de las muestras e identificación en especies

3.2.1 Población de estudio del ensayo Xpert® MTB/RIF

Este estudio se realizó a las muestras de pacientes de los grupos vulnerables con mayor riesgo de enfermar de TB y desarrollar resistencia a las drogas: contacto de casos de TB pulmonar BK positiva, PVV, pacientes con tratamiento previo, reclusos o exreclusos, personal procedentes de países de alta carga de TB y TB resistente, incluidos extranjeros, niños, individuos con otras enfermedades crónicas con alta sospecha de TB, trabajadores del sector de la

salud relacionados con la atención a enfermos y a personas de unidades con internamiento prolongado. Las muestras se recibieron en el LNR-TB-IPK.

Estudio de validación de la capacidad diagnóstica del Xpert® MTB/RIF

Población estudio: se incluyeron todas las muestras de esputo que se recibieron en el LNR-TB en el período de junio a diciembre del 2014.

Criterios de inclusión: se incluyeron todas las muestras que el frasco estuviera identificado de forma correcta, que los especímenes fueran mucosos o mucopurulentos, con volumen mayor o igual a tres mililitros (mL). Además, que se les realizó el cultivo bacteriológico.

Criterios de inclusión: se excluyeron de la investigación las muestras derramadas y los cultivos contaminados.

Estudio 1. Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF

Población estudio: se incluyeron todas las muestras pulmonares de pacientes con sospecha clínica de TB, que se recibieron en el LNR, de mayo a octubre del 2016, que tuvieron indicación de realizar el ensayo Xpert® MTB/RIF.

Se tuvieron en cuenta los mismos criterios de inclusión y exclusión descritos en el estudio de validación.

Estudio 2. Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF

Población estudio: Se revisaron las bases de datos del LNR-TB IPK (Xpert® MTB/RIF, entrada de muestras del cultivo sólido y líquido). Se incluyeron todas las muestras pulmonares y extrapulmonares que se procesaron desde julio del 2014 a septiembre 2017.

Criterios de inclusión: se incluyeron todas las muestras pulmonares y extrapulmonares de los pacientes que tuvieran resultados válidos de la prueba molecular Xpert® MTB/RIF (*CMTB* detectado/ Resistencia a RIF no detectada, *CMTB* Detectado/ Resistencia a RIF detectada, *CMTB* Detectado/ Resistencia a RIF indeterminada y *CMTB* No Detectado) y se les realizó, al mismo tiempo, la BK por tinción de ZN y cultivo bacteriológico (medio sólido o líquido).

Criterios de exclusión: se excluyeron de la investigación las muestras que tuvieron resultados de cultivos contaminados o no realizados.

3.2.2 Población de estudio de la tinción fluorescente por MF LED

Estudio de validación la capacidad diagnóstica de la MF LED

Para este estudio se siguió la metodología de Minion y cols.⁵⁴

Población estudio: todas las muestras de esputo que se recibieron en el LNR-TB de febrero a julio del 2018.

Criterios de inclusión: se incluyeron los esputos que el frasco estuviera identificado de forma correcta, que los especímenes fueran mucosos o mucopurulentos, con volumen mayor o igual a tres mililitros (mL). Se esperó el resultado del cultivo. Se incluyeron todas las muestras que tuvieron resultados positivos al *CMTB* y la misma cantidad con cultivos negativos.

Criterios de exclusión: se excluyeron de la investigación las muestras derramadas y los cultivos contaminados.

Evaluación del rendimiento de la tinción fluorescente mediante la MF LED

La población estudio fue igual a la que se describió en el acápite de validación de la MF LED.

En el diagrama siguiente se describe la distribución de muestras estudiadas por objetivos de la investigación.

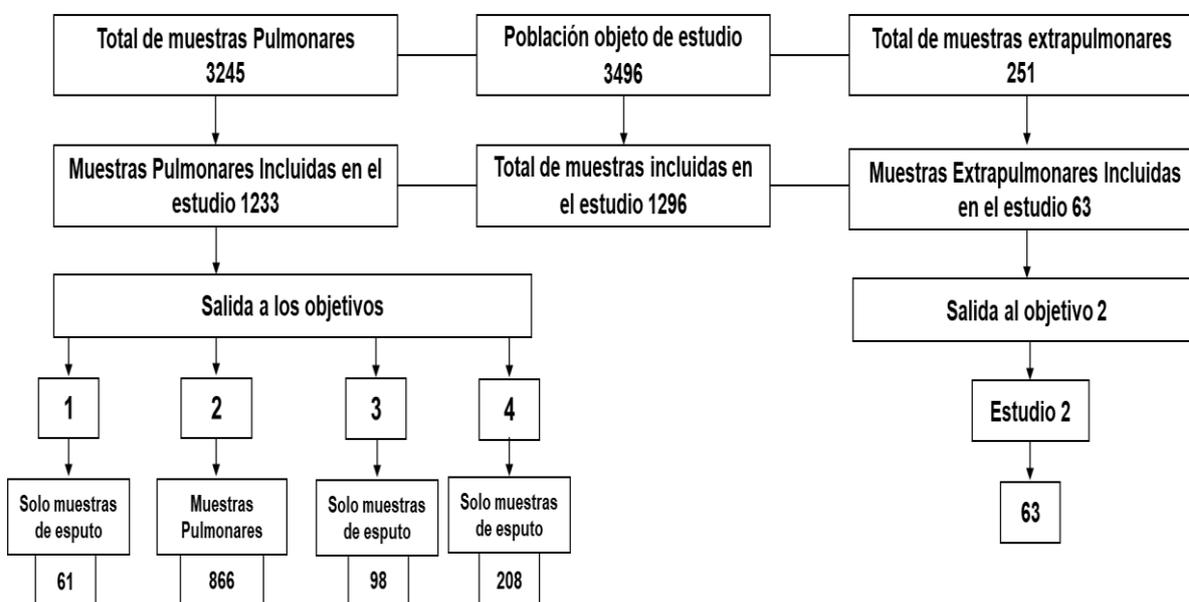


Figura 5. Distribución de muestras estudiadas por objetivos de la investigación

En los anexos del 3 y 4 se describen los algoritmos diagnósticos seguidos por cada técnica.

3.3 Técnicas y procedimientos

Para dar salida al objetivo 1

Xpert® MTB/RIF. Procedimientos para realizar el ensayo

Cada espécimen se dividió en dos alícuotas, un mL se destinó para realizar la prueba molecular (Xpert® MTB/RIF) y el restante de las muestras para procesar para BK por tinción de ZN y el cultivo bacteriológico. (Anexo 5)

El procesamiento de las muestras para el ensayo molecular se realizó según se muestra a continuación:

1. Se adicionaron dos mL del reactivo de muestra del Xpert® MTB/RIF a un mL de esputo.
2. Se dio vórtex por 2 a 3 segundos. Se dejó actuar por 10 minutos.

3. Luego se dio vórtex. Se esperó por 5 minutos más.
4. Con la pipeta estéril se transfirieron 2 mL del esputo tratado al cartucho Xpert® MTB/RIF.
5. Se cargó el cartucho al equipo y se esperó la salida de los resultados de la prueba (1 hora y 50 minutos)

Los resultados se clasificaron como sigue, de acuerdo a las salidas del software del equipo GeneXpert (Anexo 5) en:

- *CMTB* detectado/ Resistencia a RIF no detectada.
- *CMTB* Detectado/ Resistencia a RIF detectada.
- *CMTB* Detectado/ Resistencia a RIF indeterminada.
- *CMTB* No Detectado.
- Prueba Invalidada.
- Error al correr prueba.

Procedimientos para realizar la baciloscopía de ZN, procesamiento de las muestras para el cultivo bacteriológico e identificación en especie

La tinción de la BK, cultivo e identificación en especie, se realizó según lo que establece el PNC¹⁷ y los procedimientos técnicos normados de operación del laboratorio.

Baciloscopía por tinción de ZN

El marcado del portaobjeto: se utilizó el número asignado en el libro de registro del laboratorio y se escribió en el extremo de un portaobjetos (nuevo) con un marcador permanente. Se aseguró que el número de cada extendido correspondiera con el asignado a la muestra.

El extendido de la lámina: se realizó en los dos tercios de la lámina. Con asa desechable estéril de 5 mm de diámetro, se tomó la partícula más purulenta y se

extendió en forma de rectángulo en el portaobjetos. Se aseguró que fuera de forma homogénea y sin tocar los bordes. Se dejó secar al aire y se fijó a través de una llama de mechero de bunsen de tres a cinco veces de tres a cuatro segundos cada una.

Tinción de ZN: se adicionó fucsina básica fenicada filtrada y se aplicó calor hasta la emisión de vapores. Se dejó actuar por cinco minutos. Se enjuagó con agua. Seguido se decoloró con alcohol ácido al 3% por dos minutos. En el paso siguiente se enjuagó con agua. Luego se aplicó el azul de metileno al 0,1% por 45 segundos a un minuto. Se enjuagó con agua y se dejó secar al aire.

La lectura de las láminas se realizó con el microscopio óptico modelo AxioStar plus. La observación y codificación de los frotis se realizó según el número de BAAR vistos en cuatro líneas (dos horizontales y dos verticales), como sigue.

Número de BAAR	Codificación
Ningún BAAR en 4 líneas recorridas	0
1-5 BAAR en 4 líneas recorridas	El propio número
6-24 en 4 líneas recorridas	6
≥ 25 BAAR en 4 líneas recorridas	7
≥ 25 BAAR en una línea recorrida	8
BAAR en la mayoría de los campos	9

Leyenda: BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes

En la figura 6 se muestra como se observan los BAAR con la tinción de ZN.

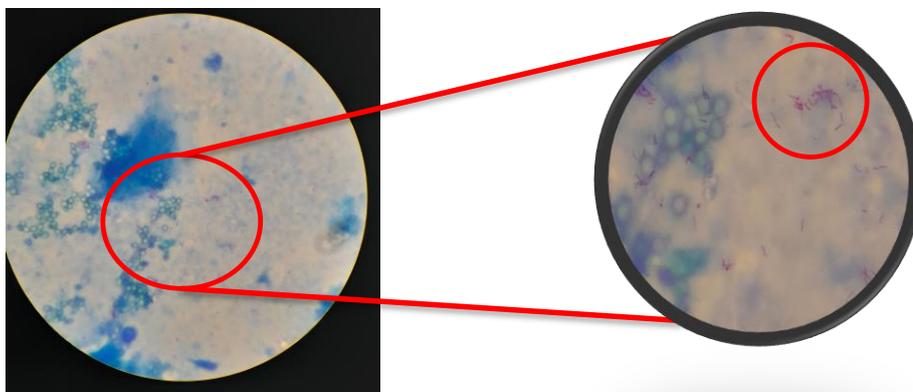


Figura 6. Observación de bacilos ácido alcohol resistentes con el microscopio de luz brillante. Elaboración propia de la autora

Procesamiento de las muestras para cultivo

Las muestras de esputos se descontaminaron por el método de Petroff modificado con solución salina. A dos mL de muestra, se adicionó la misma cantidad de NaOH al 4%. Se homogenizó con vórtex y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3000 gravedades (g) durante 15 minutos (min.). Posterior a este paso se decantó el sobrenadante. Se agregó 15 mL de solución salina fisiológica y se centrifugó por segunda ocasión a la misma velocidad. Una vez terminada la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se re-suspendió el sedimento en dos mL de solución salina fisiológica.

Inoculación en los medios de cultivo

Después del proceso de descontaminación se inoculó, de forma simultánea, en el medio de cultivo sólido Löwenstein Jensen y en el medio líquido (Sistema automatizado Bact ALERT 3D). La elaboración de medio de cultivo sólido, se describe en el anexo 6.

Medio de cultivo sólido Löwenstein Jensen: con una pipeta estéril se transfirieron 0,2 mL del sedimento re-suspendido a dos tubos de medio. Se incubó a 37°C. La lectura de los cultivos se realizó semanal, durante ocho semanas. En los tubos donde se observó crecimiento, se le realizó la tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR. En el caso que la tinción resultó positiva a micobacterias se realizó la codificación del cultivo, según el número de colonias, como se muestra a continuación:

No. de colonias	Codificación
Ninguna	Negativo
1-5 colonias	El propio número
6-24 colonias	6
25-100 colonias	7
Más de 100 colonias	8
Crecimiento confluyente	9

Sistema automatizado Bact ALERT 3D (medio líquido)

Previo a la inoculación de la muestra tratada, se adicionó el antibiótico a la botella MP. Primero, el antibiótico liofilizado se reconstituyó en 10 mL del fluido de reconstitución, según las instrucciones del fabricante⁵³. Luego se descontaminó la parte superior de la botella MP con alcohol al 70%. Se adicionó, con jeringa estéril, 0,5 mL del antibiótico reconstituido a la botella. Después, con jeringuilla estéril, se inocularon 0,5 mL de la muestra tratada y descontaminada. Se volvió a descontaminar la parte superior de la botella con alcohol al 70% y se cargó al equipo Bact/ ALERT 3D.

De las botellas presuntas positivas que se detectaron por el Bact/ ALERT 3D, se extrajo un mL, con una jeringuilla estéril, y se transfirió a un tubo con tapa de

rosca de 15 mL. Luego se centrifugó a la velocidad de 3000 g por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y al sedimento se le realizó una tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.

Una vez que se confirmó la presencia de micobacterias, tanto por el medio sólido como líquido, se procedió a la identificación en especie mediante la tira SD BIOLINE, ensayo inmunocromatográfico para la detección de la Ag MPT64 (presente sólo en el *CMTB*).

En los casos donde la tinción fue negativa por el medio líquido, se transfirieron 0,2 mL de la botella a un tubo de LJ y se incubó a 37°C por cuatro semanas. Si en ese tiempo no se obtuvo crecimiento se definió el cultivo como negativo. De haber crecimiento, se realizó la tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.

Identificación en especies. Ensayo inmunocromatográfico SD BIOLINE

El procedimiento se realizó según las normas del fabricante (ver anexo 7).

Aislados del cultivo sólido: con asa estéril se tomaron de 3 a 4 colonias y se re-suspendieron en 200 microlitros (μL) del tampón (suministrado por el fabricante). Se adicionó 100 μL de la suspensión bacteriana en la ventana para inocular la muestra de la tira SD BIOLINE.

Botellas MP positivas a micobacterias: se extrajeron 100 mL con jeringa estéril y se depositaron en la ventana para inocular la muestra de la tira SD BIOLINE.

La lectura e interpretación de los resultados del ensayo inmunocromatográfico se realizó a los 15 minutos, como se describe a continuación:

- La presencia de una sola banda color fucsia en la banda control (C) correspondió a un resultado negativo de la prueba. Identificación de una micobacteria no tuberculosa.
- La presencia de las dos bandas color fucsia en la banda C y la banda de la muestra (T) correspondió a un resultado positivo de la prueba. Identificación del *CMTB*.
- La no aparición de ninguna banda (C o T), o sólo la de la muestra (T) y no aparece la banda C. El resultado se interpretó como no válido. En ambas situaciones se repitió la prueba.

Los aislados de cultivos del medio sólido o los subcultivos de la botella MP donde se identificó el *CMTB*, se transfirieron a la sección de resistencia para el estudio de susceptibilidad a la RIF por los métodos fenotípicos.

Para dar salida al objetivo 2

Estudio 1. Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF

A todas las muestras se les realizó el ensayo Xpert® MTB/RIF, la BK por tinción de ZN y cultivo bacteriológico. Los procedimientos se describieron en el acápite anterior (Para dar salida al objetivo 1). En el caso de los líquidos pleurales se inocularon de forma directa en los medios de cultivo (sólido y líquido).

Todos los aislados identificados como *CMTB*, se pasaron a la sección de resistencia para el estudio de susceptibilidad a la RIF por los métodos fenotípicos.

Estudio 2. Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF

Se confeccionó una base de datos con las muestras pulmonares y extrapulmonares de los pacientes que se incluyeron en el estudio, para el luego realizar el análisis de los resultados.

Para dar salida al objetivo 3

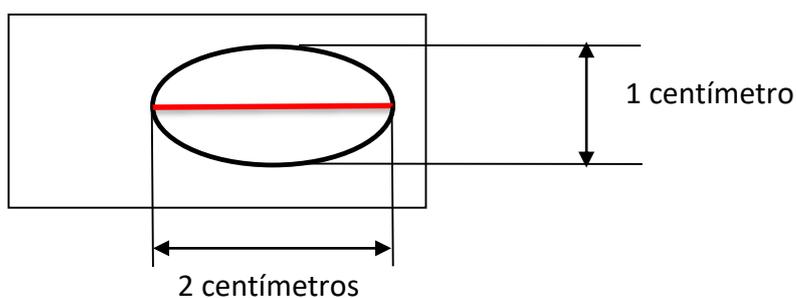
Procedimientos para realizar la tinción de ZN, tinción fluorescente y lectura de las láminas

El procesamiento de las muestras para realizar la tinción de ZN y fluorescente, la lectura de las láminas (en cruces), para ambos tipos de tinciones, se realizó de acuerdo a las normas internacionales.³⁴

Tinción de ZN

Para el marcado del portaobjeto se utilizó el número asignado en el libro de registro del laboratorio y se escribió en el extremo de un portaobjetos (nuevo) con un marcador permanente o un lápiz con punta de diamante; se aseguró que el número de cada extendido correspondiera con el asignado a la muestra.

Para hacer el extendido se utilizó un asa desechable estéril de 5 mm de diámetro, se tomó la partícula más purulenta. Se realizaron dos extendidos en forma de óvalo, de dos centímetros de largo por uno de ancho. Se aseguró que la extensión se realizara de forma homogénea.



Luego de dejó secar al aire y se fijó a través de una llama de mechero de bunsen de tres a cinco veces por cinco segundos cada una. A continuación, los frotis (sin colorear) se guardaron en cajas de láminas, dispuestas para este fin, en un lugar seco y fresco del laboratorio hasta obtener los resultados del cultivo.

Tinción de ZN: La tinción de las láminas se realizó igual a la que se describió en el acápite Para dar salida al objetivo 1.

Tinción fluorescente con Auramina O

Las preparaciones de los colorantes para la tinción fluorescente y control de calidad de los reactivos se describen en el anexo 8.

Se cubrió el frotis con el colorante Auramina O al 0,1% filtrada y se dejó reposar durante 20 minutos. Se aclaró el frotis con agua y se escurrió la lámina. Se cubrió el portaobjeto con el agente decolorante (alcohol ácido al 5%) y se dejó reposar durante 1 o 2 minutos. Se aclaró de nuevo el frotis con agua y se escurrió. Se cubrió el extendido con la solución de permanganato de potasio (tinción de contraste) dejándolo actuar durante 1 minuto. Se enjuagó el frotis con agua y se escurrió la lámina. Luego se dejó secar al aire libre y al abrigo de la luz (Anexo 9).

Lectura de las láminas

La lectura de los frotis por la tinción de ZN y fluorescente se realizó en cruces.

La lectura por tinción de ZN se realizó con el microscopio Axiostar plus.

La lectura de las tinciones fluorescentes con auramina O se realizaron por:

- La MF LED en el microscopio PrimoStar plus (con el adaptador ParaLens QBC; lente de 40x).

- Microscopía de fluorescencia convencional en el microscopio de fluorescencia Olympus modelo BX41.

En la figura 7 se muestra como se observan los BAAR con la tinción fluorescente (microscopio de fluorescencia LED y fluorescencia convencional).

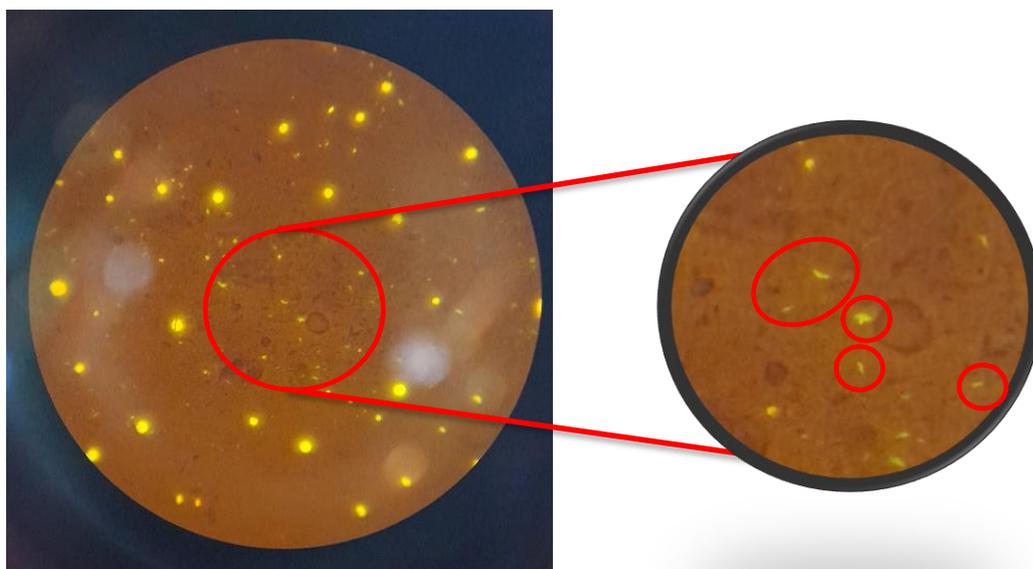


Figura 7. Observación de bacilos ácido alcohol resistentes con microscopio de luz brillante. Elaboración propia de la autora

La codificación de la lámina para la tinción de ZN y fluorescentes con Auramina O se realizaron según las normas internacionales³⁴, como sigue:

Tinción de ZN	
Informe	Número de BAAR observados por campo óptico (CO)
Negativo (-)	No se encuentran BAAR en los 100 CO
Nº BAAR en 100 CO	Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 CO
Positivo +	Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 CO
Positivo ++	De 1 a 10 BAAR por campo en 50 CO
Positivo +++	Más de 10 BAAR por campo en 20 CO

Tinción fluorescente con Auramina O	
Informe	Lectura con lente de 40 X
No se observan BAAR	0 BAAR en una 1 línea
1- 2 BAAR en una línea	Se requiere confirmación
Positivo escasos o paucibacilar	3-24 BAAR en una línea
Positivo +	1-6 BAAR por campo óptico
Positivo ++	7-60 BAAR por campo óptico
Positivo +++	>60 BAAR por campo óptico

El procesamiento de las muestras para el cultivo, la inoculación y la identificación en especie, se realizó igual a como se describe el acápite Para dar salida al objetivo 1.

Para dar salida al objetivo 4

Procedimientos para realizar la tinción de ZN, tinción fluorescente y lectura de las láminas

Los procedimientos para realizar la tinción de ZN y fluorescente, lectura y codificación de las láminas se realizó como se describe en el acápite anterior (Para dar salida al objetivo 3)

El procesamiento de las muestras para el cultivo, inoculación e identificación en especie, se realizó igual a como se describe el acápite Para dar salida al objetivo 1.

3.4 Procesamiento y análisis de la información

3.4.1 Ensayo Xpert® MTB/RIF. Evaluación de la capacidad y la precisión diagnóstica

Detección del *CMTB*: se incluyeron las muestras pulmonares y extrapulmonares con resultados válidos del Xpert® MTB/RIF: *CMTB* detectado/ Resistencia a RIF no detectada, *CMTB* detectado/ Resistencia a RIF detectada y *CMTB* no detectado y *CMTB* detectado/ Resistencia a RIF indeterminada, que a su vez tuvieron resultados de la BK y del cultivo bacteriológico (prueba de referencia) con resultado positivo al *CMTB*.

Detección de la resistencia a RIF: Se solicitaron los resultados del patrón de susceptibilidad/resistencia por métodos fenotípicos, a la sección de resistencia del LNR. En este análisis no se incluyeron los aislados contaminados.

3.4.2 Tinción fluorescente mediante microscopía de fluorescencia LED Evaluación de la capacidad diagnóstica y rendimiento de la técnica

Se compararon los resultados de la tinción fluorescente mediante la MF LED, con los de la tinción de ZN y la tinción fluorescente por la microscopía de fluorescencia convencional, en cuanto a la detección del *CMTB*.

Se estimó el nivel de concordancia entre los resultados de las BK mediante el índice de Kappa (K), según lo que sugiere Landis y Koch⁵⁵, como se muestra a continuación.

Índice de Kappa	Nivel de concordancia
<0,00	Sin acuerdo
0,01- 0,20	Baja
0,21- 0,40	Aceptable
0,41- 0,60	Moderada
0,61- 0,80	Buena
0,81- 1,00	Muy buena

3.5 Análisis de la información

Para el ensayo Xpert® MTB/RIF y la tinción fluorescente mediante microscopía de fluorescencia LED

Se utilizó el programa estadístico para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDAT, versión 3.1, en con un intervalo de confianza del 95%. Se utilizó el cultivo como prueba de referencia. Se calcularon:

1. Los indicadores de desempeño (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, índice de validez y de Youden) para todas las técnicas diagnósticas.
2. Se calcularon los porcentajes de detección de: el ensayo Xpert® MTB/RIF, la tinción fluorescente, BK y el cultivo. Se compararon los resultados para conocer si hubo significación, desde el punto de vista estadístico (inferencia sobre parámetros de dos poblaciones, con proporciones independientes).
3. En el estudio de exploración del rendimiento de la tinción fluorescente mediante MF LED, se calculó el área bajo la curva de ROC de la tinción

fluorescente y la de ZN, para evaluar la capacidad discriminativa de ambas técnicas para el diagnóstico de la TB.

3.6 Control de sesgos

1. La autora recibió entrenamientos en el diagnóstico de la TB en ambas técnicas (ver anexo 10).
2. Se revisaron las bases de datos, para minimizar y corregir los errores.
3. El uso de guías nacionales e internacionales para los procedimientos permitió garantizar la validez del estudio y la comparabilidad con reportes internacionales.
4. Cuba es un país de baja carga de TB. En los estudios de evaluación de la tinción fluorescente, para disminuir el sesgo de clasificación, se esperó el resultado del cultivo bacteriológico.

3.7 Operacionalización de las variables

Variables	Tipo de variable	Categoría de la variable	Definición operacional
Objetivo 1			
Espustos	Cualitativa Nominal	mucosos, mucopurulentos	Expectoración procedente del árbol respiratorio
Codificación tinción de Zielh Neelsen (Según el PNC)	Cuantitativa discreta	Ningún BAAR en 4 líneas recorridas: Cod 0 1-5 BAAR en 4 líneas recorridas: el propio número 6-24 en 4 líneas recorridas: Cod 6 ≥ 25 BAAR en 4 líneas recorridas: Cod 7 ≥ 25 BAAR en una línea recorrida: Cod 8 BAAR en la mayoría de los campos: Cod 9 Ningún BAAR en 4 líneas recorridas: Cod 0	Codificación numérica según número de BAAR vistos 4 líneas recorridas
Objetivo 2. Estudio 1			
Muestras pulmonares	Cualitativa Nominal	Espustos, lavados bronquiales, cepillados bronquiales, contenido gástrico y líquido pleural (si se demuestra afección del parénquima pulmonar), espustos inducidos.	Muestras procedentes del árbol respiratorio
Grupos vulnerables	Cualitativa Nominal	Contactos de TB PVV Pacientes con tratamiento previo Reclusos o exreclusos Personal procedente de países de alta carga de TB y TB resistente Extranjeros Niños Personas con otras enfermedades crónicas y alta sospecha de TB Trabajadores del sector de la salud relacionados con la atención a enfermos Personas de unidades con internamiento prolongado	Grupos de personas con mayor riesgo de enfermar de TB y TB resistente
Objetivo 2. Estudio 2			
Muestras pulmonares	Cualitativa Nominal	Espustos, lavados bronquiales, cepillados bronquiales, contenido gástrico y líquido pleural (si se demuestra afección del parénquima pulmonar), espustos inducidos.	Muestras procedentes del árbol respiratorio
Muestras expulmonares	Cualitativa Nominal	Biopsias de tejidos, líquidos corporales (pleural, ascítico, pericárdico, líquido cefalorraquídeo, sinovial, etc), secreciones, etc	Muestras no procedentes del árbol respiratorio
Comunes a los objetivos 1 y 2			
Resultados del ensayo Xpert® MTB/RIF	Cualitativa Nominal	CMTB detectado/ Resistencia a RIF no detectada. CMTB Detectado/ Resistencia a RIF detectada. CMTB Detectado/ Resistencia a RIF indeterminada CMTB No Detectado Prueba Invalidada Error al correr prueba	Resultado emitido por el software del GeneXpert. Presencia o no del CMTB y si hay o no mutación en el gen rpoB
Espustos	Cualitativa Nominal	mucosos, mucopurulentos	Expectoración procedente del árbol respiratorio
Comunes a los objetivos 3 y 4			
Codificación tinción fluorescente (en cruces)	Cuantitativa discreta	0 BAAR en una 1 línea: Negativo Se requiere confirmación: 1-2 BAAR en una línea 3-24 BAAR en una línea: positivos escasos o paucibacilar 1-6 BAAR por campo óptico (CO): positivo + 7-60 BAAR por CO: positivo ++ > 60 BAAR por CO: positivo +++	Codificación numérica según número de BAAR vistos en 100 CO
Codificación tinción de Zielh Neelsen (en cruces)	Cuantitativa discreta	No se encuentran BAAR en los 100 CO: negativo Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 CO: número de BAAR vistos en 100 CO Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 CO: positivo 1+ De 1 a 10 BAAR por campo en 50 CO: positivo 2++ Más de 10 BAAR por campo en 20 CO: positivo +++	Codificación numérica según número de BAAR vistos en 100 CO
Comunes a los objetivos 1, 2, 3 y 4			
Especies de micobacterias	Cualitativa Nominal	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Micobacterias no tuberculosas</i>	Género <i>Mycobacterium</i>

3.8 Consideraciones éticas

- La investigación cumplió los principios éticos para la investigación médica en seres humanos, establecidos en la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki, en la 75th Asamblea General, que se celebró en octubre del 2024.⁵⁶
- Se cumplieron los principios éticos de autonomía, beneficencia y no maleficencia.
- La información individual relacionada con los sujetos quedó custodiada y se garantizó la absoluta confidencialidad de los datos personales.
- Los protocolos de investigación de los estudios se evaluaron por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y de Ética del IPK (ver anexo 11).
- El estudio se realizó en el LNR-TB, del IPK, que dispone del personal calificado y los recursos materiales necesarios, que permitió realizar esta investigación.
- El trabajo se llevó a cabo en gabinetes de seguridad clase II (certificados), según la clasificación del Centro Nacional de Seguridad Biológica de Cuba para el trabajo con micobacterias.
- El personal del laboratorio dispuso de los equipos de protección personal para el trabajo con micobacterias: respirador N95, protectores oculares, batas y, frascos trampas para evitar la producción de aerosoles y materiales desechables (asas, frascos).
- Se estableció un plan de comunicación de los resultados a través de publicaciones científicas, de acuerdo con lo establecido en las normas éticas para la investigación.

3.9 Estructura de la tesis y presentación de los resultados

Los resultados se presentan en tablas y gráficos de acuerdo a las sugerencias de normas internacionales de las guías STROBE⁵⁷ para estudios observacionales.

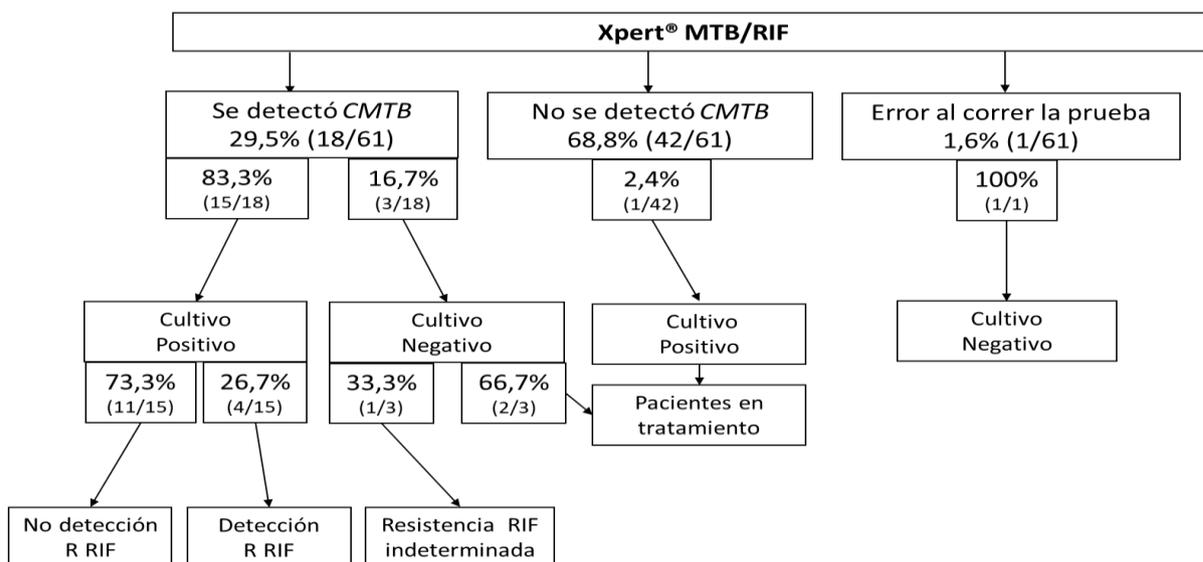
CAPÍTULO 3. RESULTADOS

4 CAPÍTULO 3. RESULTADOS

4.1 Validación de la capacidad diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para la detección del *CMTB*.

El ensayo Xpert® MTB/RIF detectó el *CMTB* en el 29,5% (18/61) de las muestras. De ellas, el 83,3% (15/18) tuvo confirmación bacteriológica. De las 15 muestras positivas por el cultivo, en el 73,3% (11/15) no se detectó la resistencia a la RIF por la prueba molecular y el 26,7% (4/15) fueron resistentes a este fármaco (Figura 8).

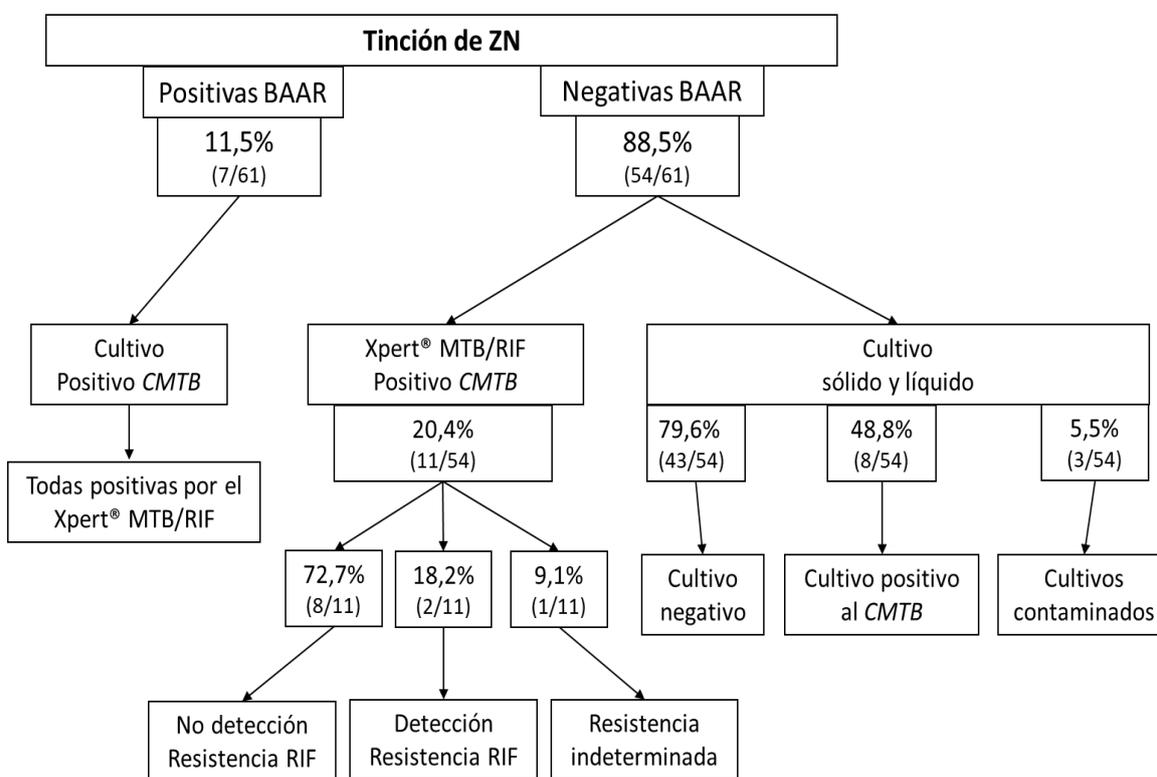
En el 16,7% (3/18) de los esputos, resultó positivo al *CMTB* por el ensayo molecular, pero no se confirmó el agente etiológico por el cultivo. De ellos, en el 33,3% (1/3) la resistencia fue indeterminada y el 66,7% (2/3) correspondieron a pacientes en seguimiento del tratamiento. En el 68,8% (42/61), no se detectó el *CMTB* por la prueba molecular; el 2,4% (1/42) fue positiva por el cultivo (figura 8).



Leyenda: *CMTB*: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*/ ZN: Zielh Neelsen/ RIF: rifampicina/ R: resistencia

Figura 8. Resultados del ensayo Xpert® MTB/RIF en relación al cultivo bacteriológico

La BK por tinción de ZN resultó positiva a BAAR en el 11,5% (7/61) de las muestras investigadas. Todas fueron positivas al *CMTB* por el cultivo y por la prueba molecular. La BK por ZN fue negativa en el 88,5% (54/61). De los frotis identificados como negativos por la tinción de ZN, el 20,4% (11/54) se detectaron como positivas al *CMTB* por el Xpert® MTB/RIF. En el 72,7% (8/11) de ellas, no se detectó resistencia a la RIF, el 18,2% (2/11) fue resistente al fármaco y en el 9,1% (1/11) la resistencia fue indeterminada. Del total de frotis negativos por la BK, el cultivo fue negativo en el 79,6% (43/54), en el 48,8% (8/54) se confirmó el agente patógeno de la TB y el 5,5% (3/54) resultó contaminado (Figura 9).



Leyenda: *CMTB*: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*/ ZN: Zielh Neelsen/ RIF: rifampicina/ BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes

Figura 9. Resultados de la tinción de ZN en relación al Xpert® MTB/RIF y el cultivo

Las diferencias entre los porcentajes de detección del *CMTB* del Xpert® MTB/RIF en relación a la BK resultaron estadísticamente significativas ($p=0,02$).

El ensayo Xpert® MTB/RIF y el cultivo en Löwenstein Jensen fueron positivas al *CMTB* en el 25,0% (13/52) de las muestras testadas. Fueron negativas, por ambas técnicas, en el 67,3% (35/52). El 1,9% (1/52) de las muestras fue negativa la prueba molecular, pero se detectó crecimiento del *CMTB* en el cultivo. En el 5,8% (3/52), el ensayo fue positivo, pero no se aisló el agente patógeno (tabla 1).

El ensayo molecular resultó positivo por el cultivo líquido en el 26,3% (15/57) de las muestras. Fueron negativas por ambas metodologías el 68,4% (39/57). En el 5,3% (3/57), la prueba molecular fue positiva al *CMTB*, pero negativa por el cultivo líquido (Bact ALERT). No se detectaron resultados negativos por el Xpert® MTB/RIF, que resultaran positivas por el cultivo líquido (tabla 1).

Tabla 1. Resultados del ensayo Xpert® MTB/RIF según los resultados del cultivo, junio a diciembre 2014. LNR-TB-IPK

		Métodos de Cultivo (Referencia)					
		Löwenstein Jensen			Líquido Bact ALERT 3D		
		Positivos <i>CMTB</i>	Negativos <i>CMTB</i>	Total	Positivos <i>CMTB</i>	Negativos <i>CMTB</i>	Total
Ensayo Xpert® MTB/RIF	Positivos <i>CMTB</i>	25,0% (13/52)	5,8% (3/52)	30,8% (16/52)	26,3% (15/57)	5,3% (3/57)	31,6% (18/57)
	Negativos <i>CMTB</i>	1,9% (1/52)	67,3% (35/52)	69,2% (36/52)	0,0% (0/57)	68,4% (39/57)	68,4% (39/57)
	Total	26,9% (14/52)	73,1% (38/52)	100,0% (52/52)	26,8% (15/57)	73,7% (42/57)	100,0% (57/57)

Leyenda: *CMTB*: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Los resultados de la tinción de ZN en comparación con el cultivo sólido muestran que la BK fue positiva por ambos métodos en el 11,3% (6/53) de las muestras. Las dos técnicas resultaron negativas en el 71,7% (38/53). La BK fue negativa y no se identificó el *CMTB* por el cultivo en el 13,8% (8/53). Se detectó que el 1,9% (1/53) resultó positiva por la tinción de ZN, sin embargo, el cultivo fue negativo (tabla 2).

La tinción de ZN y el cultivo líquido fueron positivas a BAAR en el 12,1% (7/58) de los esputos. Fueron negativas por ambos métodos en el 74,1% (43/58). Por la BK se detectó que el 13,8% (8/58) de los frotis que fueron negativos por ZN, resultaron positivos por el cultivo líquido. No se identificaron muestras que dieran positivas por la BK y negativas por el cultivo (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la tinción de Ziehl Neelsen en comparación con el cultivo, junio a diciembre 2014. LNR-TB-IPK

Técnica Diagnóstica		Métodos de Cultivo (Referencia)					
		Löwenstein Jensen			Líquido Bact ALERT 3D		
		Positivos BAAR	Negativos BAAR	Total	Positivos BAAR	Negativos BAAR	Total
BK por tinción de ZN	Positivos BAAR	11,3% (6/53)	1,9% (1/53)	13,2% (7/53)	12,1% (7/58)	0,0% (0/58)	12,1% (7/58)
	Negativos BAAR	13,8% (8/53)	71,7% (38/53)	86,8% (46/53)	13,8% (8/58)	74,1% (43/58)	87,9% (51/58)
	Total	26,4% (14/53)	73,6% (39/53)	100,0% 53/53	25,9% (15/58)	74,1% (43/58)	100,0% 58/58

Leyenda: BK: baciloscopía/ BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes/ ZN: Zielh Neelsen

La sensibilidad del ensayo Xpert® MTB/RIF para la detección del *CMTB*, fue de 92,86% en relación al cultivo sólido y del 100% respecto al líquido, valores superiores a los que se obtuvo por la tinción de ZN (46,67%) (tabla 3).

La especificidad fue del 100% para la tinción de ZN y osciló entre 92,11 y 95,12%, para el cultivo sólido y líquido, en ese orden. El índice de Youden tuvo valores por encima de 0,75 (0,85 - 0,95 para el medio sólido y líquido), superior al que se obtuvo por la tinción de ZN (0,47) (tabla 3).

Tabla 3. Resultados de los indicadores del Xpert® MTB/RIF y de la tinción de Ziehl Neelsen, junio a diciembre 2014. LNR-TB-IPK

Indicadores (%)	Xpert® MTB/RIF en relación a		BK por tinción de ZN
	Cultivo Sólido Löwenstein Jensen	Cultivo líquido Bact ALERT 3D	
Sensibilidad	92,86	100,00	46,67
Especificidad	92,11	95,12	100,00
Índice de validez	92,31	96,43	86,21
Valor predictivo +	81,25	88,24	100,00
Valor predictivo -	97,22	100,00	84,31
Índice de Youden	0,85	0,95	0,47

Leyenda: BK: baciloscopía/ ZN: Zielh Neelsen

4.2 Precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico rápido de la tuberculosis en muestras pulmonares y extrapulmonares

Se estudiaron 929 muestras clínicas. En el estudio 1 se investigaron 82 muestras pulmonares. En el estudio 2 se analizaron 847, de ellas 784 pulmonares y 63 extrapulmonares (figura 10).

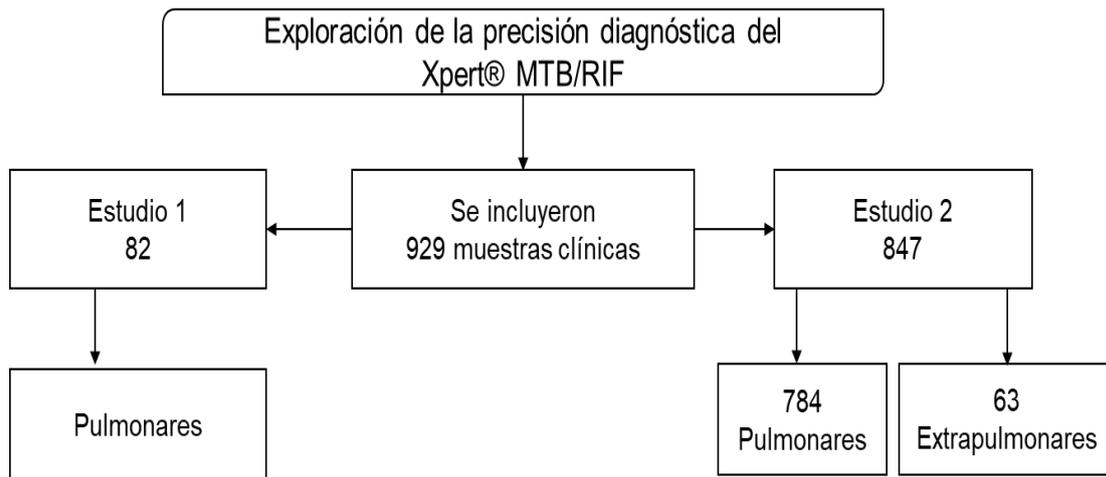
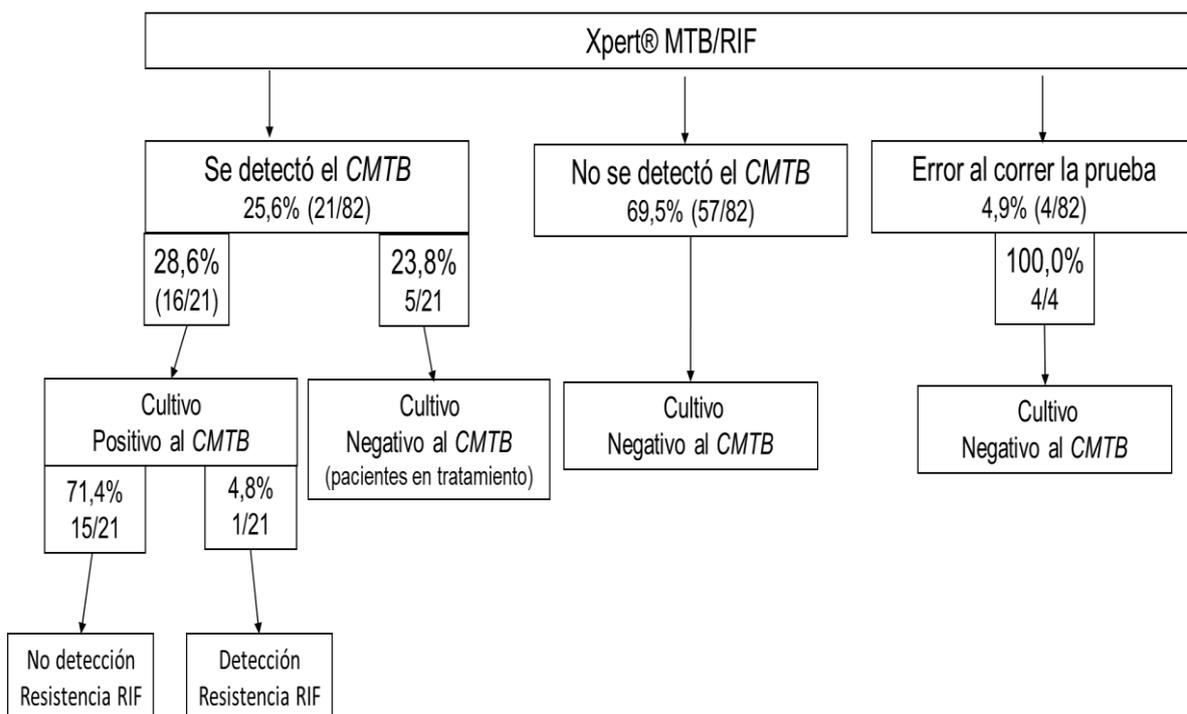


Figura 10. Distribución de las muestras que se evaluaron por el Xpert® MTB/RIF

4.2.1 Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis. (Estudio 1)

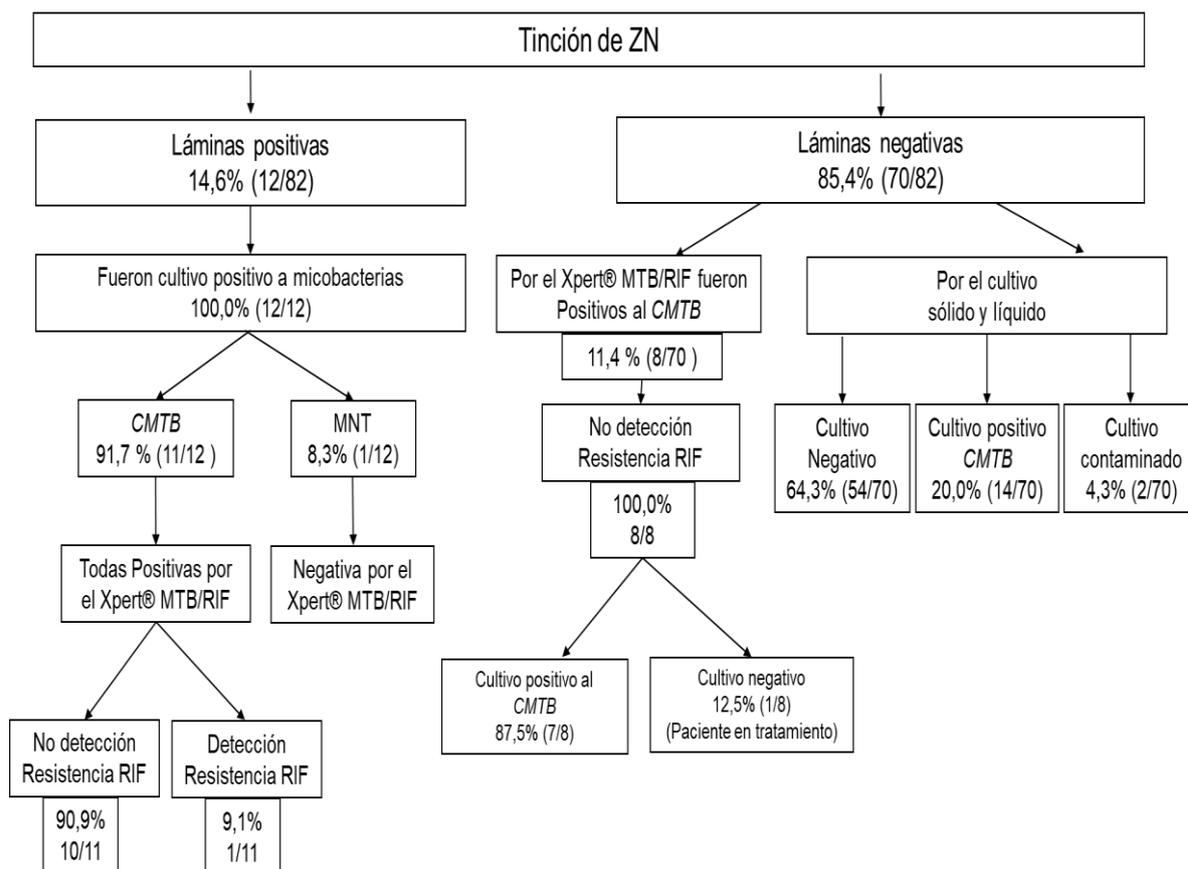
La prueba molecular detectó la TB en el 25,6% (21/82) de las muestras testadas. De ellas, en el 28,6% (16/21) hubo confirmación bacteriológica. El 23,8% (5/21) fue negativo al cultivo, todas las muestras correspondieron a pacientes en tratamiento. De las muestras positivas por cultivo, sólo el 4,8% (1/21) se detectó resistencia a la RIF la prueba molecular. En cinco de las muestras el cultivo fue negativo que pertenecieron a pacientes en seguimiento del tratamiento. Las 57 muestras donde no se detectó la enfermedad por la prueba molecular, todas fueron cultivo negativo (figura 11).



Leyenda: CMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*/ MNT: micobacteria no tuberculosa/ ZN: Zielh Neelsen/ RIF: rifampicina

Figura 11. Resultados de las pruebas diagnósticas Xpert® MTB/RIF y BK por tinción de ZN

La BK por tinción de ZN fue positiva en el 14,6% (12/82) de las muestras. Se confirmaron los BAAR en los medios de cultivo en la totalidad de los frotis. De ellas, el 91,7% (11/12) pertenecieron al CMTB, todas resultaron positivas por el Xpert® MTB/RIF. El 90,9% (10/11) de las muestras positivas por la prueba molecular fueron sensibles a la RIF y el 9,1% (1/11) resistente a este fármaco. El 85,4% (70/82) de las muestras, resultó negativa por la tinción de ZN; sin embargo, el Xpert® MTB/RIF permitió detectar la TB en el 11,4% (8/70) de los casos, todos sensibles a la RIF (100%). De ellos, en el 87,5% (7/8) se confirmó el agente causal por el cultivo bacteriológico y el 12,5% (1/8) fue negativo al cultivo (figura 12).



Legenda: CMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*/ MNT: micobacteria no tuberculosa/ ZN: Zielh Neelsen/ RIF: rifampicina

Figura 12. Resultados de las pruebas diagnósticas Xpert® MTB/RIF y tinción de ZN

El esputo fue la muestra pulmonar más frecuente con el 95,1% (78/82). El 100% (21/21) de los casos de TB se diagnosticó por el ensayo Xpert® MTB/RIF en este tipo de espécimen (tabla 4).

Las PVV representaron 62,2% (51/82) del total de pacientes estudiados. El Xpert® MTB/RIF diagnosticó la enfermedad en el 17,6% (9/51), de ellos el 44,4% (4/9) fueron negativos por la tinción de ZN. En las personas con tratamiento previo, se estudiaron el 9,8% (8/82) de los pacientes. En todos se detectó el CMTB por la prueba molecular, en el 25% (2/21) de ellos la BK fue negativa. Los extranjeros representaron el 9,8% (8/82) del total de casos y en el 12,5% (1/8)

se detectó la TB. En este caso la BK resultó negativa. Se estudiaron 4/82 niños que representó el 4,9%. El 25% (1/4) presentó la TB. De los pacientes con enfermedades crónicas (5/82), el 40% (2/5) enfermaron. En el resto de los grupos no se detectó la enfermedad (tabla 4).

Tabla 4. Caracterización de las variables por tipo de muestras y grupos vulnerables, de acuerdo a la positividad del Xpert® MTB/RIF y la tinción de Ziehl Neelsen, mayo a octubre 2016. LNR-TB-IPK.

Tipo de Muestras N=82	Muestras Frecuencia No. (%)	Ensayo Xpert® MTB/RIF Positivos al <i>CMTB</i> No. (%)	
Espustos	78 (95,1)	21 (100,0)	
Lavados Bronquiales	2 (2,4)	0 (0,0)	
Líquidos pleurales	2 (2,4)	0 (0,0)	
Grupos vulnerables N=82	Frecuencia N (%)	Xpert® MTB/RIF Positivos No./N (%)	BK por ZN Negativas n./No. (%)
Personas viviendo con VIH	51 (62,2)	9/51 (17,6)	4/9 (44,4)
Personas con tratamiento previo	8 (9,8)	8/8 (100)	2/8 (25,0)
Extranjeros provenientes de países de alta carga de TB	8 (9,8)	1/8 (12,5)	1/1 (100,0)
Niños mayores de 12 años	4 (4,9)	1/4 (25,0)	0/1(0,0)
Personas con enfermedades crónicas	5 (6,1)	2/5 (40)	1/2 (50,0)
Pacientes con internamiento prolongado	3 (3,6)	0/3 (0,0)	0/0 (0,0)
Hábito de fumar	2 (2,4%)	0/2 (0,0%)	0/0 (0,0)
Trabajador sector de la salud	1 (1,2%)	0/1 (0,0%)	0/0 (0,0)
Total	82 (100,0)	21/82 (25,6)	8/21 (38,1)

Leyenda: ZN: Ziehl Neelsen/ *CMTB*: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

No existieron diferencias significativas entre los porcentajes de detección del *CMTB* del Xpert® MTB/RIF y el cultivo bacteriológico (medio sólido LJ y líquido) ($p=0,25$).

El ensayo Xpert® MTB/RIF detectó como positivos al *CMTB* el 19,7% (14/71) en el cultivo Löwenstein Jensen. Por el cultivo líquido, el ensayo resultó positivo en el 20,0% (13/65) de las muestras. El Xpert® MTB/RIF fue negativo en el 73,2% (52/71) y 73,8% (48/65) en el Löwenstein Jensen y cultivo líquido, en ese orden. No se detectaron resultados negativos por la prueba molecular con crecimiento del *CMTB* por ninguno de los métodos de cultivo (tabla 5).

Tabla 5. Resultados del ensayo Xpert® MTB/RIF en según los resultados del cultivo, mayo a octubre 2016. LNR-TB-IPK

N=82		Métodos de Cultivo (Referencia)					
		Löwenstein Jensen			Líquido Bact ALERT 3D		
		Positivos <i>CMTB</i>	Negativos <i>CMTB</i>	Total	Positivos <i>CMTB</i>	Negativos <i>CMTB</i>	Total
Xpert® MTB/RIF	Positivos <i>CMTB</i>	19,7% (14/71)	7,1% (5/71)	26,8% (19/71)	20,0% (13/65)	6,1% (4/65)	26,2% (17/65)
	Negativos <i>CMTB</i>	0,0% (0/71)	73,2% (52/71)	73,2% (52/71)	0,0% (0/65)	73,8% (48/65)	73,8% (48/65)
	Total	19,7% (14/71)	80,3% (57/71)	100% (71/71)	20,0% (13/65)	80,0% (52/65)	100,0% (65/65)

En la tabla 6 se muestran los resultados de la BK por tinción de ZN en comparación con el cultivo. La BK y el cultivo fueron positivas en el 15% (12/80) y negativas en el 67,5% (54/80) de las muestras, por ambos métodos

diagnósticos. Se detectó que el 17,5% (14/80) donde la BK fue negativa, se detectó crecimiento de micobacterias en la prueba de referencia (tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la tinción de Ziehl Neelsen en comparación con el cultivo, mayo a octubre 2016. LNR-TB-IPK

		Cultivo Bacteriológico (Referencia)		
		Positivos BAAR	Negativos BAAR	Total
BK por tinción de ZN	Positivos	15,0%	0,0%	15,0%
	BAAR	(12/80)	(0/80)	(12/80)
	Negativos	17,5%	67,5%	85,0%
	BAAR	(14/80)	(54/80)	(68/80)
	Total	31,2%	67,5%	100,0%
			(25/80)	(54/80)

Leyenda: BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes

Los indicadores de desempeño del Xpert® MTB/RIF, para el cultivo sólido y líquido mostraron valores de sensibilidad y especificidad de 92,86% y 100%, en ese orden. La sensibilidad de la tinción de ZN fue menor (46,15%). El índice de Youden para los dos métodos de cultivo fue superior a 0,75 (0,85 para el sólido y 0,95 para el líquido). Para la tinción de ZN fue de 0,46 (tabla 7).

Tabla 7. Resultados de los indicadores del Xpert® MTB/RIF y de la tinción de Ziehl Neelsen, mayo a octubre 2016. LNR-TB-IPK

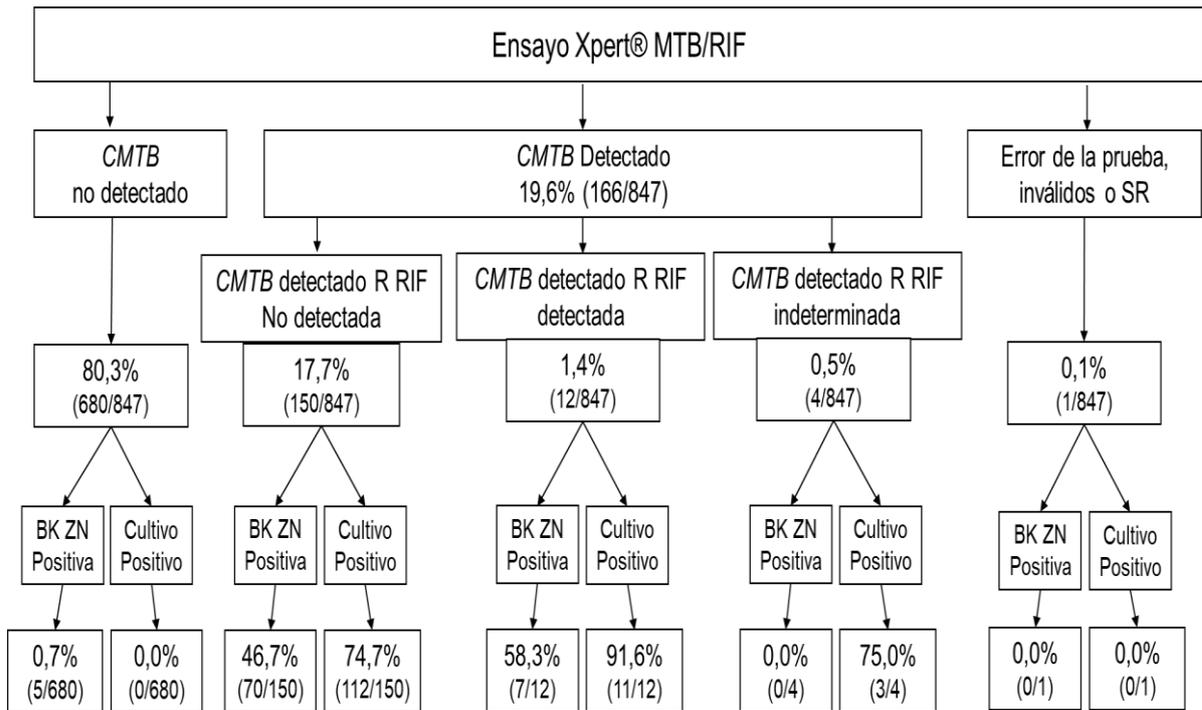
Indicadores (%)	Xpert® MTB/RIF en relación a		BK por tinción de ZN
	Cultivo Sólido Löwenstein Jensen	Cultivo líquido Bact ALERT 3D	
Sensibilidad	92,86	100,00	46,15
Especificidad	92,11	95,12	100,00
Índice de validez	92,31	96,43	82,50
Valor predictivo +	81,25	88,24	100,00
Valor predictivo -	97,22	100,00	79,41
Índice de Youden	0,85	0,95	0,46

4.2.2 Evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares (Estudio 2)

Las pulmonares representaron el 92,6% (784/847) y las extrapulmonares el 7,4% (63/847).

En la figura 10 se muestran los resultados del Xpert® MTB/RIF en relación a la BK y cultivo. El ensayo molecular resultó negativo a la TB en el 80,3% (680/847) muestras. De ellas, el 0,7% (5/680) fue BK positiva a BAAR. Todas fueron cultivo negativo. Como prueba inicial, la prueba molecular detectó la TB en el 19,6% (166/847) muestras. No se detectó la resistencia a RIF en el 17,7% (150/847) especímenes. De ellas el 46,7% (70/150) fueron positivas a BAAR por la tinción se ZN y en el 74,7% (112/150) se confirmó por el cultivo (figura 10).

La prueba molecular detectó la mutación en el gen *rpoβ* en el 1,4% (12/847) de los especímenes. El 58,3% (7/12) fueron BK positiva y el 91,7% (11/12) se confirmaron por el cultivo. En 0,5% (4/847) de las muestras donde se detectó la TB, la resistencia fue indeterminada. De ellas, ninguna fue BK positiva (0/4) y el 75% (3/4), resultó positiva por el cultivo (figura 10)



Legenda: CMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*/ BK: baciloscopía/ ZN: Ziehl Neelsen/ R RIF: Resistencia a la RIF/ SR: sin resultados

Figura 10. Resultados del Xpert® MTB/RIF en relación con la BK y cultivo

La mayor positividad, en muestras pulmonares, se obtuvo en los esputos. El Xpert® MTB/RIF detectó el CMTB en el 20,3% (153/754) de los especímenes. La tinción de ZN fue positiva a BAAR en el 10,3% (78/754). El cultivo, como método de referencia, detectó la enfermedad en el 15,6% (118/754). En los lavados bronquiales el ensayo molecular y el cultivo detectaron la enfermedad en el 20% de los casos (4/20) y la BK fue positiva solo en el 5% (1/20). En los aspirados bronquiales, la BK y el Xpert® MTB/RIF detectaron el 33,3% (2/6) contra el 16,6% (1/6) por el cultivo (tabla 8).

En las muestras extrapulmonares el Xpert® MTB/RIF diagnosticó la TB en el 11% (6/63). La BK por tinción de ZN fue positiva en 1,6% (1/63) de los especímenes. La proporción de positividad del cultivo fue del 4,8% (3/63). Por tipo de muestra, el ensayo molecular detectó el 19% (4/63) de los casos de TB

extrapulmonar contra 4,8% (1/63) por cultivo. Para las secreciones, el Xpert® MTB/RIF fue el único método diagnóstico que detectó la TB para un 25% (1/4). En el caso de los líquidos pleurales, se diagnosticó la TB en el 14,3% (2/14) por la prueba molecular y el cultivo, contra el 7,1% (1/14) por la BK. De forma general, el Xpert® MTB/RIF, detectó la TB en el 19,6% (166/847). La tinción de ZN detectó BAAR en el 9,7% (82/847) y el cultivo en el 14,9% (126/847) de las muestras (tabla 8).

Tabla 8. Resultados de la proporción de positividad de las muestras por baciloscopía, cultivo y Xpert® MTB/RIF, julio 2014 a septiembre 2017. LNR-TB-IPK

Tipos de muestras	No.	Pacientes positivos por						
		BK por ZN		Cultivo		Xpert® MTB RIF		
		n.	% (n./No)	n.	% (n./No)	n.	% (n./No)	
Pulm.	Espustos	754	78	10,3	118	15,6	153	20,3
	Lavados Bronquiales	20	1	5,0	4	20,0	4	20,0
	Aspirados Bronquiales	6	2	33,3	1	16,6	2	33,3
	Cepillados Bronquiales	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Contenidos Gástricos	3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Subtotal	784	81	10,3	123	15,7	159	20,3
Extrap.	Biopsias de Tejidos	21	NA	NA	1	4,8	4	19,0
	LCR	20	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Líquidos Pleurales	14	1	7,1	2	14,3	2	14,3
	Secreciones de pus	4	NA	NA	0	0,0	1	25,0
	Líquidos Ascíticos	3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Líquidos Pericárdicos	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Subtotal	63	1	1,6	3	4,8	7	11,0
Total	847	82	9,7	126	14,9	166	19,6	

Leyenda: Pulm.: pulmonares/ Extrap: extrapulmonares/ BK: baciloscopía/ ZN: Ziehl Neelsen/ LCR: líquido cefalorraquídeo/ NA: no aplica

Las diferencias entre la proporción de la positividad general para la detección de TB para muestras pulmonares por el Xpert® MTB/RIF y la tinción de ZN fueron significativas ($p=0,00$).

Dentro de las PVV, el ensayo Xpert® MTB/RIF diagnosticó la TB en el 14,8% (76/512) de los casos. El cultivo fue positivo en el 10,9% (56/512) por cultivo y el 5,5% (28/512) por la tinción de ZN. Para las personas sin VIH, el ensayo molecular detectó la TB en el 30,3% (90/297), por el cultivo el 23,6% (70/297) y por la BK el 18,2% (54/297).

4.2.3 Evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF para la detección de resistencia a la Rifampicina

Para la evaluación se incluyeron los resultados de la resistencia a la RIF de 57 aislados (15 del estudio 1 y 42 del estudio 2).

Por el ensayo Xpert® MTB/RIF y la prueba de referencia se detectó la resistencia a la RIF en el 12,3% (7/57) de los aislados (verdaderos resistentes). Por ambas técnicas fueron sensibles al fármaco el 86,0% (49/57) (verdaderos sensibles). La prueba molecular detectó el 1,7% (1/57) de los aislados con resistencia a la RIF que resultó sensible por el método de referencia (falso resistente). No se determinaron resultados falsos sensibles por la prueba molecular (tabla 9).

Tabla 9. Resultados del Xpert® MTB/RIF y el método de las proporciones, para la detección de resistencia a la RIF. LNR-TB-IPK

		Método fenotípico (Referencia)		Total
		Resistencia a RIF	Sensible a RIF	
Xpert® MTB/RIF	Resistencia a RIF	12,3% (7/57)	1,7% (1/57)	14,0% (8/57)
	Sensible a RIF	0,0% (0/57)	86,0% (49/57)	86,0% (49/57)
	Total	12,3% (7/57)	87,7% (50/57)	100,0% (57/57)

Leyenda: MTB: *Mycobacterium tuberculosis*/ RIF: rifampicina

La sensibilidad del Xpert® MTB/RIF, para la detección de la resistencia a RIF, fue del 100% (intervalo de confianza 92,86-100,0), con una especificidad del 98% (intervalo de confianza 93,12-100,0). El índice de Youden alcanzó un valor de 0,98 (intervalo de confianza 0,94-1,02) (tabla 10).

Tabla 10. Indicadores de desempeño del Xpert® MTB/RIF, para la detección de resistencia a la RIF. LNR-TB-IPK

Indicadores (%)	Valor	Intervalo de confianza (95%)	
		LI	LS
Sensibilidad	100,00	92,86	100,00
Especificidad	98,00	93,12	100,00
Índice de validez	98,25	93,96	100,00
Valor predictivo positivo	87,50	58,33	100,00
Valor predictivo negativo	100,00	98,98	100,00
Índice de Youden	0,98	0,94	1,02

Leyenda: LI: límite inferior/ LS: límite superior

4.3 Validación de la capacidad diagnóstica de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED

Por la tinción fluorescente mediante la MF LED y la fluorescencia convencional se identificaron el 37,8% (38/98) de láminas positivas. De ellas, el 18,4% (18/98) fueron frotis paucibacilares. Fueron negativas el 61,2% (60/98) láminas. Por la tinción de ZN fueron positivas el 24,5% (24/98) de las láminas, el 8,2% (8/98) fueron escasos en bacilos. No se observaron BAAR en el 75,5% (74/98) de los frotis (tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la tinción fluorescente con auramina O y la tinción de Ziehl Neelsen según los resultados de la codificación, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK

Tipos de tinciones	Láminas Negativas	Láminas positivas				Total
		Paucibacilar	+	++	+++	
Tinción fluorescente mediante MF LED y MFC	61,2% (60/98)	18,4% (18/98)	4,1% (4/98)	2,0% (2/98)	14,3% (14/98)	38,8% (38/98)
Tinción de Ziehl Neelsen	75,5% (74/98)	8,2% (8/98)	3,1% (3/98)	2,0% (2/98)	11,2% (11/98)	24,5% (24/98)

Leyenda: Paucibacilar: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces/ MF LED: microscopía de fluorescencia LED/ MFC: microscopía de fluorescencia convencional

Por la tinción fluorescente se identificó el 14,3% (14/98) de frotis positivos, que fueron negativos por la tinción de ZN. El porcentaje de positividad de la tinción fluorescente se incrementó en un 13,3%. Al comparar el porcentaje de detección de BAAR de la tinción fluorescente y la de ZN, las diferencias no fueron significativas (p= 0,15).

Por la tinción fluorescente mediante la MF LED el 3,1% (3/98) se codificaron como paucibacilares (dos BAAR en una línea), las mismas resultaron negativas por la tinción de fluorescencia convencional. A su vez, la misma proporción de láminas fueron negativas por la tinción fluorescente por MF LED y se codificaron como paucibacilares (cuatro BAAR en una línea) por la tinción fluorescente convencional (tabla 12).

Tabla 12. Resultados de la tinción fluorescente con auramina O, según los resultados de la codificación, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK

Tinción fluorescente mediante MFC	Tinción fluorescente por microscopía de fluorescencia LED					Total
	Negativos	Paucibacilar	Positivo +	Positivo ++	Positivo +++	
Negativos	58,2% (57/98)	3,1% (3/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	61,2% (60/98)
Paucibacilar	3,1% (3/98)	15,3% (15/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	18,4% (18/98)
Positivo +	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	4,1% (4/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	4,1% (4/98)
Positivo ++	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	2,0% (2/98)	0,0% (0/98)	2,0% (2/98)
Positivo +++	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	0,0% (0/98)	14,3% (14/98)	14,3% (14/98)
Total	61,2% (60/98)	18,4% (18/98)	4,1% (4/98)	2,0% (2/98)	14,3% (14/98)	100,0% (98/98)

Leyenda: Paucibacilar: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces/ MF LED: microscopía de fluorescencia LED/ MFC: microscopía de fluorescencia convencional

La tinción fluorescente fue positiva a BAAR al cultivo en el 38,8% (38/98) de las láminas y negativo en el 50% (49/98). Se codificó como negativa y fue positiva al cultivo en el 11,2% (11/98). No se identificó ningún resultado falso positivo. La tinción fluorescente convencional fue positiva al cultivo en el 36,7% (36/98) y resultó negativa por la prueba de referencia en el 47,9% (47/98). Se identificó que el 2,1% (2/98) de las láminas positivas fueron negativas al cultivo. El 13,3% (13/98) que se codificaron como negativas fueron positivas al cultivo (tabla 13).

Tabla 13. Resultados de la tinción fluorescente con auramina O según los resultados del cultivo, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK

Tinción Fluorescente		Cultivo (Referencia)		
		Positivos	Negativos	Total
Por MF LED	Positivos	38,8% (38/98)	0,0% (0/98)	38,8% (38/98)
	Negativos	11,2% (11/98)	50,0% (49/98)	61,2% (60/98)
	Total	50,0% (49/98)	50,0% (49/98)	100% (98/98)
Por MFC	Positivos	36,7% (36/98)	2,1% (2/98)	38,8% (38/98)
	Negativos	13,3% (13/98)	47,9% (47/98)	61,2% (60/98)
	Total	50,0% (49/98)	50,0% (49/98)	100% (98/98)

Leyenda: MF LED: microscopía de fluorescencia LED/ MFC: microscopía de fluorescencia convencional

La BK por tinción de ZN fue positiva al cultivo en el 19,4% (19/98) de los frotis y negativa 49% (48,98). Se identificaron que 30,6% (30/98) fue negativa por ZN y positivas al cultivo. La tinción de ZN fue positiva y negativa por el cultivo en el 1,0% (1/98) de las láminas (tabla 14).

Tabla 14. Resultados de la baciloscopía por tinción de ZN según los resultados del cultivo, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK

		Cultivo (Referencia)		
		Positivos	Negativos	Total
BK por tinción de ZN	Positivos	19,4% (19/98)	1,0% (1/98)	20,4% (20/98)
	Negativos	30,6% (30/98)	49,0% (48/98)	79,6% (78/98)
	Total	50,0% (49/98)	50,0% (49/98)	100% (98/98)

Leyenda: BK: baciloscopía/ ZN: Ziehl Neelsen/ BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes

La concordancia entre las lecturas de la tinción fluorescente mediante la MF LED y la tinción de ZN se consideró buena ($K=0,6773$). Entre las tinciones fluorescentes (por MF LED y microscopía fluorescencia convencional) se consideró muy buena ($K=0,8711$).

La sensibilidad de la tinción fluorescente mediante la MF LED fue de 77,55%, con un índice de Youden de 0,78. Resultados similares se obtuvieron con la tinción fluorescente convencional (75,51% y 0,73, en ese orden). La sensibilidad de la tinción de ZN fue de 48,98%. El índice de Youden para la MF LED fue de 0,78, superior en comparación con la observó en la tinción de ZN (0,49) (tabla 15).

Tabla 15. Resultados de los indicadores de desempeño de las tinciones fluorescentes y la tinción de Ziehl Neelsen, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK

Indicadores (%)	Tinción fluorescente por microscopía de		Tinción de Ziehl Neelsen
	Fluorescencia LED	Fluorescencia Convencional	
Sensibilidad	77,55	75,51	48,98
Especificidad	100,00	97,96	100,00
Índice de validez	88,78	86,73	74,49
Valor predictivo positivo	100,00	97,37	100,00
Valor predictivo negativo	81,87	80,00	66,22
Índice de Youden	0,78	0,73	0,49

4.4 Rendimiento de la tinción fluorescente mediante la MF LED, en muestras de esputos, para el diagnóstico de la tuberculosis

La tinción fluorescente detectó que el 13,5% (28/208) de los frotis fueron positivos a BAAR, 4,9% más que la tinción de ZN (8,6%; 18/208). Se identificaron 4,8% (10/208) frotis paucibacilares por la técnica fluorescente (de ellos cuatro pertenecientes a PVV). La tinción de ZN detectó el 1,9% (4/208) (tabla 16).

Tabla 16. Resultados de la tinción fluorescente y de la técnica de Ziehl Neelsen según los resultados de la codificación, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK.

Tipo de Tinciones	Frotis Negativos	Frotis positivos				
		Total	Paucibacilar	+	++	+++
Tinción de ZN	91,3% (190/208)	8,6% (18/208)	1,9% (4/208)	1,4% (3/208)	1,0% (2/18)	4,3% (9/208)
Tinción fluorescente (MF LED)	86,5% (180/208)	13,5% 28/208	4,8% 10/208	1,9% 4/208	1,0% 2/208	5,8% 12/208

Leyenda: MF LED: microscopia de fluorescencia LED/ Paucibacilares: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces/ ZN: Ziehl Neelsen

La concordancia entre las tinciones fluorescentes y de ZN se consideró buena ($K = 0,7570$; valores entre 0,61-0,80).

La tinción fluorescente por MF LED y el cultivo fueron positivos en el 12,1% (25/206) del total de muestras. Resultaron negativas por ambos métodos de diagnóstico en el 83,5% (172/206). Se detectó que el 1,5% (3/206) que fue positiva por la tinción fluorescente no se confirmó por la prueba de referencia. El 2,9% (6/206) que se codificó como negativa por la BK, se identificó el *CMTB* en el medio de cultivo (tabla 17).

Por la tinción de ZN resultaron positivas por la BK y el cultivo el 8,7% (18/206) de muestras. El resultado fue negativo por ambas técnicas en el 85,0% (175/206) de los especímenes. Se detectaron que el 6,3% (13/206) de los frotis fueron negativos por la BK y positivos por el cultivo. No se identificaron frotis positivos con cultivo negativo (tabla 17).

Tabla 17. Resultados de la tinción fluorescente con auramina O según los resultados del cultivo, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK

Tipos de tinciones		Cultivo (Referencia)		
		Positivos	Negativos	Total
Tinción Fluorescente por MF LED	Positivos	12,1% (25/206)	1,5% (3/206)	13,6% (28/206)
	Negativos	2,9% (6/206)	83,5% (172/206)	86,4% (178/206)
	Total	15,0% (31/206)	85,0% (175/206)	100% (206/206)
Tinción de Ziehl Neelsen	Positivos	8,7% (18/206)	0,0% (0/206)	8,7% (18/206)
	Negativos	6,3% (13/206)	85,0% (175/206)	91,3% (188/206)
	BAAR	15,0% (31/206)	85,0% (175/206)	100% (206/206)
	Total	15,0% (31/206)	85,0% (175/206)	100% (206/206)

Leyenda: BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes/ MF LED: microscopia de fluorescencia LED

La sensibilidad y especificidad de la tinción fluorescente mediante la MF LED fue 81,82 % y 99,43%, en ese orden. Con la tinción de ZN se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 54,55% y 100,00%. El índice de Youden de la tinción fluorescente fue de 0,81 y la tinción de ZN 0,55 (tabla 18).

Tabla 18. Indicadores de desempeño de la tinción fluorescente mediante la microscopia de fluorescencia LED y de Zielh Neelsen, febrero a julio 2018. LNR-TB-IPK.

Indicadores (%)	Tinción fluorescente MF LED	Tinción de ZN
Sensibilidad	81,82	54,55
Especificidad	99,43	100,00
Valor Predictivo Positivo	96,43	100,00
Valor Predictivo Negativo	96,65	92,06
Índice de validez	96,62	92,75
Índice Youden	0,81	0,55

Leyenda: MF LED: microscopía de fluorescencia LED/ ZN: Ziehl Neelsen

Se calculó el área bajo la curva (ABC) de ROC. La tinción fluorescente tuvo un valor del ABC de 0,8966 (intervalo de confianza de 0,8250-0,9681). El ABC de la tinción de ZN fue de 0,7903 (intervalo de confianza de 0,7020-0,8786). No se encontraron diferencias significativas ($p=0,06$).

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

5 CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

La introducción del Xpert® MTB/RIF en el algoritmo de diagnóstico en Cuba, es de indudable valor para el PNC y el sistema nacional de salud en el camino a la eliminación de la TB en Cuba y en la región.

Con esta investigación, se ratifica la mayor capacidad y precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para la identificación del *CMTB* en muestras pulmonares y extrapulmonares, en comparación con la tinción de ZN, como prueba inicial para el diagnóstico de la TB. Permite incrementar la detección de casos en más del 10% en relación a la BK y entre 5 y 6% en comparación con el cultivo. En los casos con BK negativa, permite la detección rápida de los casos. Disponer de los resultados del patrón de sensibilidad/ resistencia de este fármaco, permite disminuir los tiempos de respuesta, en consecuencia, mejorar la atención y manejo de los pacientes.

La tinción fluorescente mediante la MF LED es más sensible que la tinción de ZN para la identificación de BAAR y los frotis con escasos bacilos. Tiene la ventaja de identificar con mayor facilidad los bacilos porque fluorescen sobre un fondo oscuro. Sin embargo, antes de su introducción en el diagnóstico bacilosκόpio de la TB, es imprescindible la capacitación del personal en esta técnica, ya que pueden emitir fluorescencia otro tipo de elementos (fluorescencia inespecífica), que pueden confundir al microscopista, y emitir resultados falsos de la BK.

La inclusión en el estudio de validación del Xpert® MTB/RIF a sujetos provenientes de grupos vulnerables con riesgo de desarrollar TB y TB resistente, por la no disponibilidad de cartuchos suficientes para realizar el diagnóstico

molecular a todos los sintomáticos con sospecha clínica de TB, constituye una limitación para la interpretación de los resultados en población general; sin embargo atendiendo a la aportación a la carga de incidencia de grupos vulnerables, el diagnóstico oportuno en estos pacientes añade significativo valor a las metas del programa. La no recolección en los sistemas de atención de muestras extrapulmonares limitó la determinación del rendimiento de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED para arribar a conclusiones.

El PNC de la TB, se encarga de elaborar las normas y procedimientos para la atención integral de pacientes con TB a nivel nacional. Revisa y actualiza, en base a las evidencias científicas, las normas y procedimientos técnicos que orienta a la toma de decisiones y las acciones relacionadas en los diferentes niveles de atención de salud el país. El LNR del IPK, forma parte del grupo técnico asesor PNC de la TB y dirige la red de laboratorios. Se encarga, entre otras funciones, de evaluar la introducción de nuevas técnicas para avalar su introducción en el algoritmo diagnóstico de la TB en el país. Además, organiza y realiza las capacitaciones del personal del laboratorio en las nuevas metodologías, lo que constituye una fortaleza para el programa de control y el sistema nacional de salud.

La detección rápida de la TB y conocer el patrón de susceptibilidad/ resistencia a la RIF, permite al médico de asistencia comenzar con el tratamiento específico, detectar con rapidez los casos durante los controles de foco y de esta forma disminuir la transmisión de la enfermedad en la comunidad y la implementación de medidas de control epidemiológico efectivas. Estos elementos son fundamentales para lograr la mayor curación de los pacientes, disminuir la

mortalidad, prevenir la resistencia a los medicamentos antituberculosos, así como evitar el fracaso y las recurrencias. Sin embargo, a pesar de todas las ventajas demostradas de la prueba molecular, los métodos convencionales no deben ser reemplazados de forma total por los métodos moleculares. El Xpert® MTB/RIF, solo brinda la información de la resistencia a RIF y el cultivo provee el perfil de resistencia no solo a RIF, sino también de otras drogas antituberculosas.

La prioridad de los Programas Nacionales de Control de la TB a nivel mundial es la detección oportuna de los casos de TB y TB resistente a fármacos. El diagnóstico rápido y preciso de esta enfermedad es un paso importante para la disminución de la transmisión, comenzar el tratamiento adecuado, implementar medidas y lograr un control epidemiológico efectivo. Estas acciones son elementos primordiales para lograr la mayor curación de los pacientes, disminuir mortalidad, prevenir la resistencia a los medicamentos, evitar el fracaso y las recurrencias de la TB.^{8,58,59}

El Xpert® MTB/RIF, es una prueba molecular que detecta la presencia del *CMTB* a partir de muestras clínicas, en un tiempo aproximado de dos horas. Esta tecnología, tiene el valor agregado de detectar el patrón de susceptibilidad/resistencia de la RIF, droga de primera línea en el tratamiento de la TB. Es un ensayo automatizado, integrado, semicuantitativo y en tiempo real.

60-62

Con esta investigación, se demuestra la mayor capacidad diagnóstica del Xpert® MTB/RIF para la identificación del *CMTB* en muestras pulmonares y extrapulmonares.

La TB es la enfermedad oportunista más común entre las PVV. El riesgo de un individuo de desarrollar TB sin VIH varía entre el 5 y el 15% durante toda su vida. En PVV, el riesgo varía de 5-15% en un año y puede alcanzar el 50% durante toda la vida.⁶³ La coinfección de TB-VIH, amenaza los programas de control de ambas enfermedades y se estima que más de la mitad no se diagnostican o se reportan. En estadíos avanzados del VIH la BK muchas veces es negativa, lo que trae como consecuencia demora en el diagnóstico y tratamiento, incluso la muerte. Por estas razones es importante la identificación oportuna de los signos y síntomas de la TB que permite el inicio rápido del tratamiento, reducir la mortalidad, mejorar la calidad vida y disminuir la transmisión de la enfermedad en la comunidad.^{64,65}

La infección viral por VIH produce la declinación de los linfocitos T CD₄, que son responsables de iniciar y mantener la respuesta inmune frente al bacilo de la TB. Por su parte, la TB acelera la evolución de la enfermedad por VIH al aumentar la carga viral e incrementa la progresión al síndrome de inmunodeficiencia adquirida.^{65,66}

En muchos países (de baja, mediana y alta carga de TB), la BK es la prueba inicial para el diagnóstico de la TB, pero tiene baja sensibilidad en PVV debido a la dificultad para producir esputos o los producen con escasos bacilos (paucibacilares). Además, esta técnica no distingue entre las especies de micobacterias, ni cepas sensibles de las resistentes.^{66,67}

Los reclusos y exreclusos es otro grupo importante con alto riesgo de contraer TB. En esta investigación se estudiaron cinco personas que a la vez cumplían la condición de ser VIH, por lo que primó la clasificación de PVV, según las normativas del PNC¹⁷. De ellos en dos se detectó la enfermedad. Sobre este

grupo en particular existen escasos reportes. Las personas privadas de libertad viven con frecuencia en hacinamiento, las instalaciones tienen insuficiente ventilación e higiene, condiciones propicias para el desarrollo de enfermedades infecciosas crónicas, como la TB y el VIH.⁶⁸ En este particular, el Xpert® MTB/RIF sería de una herramienta de gran utilidad para la detección rápida de los casos de TB, cortar la cadena de transmisión y comenzar el tratamiento.

La BK, es rápida, sencilla y barata. Permite detectar los BAAR, pero no diferencia entre especies de micobacterias, ni bacilos resistentes de los sensibles. La prueba de oro para el diagnóstico definitivo de la TB es el cultivo, pero tiene la desventaja que es laborioso y demora entre 2-3 semanas para obtener un resultado. Se recomienda la transición de la BK por pruebas moleculares rápidas, como prueba inicial para el diagnóstico de la TB, como el Xpert® MTB/RIF.⁶⁹

La TB pulmonar es más frecuente y constituye la principal fuente de contagio. La forma extrapulmonar, puede alcanzar 15% del total de casos y llegar hasta el 40% en países con alta incidencia de TB y VIH.^{70,71} El Xpert® MTB/RIF se recomienda para el diagnóstico de la TB, en diferentes tipos de muestras basándose en su sensibilidad, especificidad, así como simplicidad y rapidez de la técnica.⁷² El diagnóstico de la TB extrapulmonar es un reto debido a que la obtención de las muestras, en la mayoría de los casos, requiere de métodos invasivos y en muchas ocasiones es difícil obtener especímenes adicionales. Por otro lado, se caracterizan por ser paucibacilares y con frecuencia el resultado del examen directo y el cultivo es negativo.⁷³ En muestras como biopsias de tejidos y secreciones de pus, muchas veces dependen de los resultados del cultivo para realizar el diagnóstico de la enfermedad. En este particular, el Xpert® MTB/RIF sería una herramienta de gran utilidad para diagnosticar la TB de forma rápida

que permitiría una mejor atención al paciente, comenzar el tratamiento antituberculoso y evitar las complicaciones graves.

El Xpert® MTB/RIF se debe indicar en pacientes con sospecha de TB para el diagnóstico de la enfermedad. De forma excepcional, en pacientes antes tratados o durante el curso del tratamiento, cuando no hay una mejoría clínica - radiológica y el médico de asistencia tiene sospecha de resistencia a los medicamentos. Es importante identificar en la orden de indicación la categoría de caso (de diagnóstico o sospecha de resistencia), para la adecuada interpretación del resultado de la prueba molecular.

La precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF es variable en dependencia del contexto y finalidad de la prueba. Como diagnóstico inicial en reemplazo a la BK en muestras pulmonares, la sensibilidad alcanza el 88%, con una especificidad del 99%. Como prueba complementaria después de un resultado negativo de la BK, la sensibilidad disminuye a 68% con especificidad del 99%. En pacientes de TB que cursan con BK y cultivo positivo, la sensibilidad se incrementa a un 98%. En las PVV, la sensibilidad del ensayo molecular disminuye al 79%.⁷⁴

La RIF es una de las drogas más importantes en el tratamiento de la TB y marcadora de TB-MDR en países de alta carga. A pesar de la buena sensibilidad y especificidad del Xpert® MTB/RIF para detectar resistencia a RIF, pueden aparecer discrepancias entre los resultados fenotípicos y moleculares. Cuando esto sucede, solo es posible resolver estas diferencias, ya sea la discordancia, confirmación o descarte de una TB-RR, mediante los métodos de secuenciación del gen *rpoB*.⁶¹ Si la prevalencia de la resistencia a la RIF es inferior al dos por ciento en una población, una prueba positiva del ensayo molecular, tiene 50% de posibilidades de ser un error de laboratorio. En la práctica, en los casos en

que se detecta TB-RR con la prueba molecular, para garantizar que no se trata de un resultado falso positivo debido a errores pre y post analíticos, se recomienda repetir el estudio en una segunda muestra distinta del paciente. Esto es necesario, en aquellos pacientes que no están en grupos de riesgo de adquirir una cepa con resistencia a RIF y en países con baja prevalencia de TB-RR, como Cuba.⁶¹

El Xpert® MTB/RIF, en el estudio 2, detectó 19,6% de casos de TB. Si se compara con la BK, como herramienta inicial para el diagnóstico (positiva en 9,7% de las muestras), se hubieran dejado de diagnosticar el 9,9% de los casos. El Xpert® MTB/RIF detectó 12 casos resistentes a la RIF, una de las drogas que se utilizan en la fase intensiva del tratamiento.

El porcentaje de positividad para la detección del *CMTB* (29,5%), en el estudio de validación de la prueba molecular, fue superior al que se obtuvo por la tinción de ZN (11,5%), con un incremento del 18%. Estos resultados son superiores a lo que informa Ortiz Jiménez y cols.⁶⁰ en 2019, en un estudio similar en Ecuador. El autor notifica una positividad del 20,4% para la prueba molecular y de 6,9% para la tinción con ZN. En cuanto a la sensibilidad y especificidad del Xpert® MTB/RIF los resultados fueron similares (100% y 95,12%, en ese orden) a lo que notifica el mismo autor (99,8% y 93,2%, en ese orden). Sin embargo, cuando se compara con la tinción de ZN, la sensibilidad (46,67%), fue inferior a lo que obtiene el mismo autor en su investigación (88,1%). Las diferencias pudieran estar dadas, a la cantidad y calidad de muestras investigadas, la presencia de inhibidores de la amplificación en la muestra, experticia del laboratorista, resultados falsos positivos de la BK (debido a la sensibilidad del método diagnóstico) y que se requiere un adecuado manejo de la técnica de coloración.⁶¹

El primer estudio de evaluación de la precisión diagnóstica del ensayo molecular Xpert® MTB/RIF sólo incluyó muestras pulmonares. Del total de pacientes, el grupo vulnerable que más se estudió fueron las PVV (62,2%). Esto pudo estar en relación a que en el momento que se llevó a cabo la investigación, el diagnóstico molecular de TB en Cuba sólo estaba disponible en el LNR de TB del IPK. El mayor número de pacientes, fueron procedentes del Centro Hospitalario del IPK. El centro es de referencia nacional de atención al paciente VIH y de cierta forma, se beneficiaron por la cercanía al centro de diagnóstico. Los hallazgos de este estudio son similares a los que notifican Khanal y cols.⁷⁵ en Nepal, y Scott y cols.⁷⁶ en Sudáfrica. Ambos informan que el 77% y 70% de los casos investigados, en ese orden, fueron coinfección VIH-TB. Las diferencias pueden estar asociadas a que estos países tienen alta carga de TB y TB-VIH, lo que sugiere que el mayor número de muestras pudo pertenecer a este grupo de riesgo.

El Xpert® MTB/RIF diagnosticó la TB en las PVV en el 17,6% (estudio 1) y el 14,8% (estudio 2). Resultados que son inferiores a lo que notifican otros autores como Pinyopornpanish y cols.⁷⁷ en Tailandia, y Mavenyengwa y cols.⁷⁸ en Namibia, que informan un 26,3% y 57,4%, en ese orden. Las diferencias pueden estar en correspondencia a que estos países tienen una alta carga de TB-VIH. En particular, se encuentra entre las 14 regiones de más elevada tasa de incidencia de TB y coinfección VIH-TB a nivel mundial.¹

En las muestras pulmonares que resultaron positivas al *CMTB* por el Xpert® MTB/RIF, hubo confirmación por el cultivo en el 71,4% de los especímenes del estudio 1 y el 20,3% del estudio 2. Los resultados inferiores a los que informa Agrawal y cols.⁶² en el 2016. En ese estudio se logra una confirmación del

agente patógeno en el 52,4% (11/21) de las muestras pulmonares en el cultivo. Loannidis y cols.⁷⁹, en otro estudio conducido en Atenas, Grecia en el 2010, país de baja tasa de incidencia de TB¹, obtuvo la confirmación del *CMTB* en el 93,5% (29/31) en muestras procedentes del árbol respiratorio.

La sensibilidad del Xpert® MTB/RIF osciló entre el 92% (medio sólido) y el 100% (medio líquido). Los resultados son superiores a los que obtienen algunos autores como Marlowe⁸⁰ y Moure⁸¹ en 2011, que informan un rango una sensibilidad entre el 72% y 77% en muestras pulmonares. Boehme y cols.⁸², en el mismo año, informan valores de sensibilidad entre 96-100%, cifra que varió según los países participantes (Sudáfrica, India, Perú, Azerbaiyán, Uganda, y Filipinas). Gong X y cols.⁸³ informa un 95% de sensibilidad del Xpert® MTB/RIF en muestras de esputos y 94% para los contenidos gástricos, con una elevada especificidad. Para muestras extrapulmonares, la sensibilidad varía de acuerdo al tipo de espécimen. Una selección apropiada del tipo de muestra es esencial para obtener un buen resultado.

Con el el ensayo Xpert® MTB/RIF se incrementó el diagnóstico de la TB, en relación a la BK como prueba inicial, entre seis y 10% en las muestras pulmonares y extrapulmonares. Se diagnosticaron con TB extrapulmonar siete pacientes. Los porcentajes de positividad del ensayo molecular en la investigación, en muestras pulmonares y extrapulmonares, son inferiores a lo que notifican algunos autores, como Priyanka Y y cols.⁸⁴ en el 2024, en un estudio en la India. La autora informa un porcentaje de positividad para muestras procedentes o no del árbol respiratorio del 47,7% y 49,1% en ese orden. Las diferencias pudieran estar en correspondencia a que la India es un país de alta prevalencia de TB y TB resistente a fármacos, por lo que la incidencia de la

enfermedad es mayor y la probabilidad de detectar casos se incrementa. Sharma M y cols.⁸⁵ en Gurugram en 2023, notifica que el ensayo molecular, en muestras de esputo fue positivo en el 15,5% del total de personas con sospecha de la enfermedad.

Habous M y cols.⁸⁶, en 2019, en un estudio que realiza en Emiratos Árabes Unidos, informa una sensibilidad general de la prueba molecular en muestras extrapulmonares del 82,69%. con una especificidad del 100%. Para ganglios linfáticos y aspirados notifica una sensibilidad del 76,92%, para los líquidos cefalorraquídeos del 66,67%, en lavados gástricos y secreciones de pus 100%, en orina 85,71% y para otras muestras de tejidos el 66,67%. Otros autores como Li Y y cols.⁸⁷, en 2017 informan una sensibilidad general de 70,6 % y especificidad del 91,96 %.

La sensibilidad del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares, osciló entre el 92 y 100%. La especificidad de la prueba molecular obtuvo valores entre 92% y 98%. Los resultados son superiores a lo que notifica Atehortúa y cols.⁸⁸ en 2015, en Colombia, que obtiene una sensibilidad del 91% con especificidad del 92%. Bajrami y cols.⁸⁹ en Kosovo, 2016 informa una sensibilidad de 82,3%, con una especificidad similar a la de este trabajo.

Para la detección de resistencia a la RIF, la sensibilidad y especificidad del Xpert® MTB/RIF fue elevada (100% y 98%, en ese orden). Algunos autores, como Dorman y cols.⁹⁰, en un estudio multicéntrico que participan 8 países (Sudáfrica, Uganda, Kenya, India, China, Georgia, Bielorrusia y Brasil) en el 2018, informa una sensibilidad del 95% y especificidad del 98% en muestras pulmonares. Kohli y cols.⁹¹ en 2021 notifica una sensibilidad y especificidad

agrupada del ensayo molecular del 96,5% 99,1%, en ese orden, en muestras extrapulmonares.

El diagnóstico de TB de la red de laboratorios de Cuba, se basa en la BK utilizando la tinción de ZN y el cultivo bacteriológico. Desde el 2011, la OMS recomienda la tinción fluorescente mediante la MF LED para el diagnóstico de la TB, como una alternativa en todos los centros de salud donde se utiliza la fluorescencia convencional, y que su introducción sea de forma gradual como una alternativa para la microscopía con tinción de ZN en todos los laboratorios^{6,92}

La tinción fluorescente por MF LED, mejora algunas de las desventajas de tinción fluorescente convencional y de la tinción de ZN. Es más sensible y menos laboriosa que la tinción de ZN, y otros métodos como el de Kinyoun, para la identificación de BAAR. Tiene la ventaja de que los laboratoristas entrenados en el uso de métodos convencionales con tinción fluorescente convencional y microscopía de campo oscuro, no tendrían dificultades para leer láminas con los adaptadores ParaLens.^{7,8}

Los beneficios operativos que ofrece la tinción fluorescente mediante la MF LED, son de gran interés para laboratorios de países escasos recursos económicos. Su uso puede mejorar significativamente el flujo de trabajo y maximizar la utilización del espacio en el laboratorio. Por otro lado, el bajo precio de compra y costos por mantenimiento del equipo, mayor vida útil del diodo emisor de luz, la ausencia de componentes tóxicos, son todos factores que influyen para el uso de esta herramienta en los laboratorios para optimizar la calidad del diagnóstico por BK.⁵⁴

La tinción fluorescente mediante la MF LED es 10 % más de sensible que la coloración de ZN. El ácido micólico, presente en la pared de las micobacterias, absorbe mejor la auramina O que fucsina básica, que se utiliza en la tinción de ZN. Esta propiedad facilita la tinción de un mayor número de bacilos y que sea más rápida su identificación en la lámina⁹²⁻⁹⁴. Desde el punto de vista operacional tiene las ventajas que disminuye el tiempo de lectura de las láminas, no genera calor y no tiene los riesgos de contaminación del ambiente en caso de rotura. Sin embargo, es importante tener en cuenta otros factores como la formación del personal y la carga de trabajo del laboratorio.⁴³

De forma general, la tinción fluorescente mediante la MF LED, se incrementó el porcentaje de detección de BAAR y frotis con escasos bacilos (paucibacilares). Los resultados coinciden con Goel S y cols.⁸, en 2018 un estudio en la India y lo que notifica Minion y cols.⁵⁴ en 2011 en Canadá. Estos hallazgos acreditan a esta técnica, como una herramienta para aumentar la sensibilidad para la detección de casos con BK positiva.^{7,8}

Las concordancia entre las tinciones fluorescentes (por MF LED y MFC), en el estudio de validación, fue menor a lo que informa Kuhn y cols.⁹⁴ en 2010 que informa una concordancia del 100%. Las diferencias pudieron estar dadas a que el investigador utiliza un adaptador ParaLens QBC con mayor aumento (60x) e investiga un número menor de frotis (25).

La sensibilidad de las tinciones fluorescentes (77,55% y 75,51%, por MF LED y MFC, en ese orden) fueron inferiores a los que informa Marzouk y cols.⁹² en el 2013. En esa investigación el autor utiliza una metodología similar (180 muestras positivas al *CMTB* por el cultivo y el mismo número de muestras negativas). Informa una sensibilidad del 82,2% para la tinción fluorescente por la MF LED y

de 79,4% para fluorescencia convencional. Sin embargo, la especificidad de las tinciones fluorescentes fue similar a la que obtiene el mismo autor (97,2% para ambas técnicas). Otros autores, como Imaz y cols.⁷ en 2017, Argentina, notifica una sensibilidad del 87,7%, superior al que se obtuvo en la investigación. Las diferencias con estos estudios pueden estar dadas porque estos países tienen tasa incidencia de TB de media a alta, y la probabilidad de positividad de la BK es mayor.

El estudio de evaluación del rendimiento de la tinción fluorescente por MF LED, mostró que el porcentaje de positividad con la técnica fluorescente (13,5%) fue superior al de la tinción de ZN (8,6%). Estos resultados, son inferiores a lo que notifica N'Guessan y cols³⁶ en el Instituto Pasteur de Francia en el 2013. El autor utiliza en su estudio el adaptador ParaLens QBC y una positividad para la tinción fluorescente MF LED y tinción de ZN de 42% y 40%, en ese orden. Estas diferencias pudieran estar dadas Cuba es un país de baja carga de TB, además el autor para la investigación utiliza 50 muestras, número menor al que se utiliza en este trabajo.

Los resultados también son inferiores a los que informa Van Deun y cols⁹⁵. en el 2008. El investigador obtiene un porcentaje de positividad del 38,6% para la tinción fluorescente y 36,0 % para la tinción de ZN. El estudio se realiza en centros hospitalarios de países con medianos/bajos recursos. Las diferencias pueden obedecer al mayor número de muestras clínicas que se incluyen en esa investigación y que se realiza en países con mediana carga de TB, por lo que pudo estar relacionada con la mayor positividad encontrada en ese estudio.

Con la tinción fluorescente se identificaron diez casos por la tinción fluorescente que fueron negativos por la BK convencional (cinco de ellos PVV) y seis casos

más con frotis paucibacilares (cuatro de ellos de PVV). Los frotis paucibacilares con menos de 10 bacilos son de difícil observación, depende de la preparación y experticia del laboratorista. Se recomienda que se recorran otros campos ópticos antes de emitir un resultado como negativo.⁹⁶

En uno de los casos positivos por la tinción fluorescente, no hubo confirmación bacteriológica. Se trató de un paciente en seguimiento del tratamiento, por lo que se infiere que la micobacteria fue no viable y en consecuencia no creció en el medio de cultivo.

La sensibilidad en el estudio de la evaluación del rendimiento de la tinción fluorescente por MF LED (81,82 %), fue superior a la de Gelalcha y cols.⁹⁷ en 2017, en un estudio conducido en un hospital de Etiopía (77,8 %)100. Esto puede obedecer a que Etiopía es un país de alta carga de TB/VIH. En PVV la BK, con frecuencia es negativa, sobre todo en estadíos avanzados de la enfermedad. Pueden influir otros factores como la metodología utilizada, diferencias en el procedimiento o tipo de adaptador utilizado.⁹⁸

Sin embargo, algunos autores como Chang y cols.⁹⁹, en el 2014 informan una sensibilidad agrupada del 66,9 % (con variación del 40 a 83 %), con una especificidad entre 82 y 100 %.

El área bajo la curva para tinción fluorescente mediante la MF LED fue mayor que la que la de ZN. Significa que tiene mayor capacidad discriminativa para la detección de BAAR que la coloración de ZN convencional. ¹⁰⁰ En la bibliografía consultada no se encontraron estudios similares donde se analice la curva de ROC.

Es indispensable intensificar y unir los esfuerzos, adaptar estrategias y establecer prioridades de acuerdo a la epidemiología y los sistemas de salud locales para poder alcanzar la eliminación de la TB.

La Organización Panamericana de la Salud apoya a los países de la región para acelerar la implementación de la Estrategia Fin de la TB y convertirse en el primer territorio en eliminar la enfermedad como problema de salud pública. Para eliminar la TB se debe pasar de un país de baja incidencia (≤ 10 casos por cada 100 000 habitantes), a la pre-eliminación. Cuba está entre los países de la región de Las Américas que tienen la oportunidad de avanzar hacia la eliminación de esta temible enfermedad.²² Para ello, es prioritario la introducción de técnicas rápidas que permitan incrementar la detección de casos de TB, con prioridad en los grupos vulnerables, que tienen de 30-50 veces más probabilidad de enfermar que la población general.¹⁰¹

La detección rápida de la TB, por el Xpert® MTB/RIF, permite un control epidemiológico eficaz de la enfermedad. En el caso particular de la detección de la resistencia orienta hacia el diagnóstico de TB resistente (TB-MDR, pre- XDR o XDR), que requieren de tratamientos diferentes, que son caros, demorados y poco tolerados por algunos pacientes.¹⁰²

A pesar de las ventajas documentadas del Xpert® MTB/RIF, el ensayo no diferencia bacilos viables de no viables. Si el paciente está en tratamiento con fármacos antituberculosos y se obtiene un resultado positivo de la prueba molecular, puede suceder que la micobacteria estuviera no viable. Si la concentración bacilar es muy baja, puede quedar por debajo del límite de detección del cultivo. En ambas situaciones, la micobacteria no crece en el medio de cultivo, por lo que el resultado es negativo.¹⁰¹ Por otro lado, la prueba detecta

la resistencia a RIF, pero no provee el perfil de resistencia a otras drogas antituberculosas, por lo que el cultivo no puede ser reemplazado de forma total.¹⁰²

El fenómeno de la resistencia a los fármacos antituberculosos es poco frecuente en Cuba. En el contexto actual del país que un fuerte intercambio de personal con países con alta carga de TB y TB resistente, es imprescindible para el PNC y el sistema nacional de salud, mantener la vigilancia de la resistencia. Además, conocer el patrón de susceptibilidad de la RIF, permite en los casos de diagnóstico inicial detectados con resistencia RIF, iniciar el tratamiento específico, y en los pacientes con tratamiento previo, cambiar el mismo a drogas de segunda línea, y de esta manera prever la aparición de aislados XDR.

Existen pocos estudios acerca de la utilidad de la tinción fluorescente en muestras extrapulmonares. Sería interesante evaluar en estudios posteriores el rendimiento de la metodología en este tipo de muestras.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Las evidencias de la capacidad diagnóstica demostrada del Xpert® MTB/RIF para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a rifampicina, la avala para su inclusión en el algoritmo diagnóstico de la tuberculosis a partir de muestras provenientes de pacientes cubanos.
2. La capacidad y precisión del ensayo Xpert® MTB/RIF resulta confiable y preciso para el diagnóstico rápido y oportuno de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, lo que contribuye al fortalecimiento del Programa Nacional de Control y Eliminación de la enfermedad en Cuba.
3. Las evidencias sobre la capacidad diagnóstica de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED, para la detección de bacilos ácido alcohol resistente, la avala para su uso en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.
4. El mayor rendimiento y eficiencia de la tinción fluorescente mediante la microscopía de fluorescencia LED para identificar frotis con escasos bacilos, acredita la prueba como una alternativa a la tinción Zielh Neelsen para optimizar el diagnóstico bacilosκόpicó de la tuberculosis pulmonar en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.

RECOMENDACIONES

7 RECOMENDACIONES

- 1.** Ampliar el diagnóstico molecular por Xpert® MTB/RIF a otros grupos de riesgo de desarrollar tuberculosis definidos en el Programa Nacional de Control y Eliminación de la tuberculosis.
- 2.** Determinar el rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha de TB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
2. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana, Cuba: Anuario Estadístico de Salud; 2024. ISSN: ISSN: 1561-4433. Disponible en: <https://temas.sld.cu/estadisticassalud/2024/03/>
3. Aplicación de la estrategia fin de la TB: aspectos esenciales. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2016. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/implementacion-estrategia-fin-tb-aspectos-esenciales>
4. Vallego VP, Rodríguez JC, Searle MA, Farga CV. Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir 2015;31(2):127-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482015000200010>
5. Martínez Romero MR, Pedrera Pozo N, García León GC, Sardiñas Aragón M, Mederos Cuervo LM, Díaz Rodríguez R. Validación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en Cuba. Rev CENIC Cienc Biol 2021;52(3):259-66. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502021000300259&lng=es

6. World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. Policy statement 2011. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2011.8. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44602>
7. Imaz M, Allassia S, Aranibar M, Gunia A, Susana Poggi S, Togneri A. Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina. *Bioméd* 2017;37(2):164-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3276>
8. Goel S, Pandey R, Kumar M, Kankaria A, Khaneja, R. Impact of introducing light emitting diode fluorescence microscopy services for diagnosis of pulmonary tuberculosis under Revised National Tuberculosis Control Program India. *Lung India* 2018;35:307-11. DOI: https://doi.org/10.4103%2Flungindia.lungindia_475_17
9. Martínez Romero MR, Secretário Chilemo T, Lemus Molina D, Mederos Cuervo LM, Sardiñas Aragón M, García León G et al. Evaluación del Xpert MTB RIF para el diagnóstico de tuberculosis y detección de resistencia a rifampicina en grupos vulnerables. *Neumol Cir Tórax*. 2019; 78 (3): 284-9. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462019000300284

10. Li S, Liu B, Peng M, Chen M, Yin W, Tang H, et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 2017;12(7): e0180725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180725>
11. Rodríguez Lugo DA, Villamil Castañeda LP, Lasso Apráez JI, Garzón Herazo JR, Celis Preciado C. Xpert MTB/RIF Ultra: innovación en el diagnóstico de la tuberculosis. Univ Med 2021; 62(1). DOI: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed62-1.xper>
12. Díaz Rodríguez R, Lemus Molina D, Martínez Romero MR. La tuberculosis en Cuba en tiempos de COVID-19: ¿retroceso en su plan de eliminación?. Rev Cubana Med Trop 2020;72(3):e585. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300014&Ing=es. Epub 08-Feb-2021
13. Actualización de los lineamientos de la política económica y social del partido y la revolución para el período 2016-2021 aprobados en el 7mo congreso del partido en abril de 2016 y por la asamblea nacional del poder popular en julio de 2016. República de Cuba. 2016. Disponible en <http://www.granma.cu/file/pdf/gaceta/.pdf>.
14. Constitución de La República de Cuba. 2019. Disponible en <http://www.granma.cu/file/pdf/gaceta/.pdf>.
15. Cartes Parra JC. Breve historia de la Tuberculosis. Rev Medica Costa Rica y Centroamérica 2013; LXX (605): 145-50. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=40692>

- 16.** Fitzgerald DW, Sterling TR, Haas DW. *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bennett JE, Dolin R, Blaser, MJ, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth Edition. Philadelphia: Elsevier Inc; 2015. p: 2787-818. Disponible en: <https://shop.elsevier.com/books/mandell-douglas-and-bennetts-principles-and-practice-of-infectious-diseases/bennett/978-0-323-48255-4>
- 17.** Ministerio de Salud Pública. Resolución Ministerial 277/2014. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de normas y procedimientos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 2015. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/programa_2015.pdf
- 18.** Compendium of WHO guidelines and associated standards: ensuring optimum delivery of the cascade of care for patients with tuberculosis, second edition. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514101>
- 19.** WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control, 2019 update, Geneva: World Health Organization; 2019. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/311259>
- 20.** Global tuberculosis report 2024. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>

- 21.** Torres Duque CA, Fuentes Alcalá ZM, Rendón A, Battista Migliorid G. Hoja de ruta para la eliminación de la tuberculosis en Latinoamérica y el Caribe. Arch Bronconeumol. 2018;54(1):7–9.). Disponible en: <https://www.archbronconeumol.org/es-hoja-ruta-eliminacion-tuberculosis-latinoamerica-articulo-S0300289617302570>
- 22.** Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Washington, DC: OPS; 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275326497>.
- 23.** González Ochoa E, González Díaz A, Armas Pérez L, Llanes Cordero MJ, Marrero Figueroa A, Suárez Álvarez L et al. Tendencia de la incidencia de Tuberculosis en Cuba: lecciones aprendidas en 1991-1994 y su trascendencia en 2004-2012. Rev Cub Med Trop 2015; 67(1):122-38. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602015000100012
- 24.** Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana, Cuba: Anuario Estadístico de Salud; 2017. ISSN: 1561-4433. Disponible en: <https://instituciones.sld.cu/cimeq/2018/04/11/anuario-estadistico-de-salud-2017/>
- 25.** Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana, Cuba: Anuario Estadístico de Salud; 2019. ISSN: 1561-4433. Disponible en: <https://temas.sld.cu/estadisticassalud/2020/05/13/publicado-el-anuario-estadistico-de-salud-2019/>

- 26.** Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/teams/globaltuberculosis-programme/tb-report>
- 27.** Lemus D, Echemendía M, Díaz R, Llanes MJ, Suárez L, Marrero A. Antituberculosis Drug Resistance in Pulmonary Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, Cuba 2012–2014. MEDICC Review 2017; 19 (1): 10 – 5. Disponible en: <https://www.scielosp.org/article/medicc/2017.v19n1/10-15/>
- 28.** Montoro E, Lemus D, Echemendía M, Díaz R, Mederos L, Martínez MR et al. Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000-2009. Rev Panam Salud Pública 2011; 30(6):615-8. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/9410>
- 29.** Rigouts L, Cogneau S. The Genus *Mycobacterium*. En: Green LH y Goldman E, editores. Practical Handbook of Microbiology. Fourth Ed. US: CRC Press; 2021.p 443-4. Disponible en: https://www.routledge.com/Practical-Handbook-of-Microbiology/Green-Goldman/p/book/9780367567644?srsIid=AfmBOorGCUJqcQDoJZpGHhE6P-fabhwXWhwEHQ7Ps_aQXrqm-6OHO3U2
- 30.** Micobacterias. En: Fraga JL, García Carbajal NL, editores. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25 edición. México, DF: McGraw Hill Interamericana; 2001.p: 289-300. Disponible en: https://www.academia.edu/51148273/Jawetz_Melnick_y_Adelberg_Microbiolog%C3%ADa_m%C3%A9dica_25a_edici%C3%B3n

- 31.**Dezemon Z, Muvunyi CM, Jacob O. Staining techniques for detection of acid fast bacilli: what hope does fluorescein-diacetate (FDA) vitality staining technique represent for the monitoring of tuberculosis treatment in resource limited settings. Trends in Bacteriology 2014. Disponible en: <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2057-4711-1-1.pdf>
- 32.**WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection, third edition. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240089501>
- 33.**Chaidir L, Parwati I, Annisa J, Muhsinin S, Meilana I, Alisjahbana B et al. Implementation of LED fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary and HIV-associated tuberculosis in a hospital setting in Indonesia. PLoS One 2013; 8:e61727. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3631225/>
- 34.**ORAS – CONHU, (2018). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: manual de actualización de la baciloscopía, Lima, Perú. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-para-diagnostico-bacteriologico-tuberculosis-parte-1-manual-actualizacion>
- 35.**Directrices unificadas de la OMS sobre la tuberculosis. Módulo 3: Diagnóstico. Métodos de diagnóstico rápido para la detección de la tuberculosis. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2022. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://doi.org/10.37774/9789275325391>.

- 36.** N'Guessan K, Hnatkovich BJ, Aka NG, Achy-Brou A, Coulibaly B, Assande JM et al. QBC ParaLens™ LED fluorescent microscope attachment with QBC FAST™ AFB staining system. JTR 2013; 1 (3): 40-3. Disponible en: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=40618>
- 37.** Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G, Ademun P, Mukkada S, Nyesiga B, et al. Performance of Three LED-Based Fluorescence Microscopy Systems for Detection of Tuberculosis in Uganda. PLoS ONE 2010;5(12): e15206. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015206>
- 38.** QBC Paralents Advances. Manual de instrucciones, 2011. Disponible en: https://www.woodleyequipment.com/docs/qbc_paralens_manual_spanish.pdf
- 39.** Directrices unificadas de la OMS sobre la tuberculosis. Módulo 3: Diagnóstico. Métodos de diagnóstico rápido para la detección de la tuberculosis. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2022. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://doi.org/10.37774/9789275325391>.
- 40.** WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240029415>
- 41.** WHO standard: universal access to rapid tuberculosis diagnostics. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240071315>

- 42.** World Health Organization. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. WHO/HTM/TB/2013.16. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506335>
- 43.** Símboli NF, González CD. Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Estado actual del conocimiento. Rev Am Med Resp 2022;22:249-59. Disponible en: <https://doi.org/10.56538/ramr.NNBE9983>
- 44.** Rendón Macías ME, Villasís Keever MÁ. Fases para determinar la utilidad clínica de las pruebas diagnósticas. Rev Alerg Mex. 2020;67(3):279-285. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/ram/v67n3/2448-9190-ram-67-03-279.pdf>
- 45.** Zamora Romero J, Nieves Plana M, Abraira Santos V. Estudios de evaluación de la validez de una prueba diagnóstica: revisión sistemática y metanálisis. Nefrología 2009;29 (Sup. Ext. 6):15-20. Disponible en: <https://www.revistanefrologia.com/es-estudios-evaluacion-validez-una-prueba-articulo-X2013757509002245>
- 46.** Martín Conejero A. Validación de test diagnósticos (primera parte). Test categóricos. Angiología 2023;75(2):101-5. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0003-31702023000200101
- 47.** Sancho Insenser JJ, Ana María González Castillo AM. Pruebas diagnósticas. ¿Cómo describir su validez?. Cir Esp 2022;100(9):590–94. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-pdf-0009739X22000446>

- 48.** Altman DG y Bossuyt PM. Estudios de precisión diagnóstica (STARD) y pronóstica (REMARK). Med Clin (Barc). 2005;125 (Supl. 1):49-55. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-pdf-13083734>
- 49.** Ochoa Sangrador C, Molina Arias M. Evaluación de la precisión de las pruebas diagnósticas. Variables discretas. Evid Pediatr. 2017;13:28. Disponible en: https://evidenciasenpediatria.es/files/41-13048-RUTA/Fundamentos_MBE_28.pdf
- 50.** Tarabla HD. Validación de Pruebas Diagnósticas. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 2002;1 (1):37-41. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/269920527_Validacion_de_Pruebas_Diagnosticas
- 51.** Cerda J y Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. Rev Chil Infect 2012; 29 (2): 138-41. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200003
- 52.** Díaz García L, Medina Vera I, García de la Puente S, González Garay A. Estudios de exactitud diagnóstica. Acta Pediátrica de México 2019;40(6): 342-57. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/4236/423665716005/html/>

- 53.** Customer Training Manual: Mycobacterial Testing With BacT/ALERT® Systems and Media. Global Customer Support K5 31JAN09 [Citado junio 2023]. Disponible en: <http://www.tbevidence.org/documents/rescentre/sop/BacTALERT%20TM.pdf>
- 54.** Minion J, Pai M, Ramsay A, Menzies D, Greenaway C. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid-fast bacilli in a low incidence setting. PLoS ONE. 2011;6(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811622>
- 55.** Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33 (1):159-74. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/843571/>
- 56.** Clinical Review & Education. Special Communication. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Participants. 75th WMA General Assembly, Helsinki, Finland. JAMA 2024; E1-E4. Disponible en:
- 57.** Vandembroucke JP, Von Elm E, Altman DG, Gotzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ et al. Mejorar la comunicación de estudios observacionales en epidemiología (STROBE): explicación y elaboración. Gac Sanit [Internet]. 2009 Abr [citado 2025 Ene 04]; 23 (2): 158e1-158e28. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112009000200015&lng=es.

- 58.** Domínguez J, Latorre I, Molina Moya B, Lacoma A, Prat Aymerich C. Nuevos métodos en el diagnóstico rápido de la tuberculosis. Medicina respiratoria 2017; 10 (1): 37-45. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2019/sj193e.pdf>
- 59.** Moussa H, Bayoumi FS, Ali AM. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF assay for direct diagnosis of pulmonary tuberculosis. Saudi Med J 2016; 37 (10):1076-81. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5075370/>
- 60.** Ortiz Jiménez J, Franco Sotomayor G, Ramos Ramírez M. Validación e implementación de GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico de tuberculosis en Ecuador. Kasma 2019; 47(1):29-37. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/3730/373061540006/html/>
- 61.** Fabiola Arias MF y Herrera MT. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir 2016; 32: 254-259. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rcher/v32n4/art07.pdf>
- 62.** Agrawal M, Bajaj S, Bhatia V, Dut S. Comparative Study of GeneXpert with ZN Stain and Culture in Samples of Suspected Pulmonary Tuberculosis. J Clin and Diagnostic Research. 2016;10(5): DC09-DC12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948388/>
- 63.** Lozano Salazar JL, Plasencia Asorey C, Montanél DM, Puente Saníl. Coinfección por tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana: confluencia de dos epidemias. MEDISAN 2012; 16(9):1438-50. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1029-30192012000900015

- 64.** Peralta Gómez I, Cabrera Rodríguez MC, Gutiérrez Díaz MJ. Coinfección TB/VIH: una amenaza para los programas de control de ambas enfermedades. *Medicent Electrón* 2015;19(3): 160-2. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432015000300005
- 65.** Coinfección TB/VIH: Guía Clínica Versión actualizada 2010. Washington, D. C.: OPS, 2010. ISBN 978-92-75-33156-9. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/18608>
- 66.** WHO operational handbook on tuberculosis. Module 6: tuberculosis and comorbidities, second edition. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091290>
- 67.** Por qué el VIH y la tuberculosis constituyen una combinación mortal?. Disponible en: <https://www.greenfacts.org/es/tuberculosis/l-2/4-vih-sidatb.htm>.
- 68.** Zarate E, Lobón I, Saavedra C, Castañeda M. Tuberculosis en nuevos escenarios: establecimientos penitenciarios. *An Fac Med Lima* 2005; 66(2): 148-58. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832005000200009

- 69.** Zahid QA, Khursheed N, Adnan F, Zafar A. Concordance and discordance of GeneXpert MTB/RIF and conventional culture method for diagnosis of Extra-Pulmonary Tuberculosis at a tertiary care hospital in Pakistan. *Pak J Med Sci.* 2024;40(2): S64-S69. DOI: [https://doi.org/10.12669/pjms.40.2\(ICON\).8967](https://doi.org/10.12669/pjms.40.2(ICON).8967)
- 70.** García P, Balcells ME, Castillo C, Miranda C, Geoffroy E, Román JC *et al.* Evaluación de la técnica Xpert® MTB/RIF para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras extra-pulmonares. *Rev chil infectol* 2017;34(4):333-9. DOI: [10.4067/s0716-10182017000400333](https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000400333)
- 71.** Park M, Kon OM. Use of Xpert MTB/RIF and Xpert Ultra in extrapulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2021 Jan;19(1):65-77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32806986/>
- 72.** Himadri Bhusan B, Sarita K, Sarita O, Sujeet K, Suryakanta S, Archana P *et al.* Impact of cartridge-based nucleic acid amplification test (CBNAAT) introduction on the detection of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis in Bhubaneswar, Odisha. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2023;66(4):764-9. DOI: [10.4103/ijpm.ijpm_666_22](https://doi.org/10.4103/ijpm.ijpm_666_22)
- 73.** García P, Balcells ME, Castillo C, Miranda C, Geoffroy E, Román JC *et al.* Evaluación de la técnica Xpert® MTB/RIF para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras extra-pulmonares. *Rev chil infectol* 2017;34(4):333-9. DOI: [10.4067/s0716-10182017000400333](https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000400333)

- 74.** World Health Organization. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. WHO/HTM/TB/2013.16. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506335>
- 75.** Khanal, S. Baral, P. Shrestha, M. Puri, S. Kandel, B. Lamichanne, et al. Yield of intensified tuberculosis case-finding activities using Xpert® MTB/RIF among risk groups in Nepal. *PHA* 2016; 6(2): 136–41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27358808/>
- 76.** Scott LE, McCarthy K, Gous N, Nduna M, Van Rie A, Sanne I. Comparison of Xpert MTB/RIF with other nucleic acid technologies for Diagnosing Pulmonary Tuberculosis in a High HIV Prevalence Setting: A Prospective Study. *PLoS Medicine* 2011; 8(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144192/pdf/pmed.1001061.pdf>
- 77.** Pinyopornpanish K, Chaiwarith R, Pantip C, Keawvichit R, Wongworapat K, Khamnoi P, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF assay and the conventional sputum microscopy in detecting *Mycobacterium tuberculosis* in Northern Thailand. *Tuberc Res Treat* 2015:2015:571782. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/571782>
- 78.** Mavenyengwa RT, Shaduka E, Maposa I. Evaluation of the Xpert® MTB/RIF assay and microscopy for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Namibia. *Infect Dis of Poverty* 2017; 6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5237317/>

- 79.**Loannidis P, Papaventsis D, Karabela S, Nikolaou S, Panagi M, Raftopoulou E. Cepheid GeneXpert MTB/RIF Assay for *Mycobacterium tuberculosis* Detection and Rifampin Resistance Identification in Patients with Substantial Clinical Indications of Tuberculosis and Smear-Negative Microscopy Results. J Clin Microbiol 2011; 49 (8):3068-70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147726/>
- 80.**Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 2011; 49(4):1621-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122817/>
- 81.**Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martin R, Alcaide F. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. J Clin Microbiol 2011; 49(3):1137–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3067676/>
- 82.**Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicenter implementation study. Lancet 2011; 377 (9776):1495–505. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3085933/>

- 83.**Gong X, He Y, Zhou K, Hua Y, Li Y. Efficacy of Xpert in tuberculosis diagnosis based on various specimens: a systematic review and meta-analysis. *Cell Infect Microbiol* 2023; 13:1149741. DOI: [10.3389/fcimb.2023.1149741](https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1149741).
- 84.**Priyanka Y; Priyanka M; Agarwal, Aditi A, Amit G. Comparative analysis of CBNAAT (GeneXpert) and Ziehl–Nielsen staining test as diagnostic modalities of tuberculosis. *J of Family Medicine and Primary Care* 2024 13(1):124-128. DOI: [10.4103/jfmpe.jfmpe_277_23](https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_277_23)
- 85.**Sharma M, Broor S, Maheshwari M, Singh Sudan DP. Comparison of conventional diagnostic methods with molecular method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Indian J Tuberc* 2023 Apr;70(2):182-9. DOI: [10.1016/j.ijtb.2022.04.006](https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2022.04.006)
- 86.**Habous M, Elimam MA, Kumar R, Deesi Z. Evaluation of GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/Rifampin for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampicin resistance in nonrespiratory clinical specimens *Mycobacteriol* 2019 Apr-Jun;8(2):132-37. DOI: [10.4103/ijmy.ijmy_83_19](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_83_19)
- 87.**Li Y, Pang Y, Zhang T, Xian X, Wang X, Yang J et al. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis with Xpert *Mycobacterium tuberculosis*/rifampicin assay. *J Med Microbiol* 2017;66(7):910-4. DOI: [10.1099/jmm.0.000522](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000522)
- 88.**Atehortúa S, Ramírez F, Echeverri LM, Peñata P, Ospina S. Xpert MTB/RIF test performance assay in respiratory samples at real work settings in a developing country. *Biomédica* 2015; 35:125-30. DOI: [10.1590/S0120-41572015000100015](https://doi.org/10.1590/S0120-41572015000100015)

- 89.** Bajrami R, Mulliqi G, Kurti A, Lila G, Raka L. Comparison of GeneXpert MTB/RIF and conventional methods for the diagnosis of tuberculosis in Kosovo. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10(4):418-22. DOI:[10.3855/jidc.7569](https://doi.org/10.3855/jidc.7569)
- 90.** Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(1):76-84. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6168783/>
- 91.** Kohli M, Schiller I, Dendukuri N, Yao M, Dheda K, Denkinger CM, et al. tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2021; Issue 1. Art. No.: CD012768. DOI: 10.1002/14651858.CD012768.pub3.
- 92.** Marzouk M, Ferjani A, Dhaou M, Ali MH, Hannachi N, Boukadida J. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid-fast bacilli in an area with high tuberculosis incidence. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(3):306-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.023>
- 93.** Xia H, Song YY, Zhao B, Kam K-M, O'Brien RJ, Zhang Z, et al. Multicentre evaluation of Ziehl-Neelsen and light emitting diode fluorescence microscopy in China. *Int J Tuber Lung Dis.* 2013; 17:107-12. DOI: <https://dx.doi.org/10.5588/ijtld.12.0184>

- 94.** Kuhn W, Armstrong D, Atteberry S, Dewbrey E, Smith D, Hooper N. Usefulness of the Paralens™ fluorescent microscope adaptor for the identification of mycobacteria in both field and laboratory settings. *The Open Microbiol J* 2010; 4:30-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2885593/>
- 95.** Van Deun A, Chonde T, Gumusboga M, Rienthong S. Performance and acceptability of the FluoLED Easy™ module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Inter J Tuberc Lung Dis* 2008; 12(9):1009-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18713497/>
- 96.** VP, Rodríguez JC, Searle MA, Farga CV. Ensayo Xpert/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. *Rev Chil Enferm Respir* 2015; 31: 127-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482015000200010>
- 97.** Gelalcha AG, Kebede A, Hassen Mamo H. Light-emitting diode fluorescent microscopy and Xpert MTB/RIF® assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis among patients attending Ambo hospital, west central Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2017; 17:613. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2701-5>
- 98.** Ngabonziza SCJ, Sengooba W, Mutua F, Torrea G, Dushime A, Gasana M, et al. Diagnostic performance of smear microscopy and incremental yield of Xpert in detection of pulmonary tuberculosis in Rwanda. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):660. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2009-x>

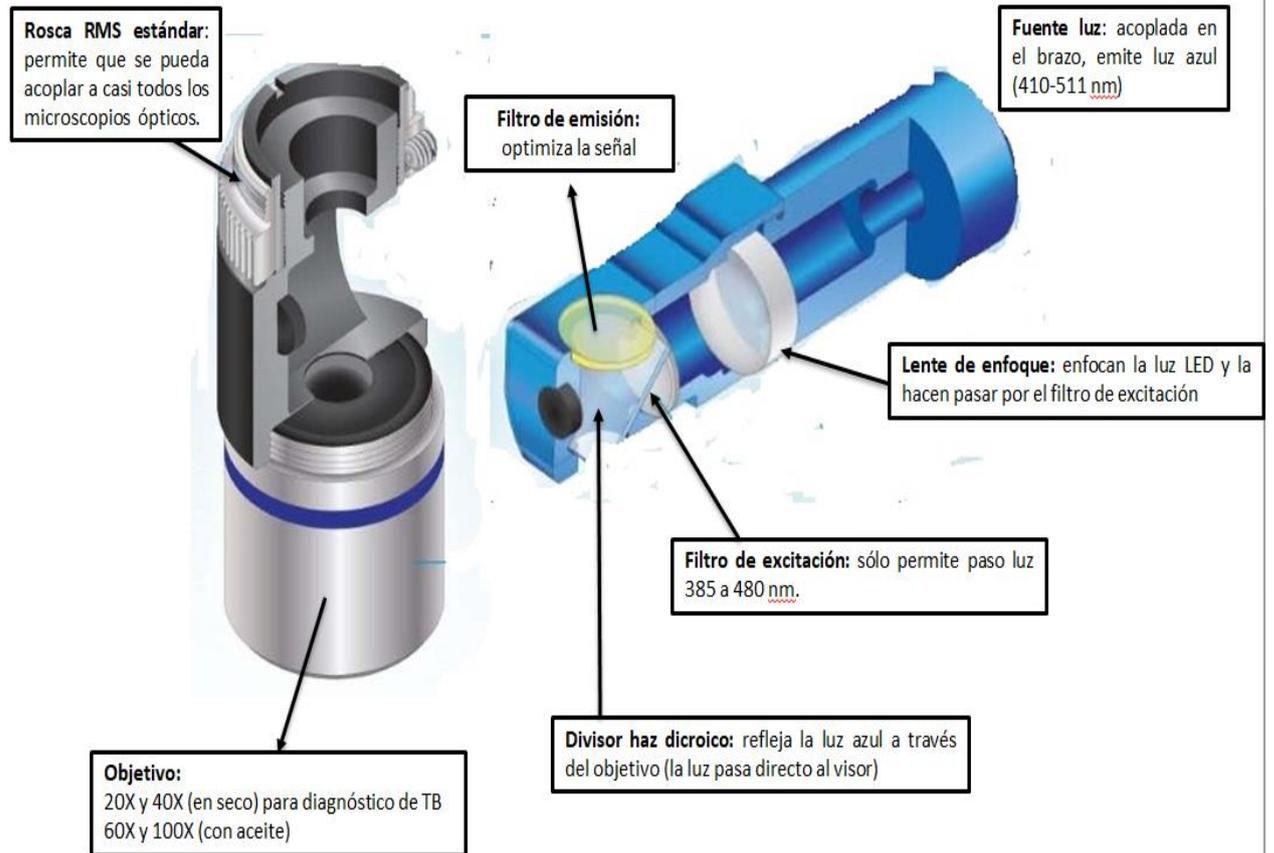
- 99.** Chang WE, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. *Eur Respir J.* 2016;47(3):929-37. DOI: <https://doi.org/10.1183/13993003.00978-2015>
- 100.** Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica. *Rev Chil Infect.* 2012;29(2):138-41. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
- 101.** Martinez MR, Sardiñas M, Garcia G, Mederos LM, Díaz R. Evaluation of BacT/ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. *JTR* 2014;2:59-64. Disponible en: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=46598>
- 102.** Iram S, Zeenat A, Hussain S, Yusuf NW, Askam M. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay- report from a developing country. *Pak J Med Sci* 2015; 31(1):105–10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25878624/>

ANEXOS

9 ANEXOS

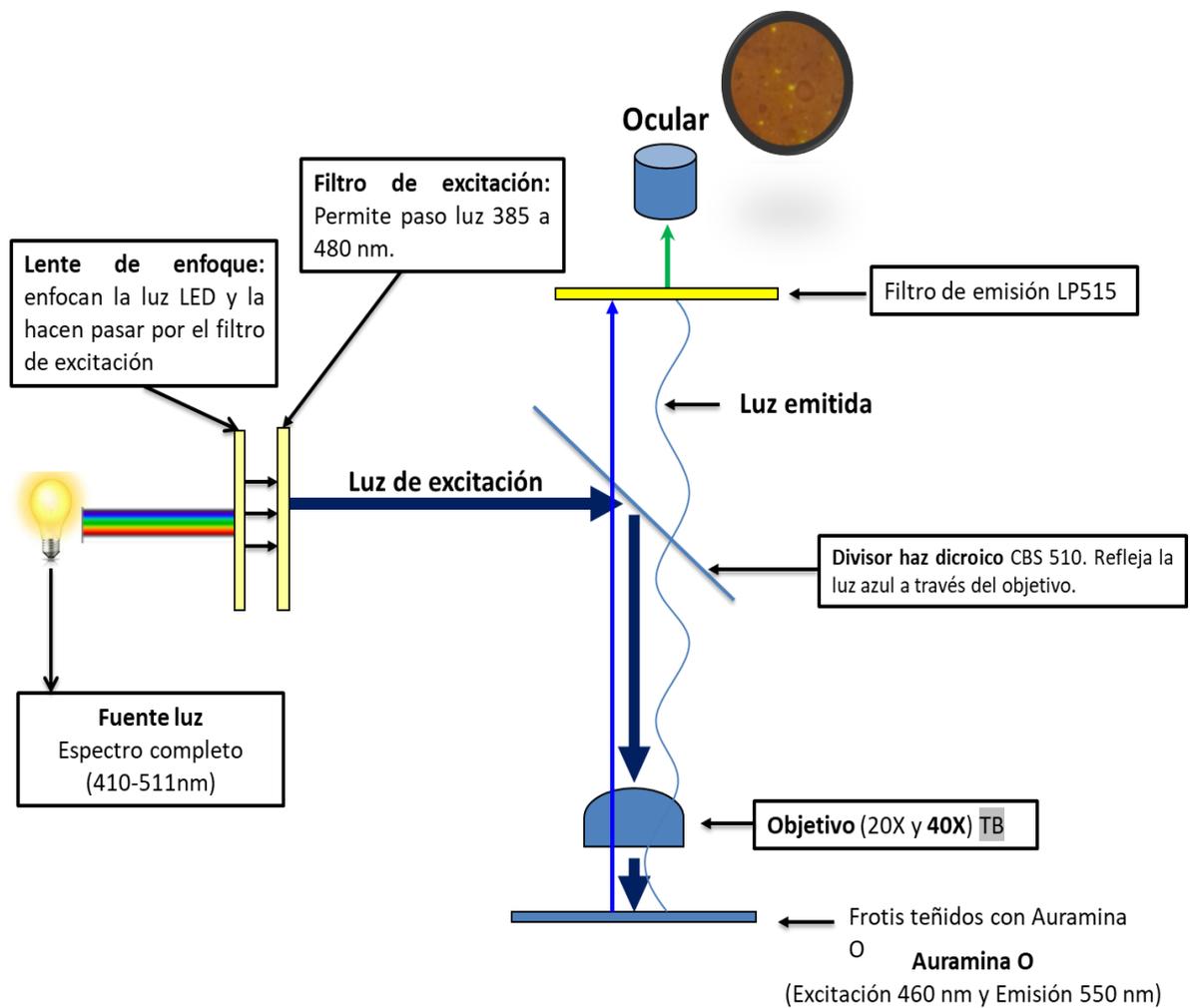
Anexo 1. Partes y funcionamiento del Adaptador QBC ParaLens™

Partes del Adaptador QBC ParaLens™



Realizado por la autora

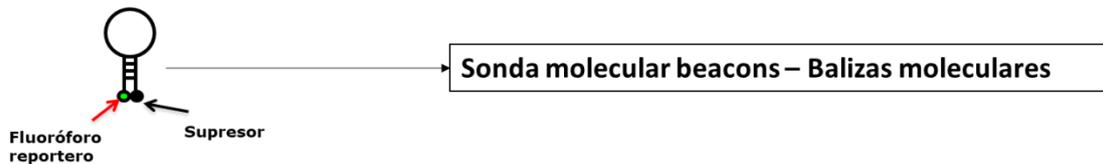
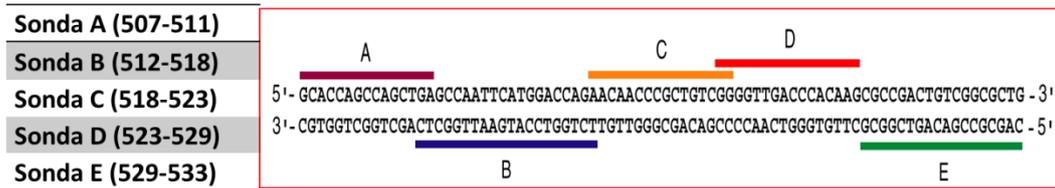
Principio del funcionamiento del Adaptador QBC ParaLens™



Realizado por la autora

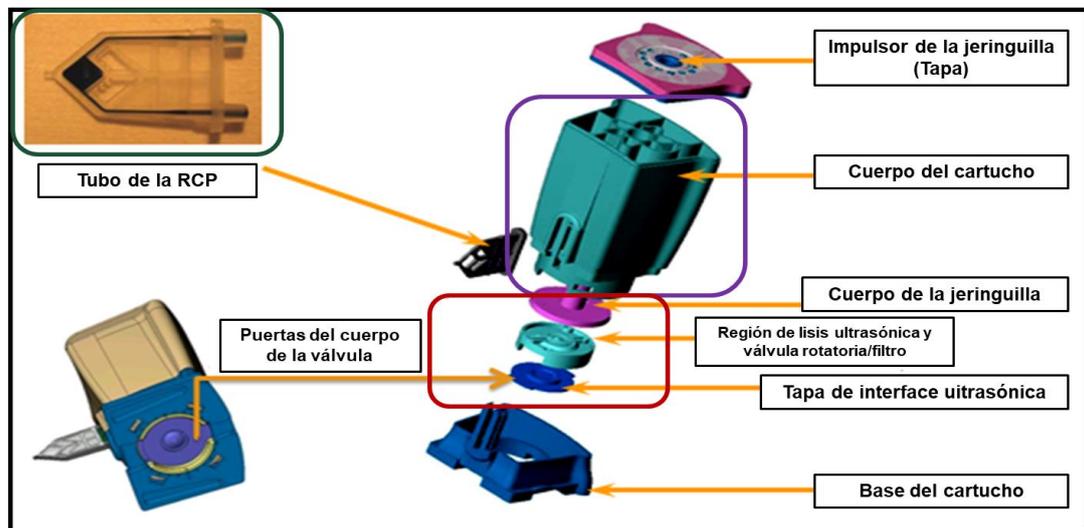
Anexo 2. Sondas, partes y tecnología del cartucho Xpert® MTB/RIF

Sondas que se incluyen en el ensayo (adaptado por la autora)



La unión de la sonda a su diana, libera al fluoróforo, emitiendo fluorescencia.

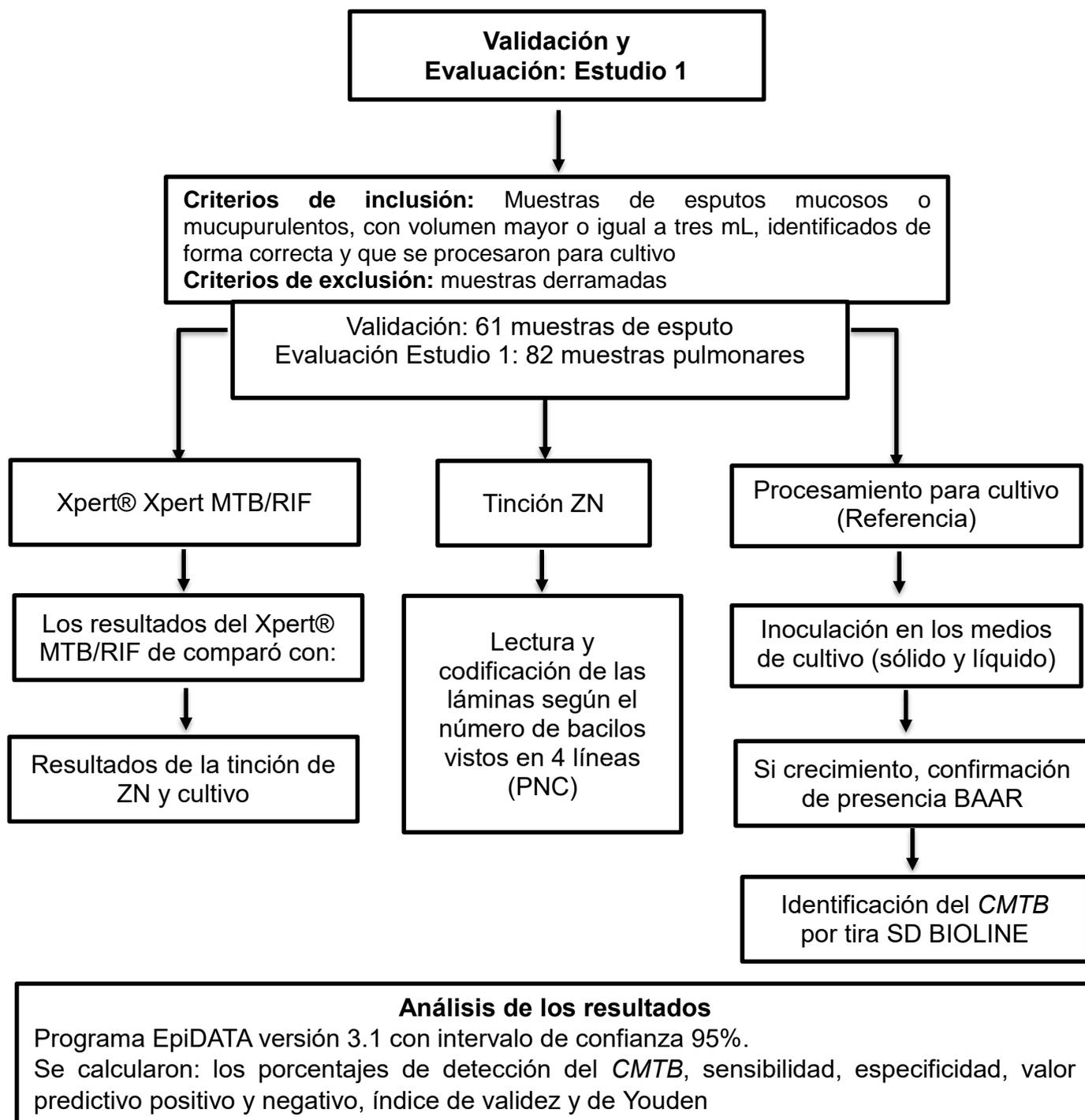
Partes y tecnología del cartucho (adaptado por la autora)



Leyenda: RCP: reacción en cadena de la polimerasa/ ADN: ácido desoxirribonucleico

Anexo 3. Algoritmo para dar salida a los objetivos 1 y 2, relacionados con el ensayo Xpert® MTB/RIF

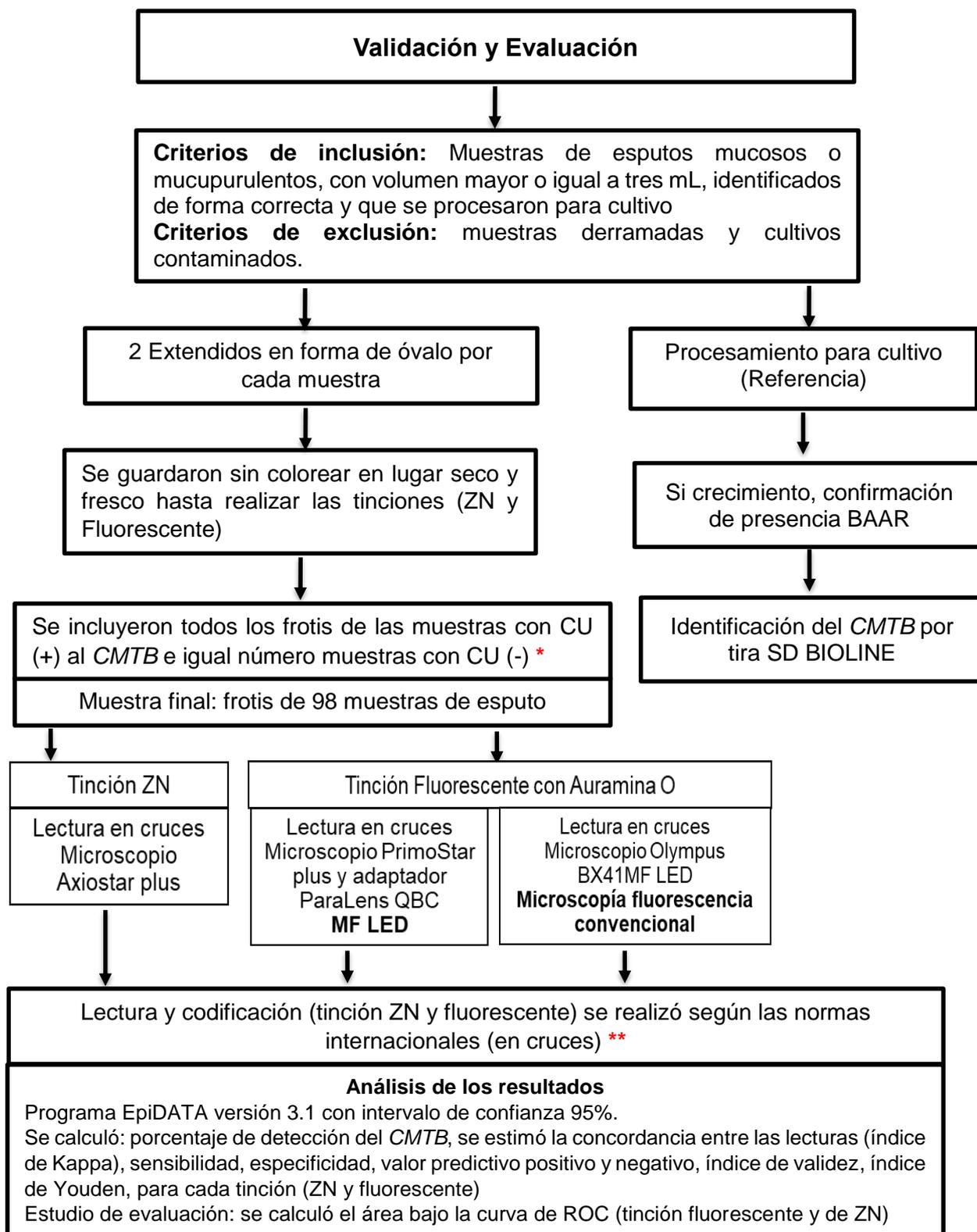
Objetivo 1 y 2



Leyenda: MF LED: microscopía de fluorescencia LED/ ZN: Ziehl Neelsen/ CMTB: complejo *M. tuberculosis*, CU: cultivo/ PNC: Programa Nacional de Control

Anexo 4. Algoritmo para dar salida a los objetivos 3 y 4, relacionados con a la tinción fluorescente por MF LED

Objetivo 3 y 4

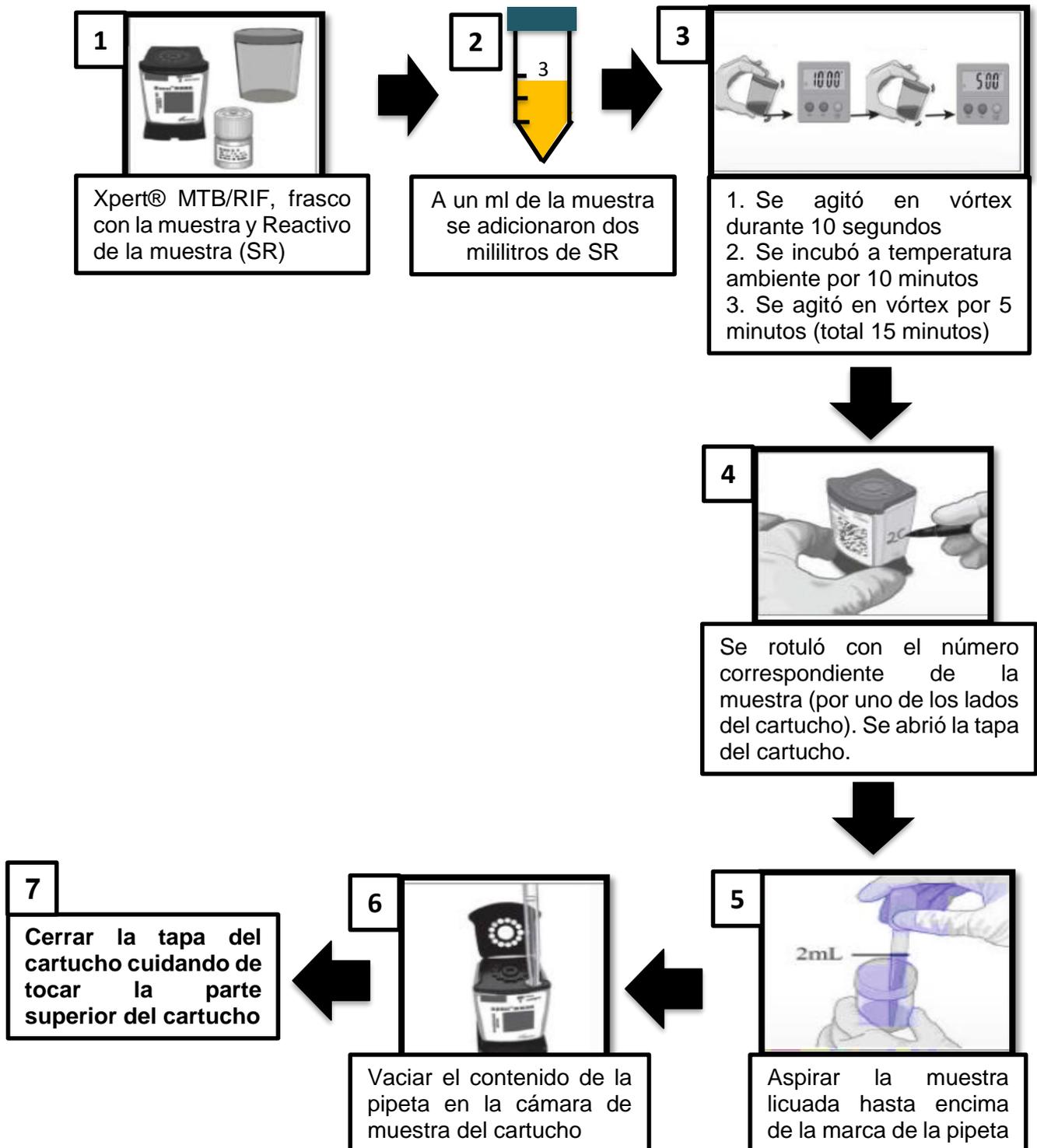


* Se siguió la metodología descrita por Minion et al, 2011/ ** ORAS CONHU, 2018

Leyenda: MF LED: microscopía de fluorescencia LED/ ZN: Ziehl Neelsen/ CMTB: *complejo M. tuberculosis*/ BAAR: bacilos ácido alcohol resistente/ CU: *cultivo*

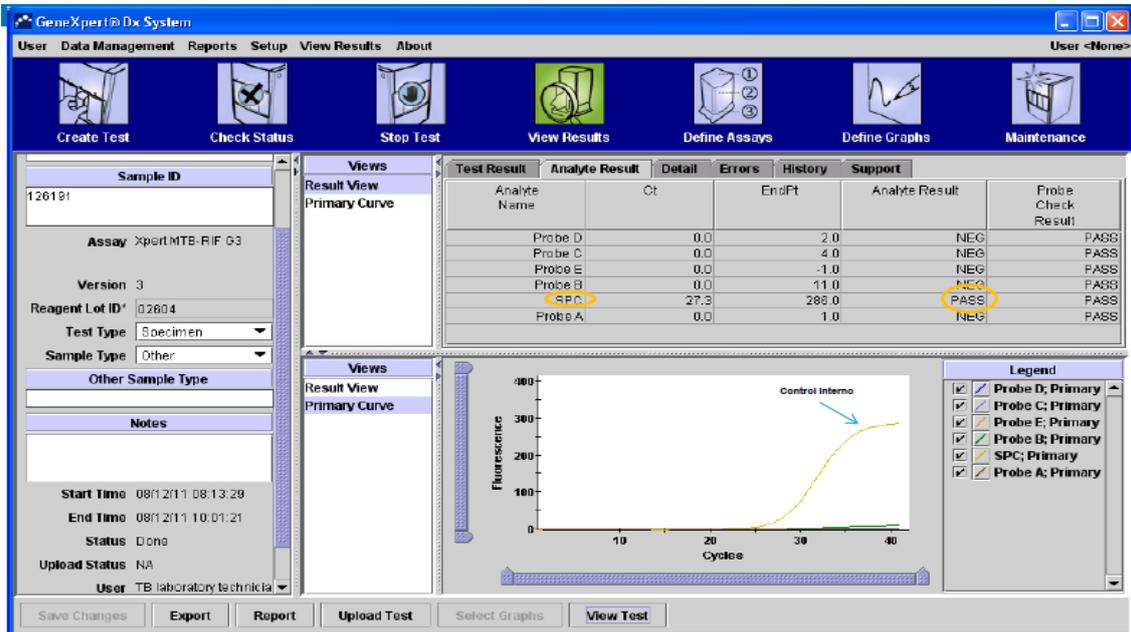
Anexo 5. Procesamiento de las muestras para realizar el ensayo Xpert MTB/RIF y salidas de los resultados del equipo GeneXpert

Procesamiento de muestras pulmonares

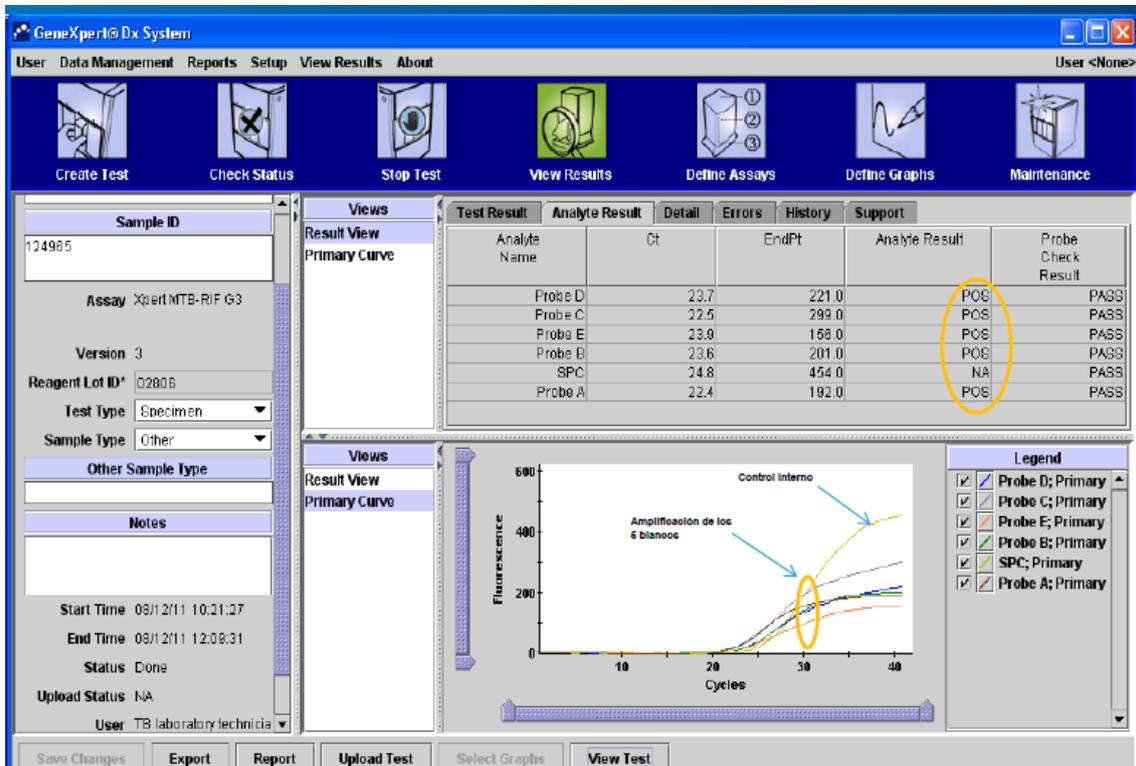


Salidas de los resultados del equipo GeneXpert

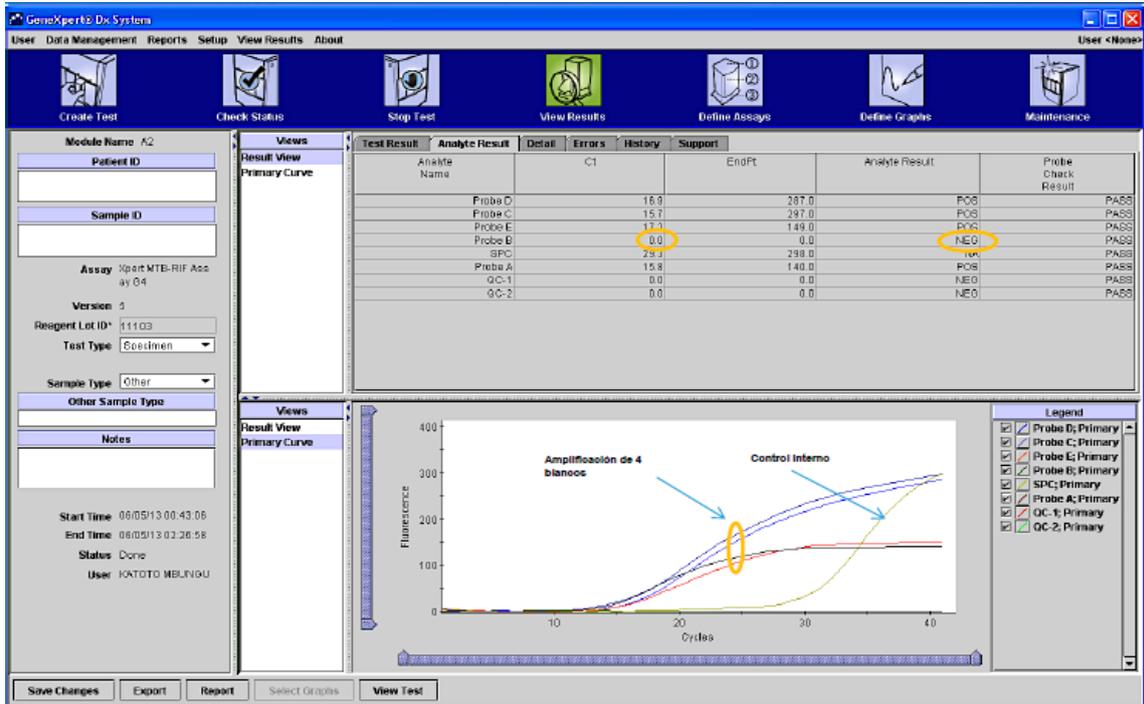
MTB NO DETECTADO



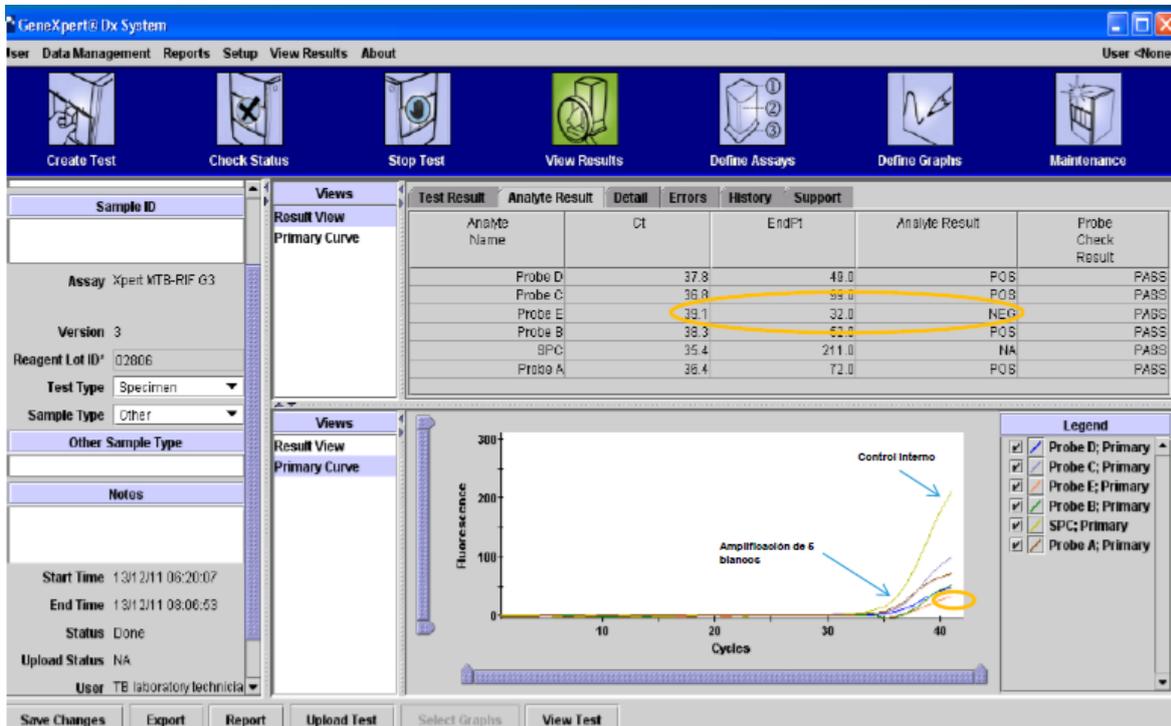
CMTB DETECTADO/ RESISTENCIA A RIF NO DETECTADA



CMTB DETECTADO/ RESISTENCIA A RIF DETECTADA



CMTB DETECTADO/ RESISTENCIA A RIF INDETERMINADA



Anexo 6. Elaboración de medio de cultivo Löwenstein Jensen.

Fundamento: se dividen en tres grupos principales: los medios preparados en base de huevos, los medios de agar y los líquidos. El medio ideal para aislar a las micobacterias debe cumplir con los requisitos siguientes: a) ser barato y fácil de preparar utilizando ingredientes fácilmente accesibles; b) inhibir el crecimiento de contaminantes; c) favorecer un desarrollo abundante de una pequeña cantidad de bacilos; y d) permitir una diferenciación preliminar de las colonias aisladas sobre la base de su morfología. Para el cultivo de las muestras el medio más adecuado es el preparado en base de huevo, ya que cumple con todos los requisitos señalados.

Reactivos: Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), Citrato de magnesio, Asparagina, Glicerol, Piruvato de sodio y Agua destilada.

Materiales: erlenmeyer de 500 ml y 1000 ml, probeta de 10 y 1000, irrigador de 500 ml y 1000 ml, tubos de 20x150 mm con tapa de rosca, gradilla, reloj contador, gasa y papel, horno de tiro de aire forzado, incubadora.

Procedimientos

1. Primero se pesan los reactivos como se describe:

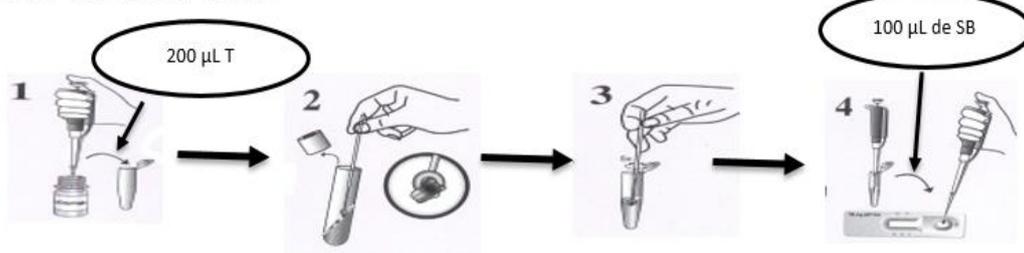
KH_2PO_4	2,4 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,24 g
Citrato de magnesio.....	0,6 g
Asparagina.....	3,6 g

2. Se adicionó 600 mL de agua destilada.

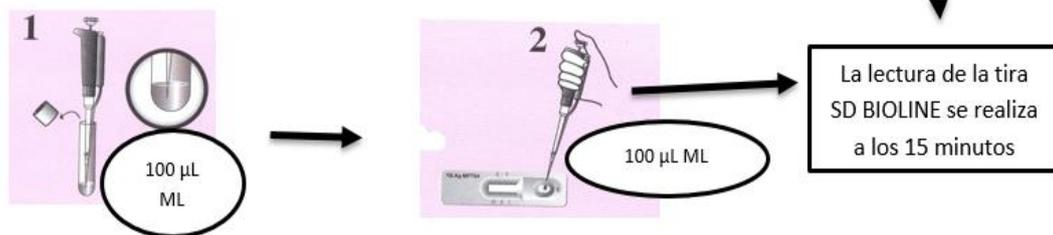
3. Se aplicó calor y se agitó hasta que se evidenció una disolución total.
4. Se adicionó 12 ml de glicerol y se agitó por varios segundos.
5. Se adicionó 0,4 g de verde malaquita y agitó por varios segundos.
6. Se mezcló la solución con 1000 ml de huevos frescos homogenizados. Se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos.
7. Se distribuyó con el irrigador 6,5 ml en tubos 20 x 150 mm.
8. Los tubos se colocaron con las tapas flojas y en plano inclinado dentro del horno coagulador a una temperatura de 82 grados por una hora.
9. Se dejó enfriar de forma lenta dentro del horno, para evitar la formación de agua de condensación.
10. Se sacaron luego del horno y se guardaron en refrigeración a 4 grados hasta su uso.

Anexo 7. Identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante e ensayo inmunocromatográfico de la Tira SD BIOLINE

Medio de cultivo sólido

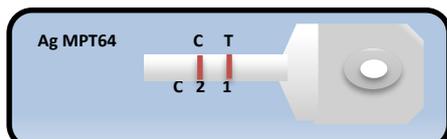


Medio de cultivo líquido

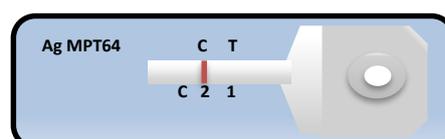


Leyenda: T: Tampón/ SB: suspensión bacteriana/ ML: medio líquido positivo a micobacterias

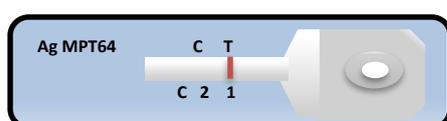
Interpretación de los resultados. Realizado por la autora



Prueba positiva. Presencia del Ag MPT64. Identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*



Prueba Negativa. No se detecta el Ag MPT64. Identificación de Micobacterias no tuberculosas



Resultado no válido. Cuando aparece sólo la banda de la muestra o no aparece ninguna.

Anexo 8. Preparación de los reactivos para la tinción fluorescente.

Auramina-O

Solución 1 (Auramina O 1%)

Manipular la auramina con guantes (es cancerígena y debe evitarse todo contacto directo con el polvo o la solución).

Auramina-O	10 g
Etanol 95° p.a	1000 ml

- Se disolvió el polvo de auramina-O en etanol y se dejó de un día para otro, a una temperatura entre 25 y 30 °C.
- Se rotuló la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Esta solución es estable por 12 meses guardada en frasco color caramelo al abrigo de la luz.

Solución 2

Cristales de fenol (*)	30 g
Agua destilada cap.....	900ml

Se rotuló la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento.

Solución de trabajo: Auramina-O 0,1%

- En una botella color ámbar se colocaron 50 ml de solución 1 y 450 ml de la solución 2.
- Se ajustó la tapa del frasco. Se mezcló bien y se dejó reposar de un día para otro.

Nota: La Auramina-O de reciente preparación tiene un color amarillo oro intenso. Si el colorante resulta pálido, descartarlo. Rotular con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente, alejado del calor y protegido de la luz, no más de un mes. Filtrar la Auramina cuando se aplica sobre los extendidos durante el proceso de coloración.

Solución decolorante

Ácido clorhídrico p.a..... 5 ml

Etanol c.s.p..... 1000 ml

Colorantes de contraste: solución permanganato de potasio al 0,5%

Solución de permanganato de potasio 0,5%

Permanganato de potasio..... 5 g

Agua destilada..... 1000 ml

- Colocar el permanganato de potasio en el interior de un Erlenmeyer de 2 litros de capacidad conteniendo 500 ml agua destilada.
- Agitar hasta disolver.
- Agregar los restantes 500 ml de agua y agitar.
- Guardar en una botella color ámbar bien tapada. Rotular con el nombre y las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente no más de 12 meses.

La solución debe ser color púrpura. Si se transforma en rojiza significa que el permanganato se ha oxidado, y la solución debe ser descartada.

Control de Calidad de la Auramina

Control de calidad de Auramina

N° de producción	Cantidad	Operador
Fecha de producción/...../20.....	Vida útil 1 month	Fecha de vencimiento/...../20.....

Preparacion de Auramine O 0.1% con 3% Fenol

Componentes	Marca/Código	Lote nr	Fecha de vencimiento	
Auramina O		/...../20.....	g
Alcohol (etanol o metanol)		/...../20.....	ml
Fenol		/...../20.....	g
Agua destilada o purificada		/...../20.....	ml

Conservación
A temperature ambiente protegido de la luz durante 1 mes

Control de calidad

Fecha/...../20....	Resultados				
	Frotis	Resultado esperado	Resultado observado*	Interpretación (Acepta o rechaza **)	Comentarios (ej. cristales +/-)
	CP	1+			
	CN	neg			
	AZME /PERM				

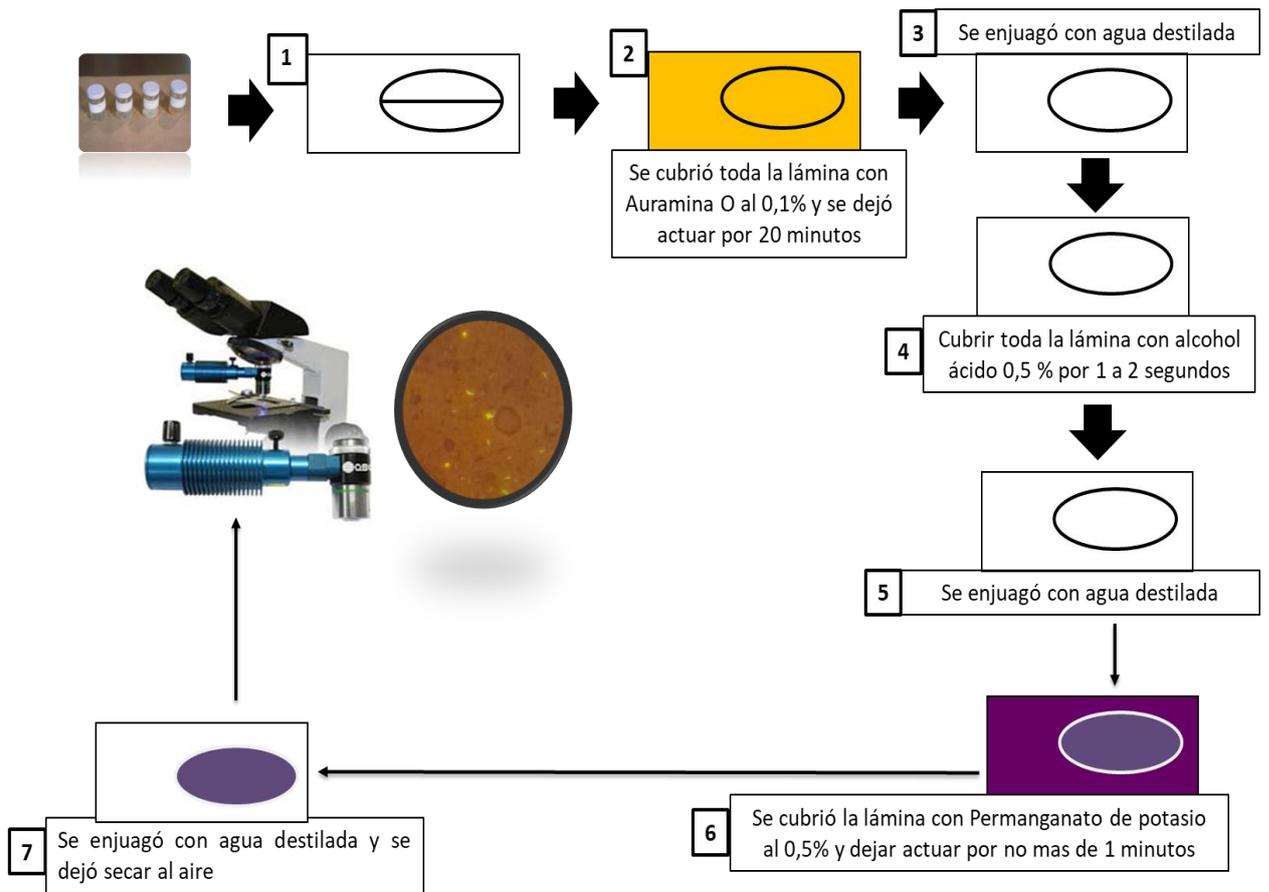
*Usar la escala de UICLD/OMS

** **Acepta** si los resultados observados se aproximan a los esperados; **Rechaza** si los resultados son muy diferentes (más de un grado en la escala) entre los observados y esperados. Un segundo CP puede ser coloreado si es necesario.

CP: Control Positive; **CN:** Control Negative, **AZME/PERM:** Azul de metileno o Permanganato de potasio (completar con el n° de lote)

Primer uso del lote		
Fecha	Nombre	Firma
...../...../20.....

Anexo 9. Tinción fluorescente con Auramina



Realizado por la autora

Anexo 10. Capacitaciones

Cursos de actualización en Xpert® MTB/RIF, 2017.



Taller Regional sobre nuevas herramientas para el diagnóstico en TB



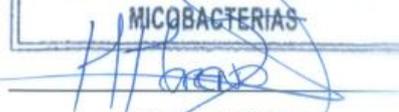
Capacitación en el diagnóstico por tinción de fluorescencia en el Instituto de Salud Pública de Chile. Octubre, 2016.



Certificado de Capacitación

El presente documento certifica que **María Rosarys Martínez Romero**, ha recibido la "Capacitación Diagnóstico por tinción de fluorescencia, Experiencia Chilena a Cuba" en modalidad teórica y práctica, realizada en el Instituto de Salud Pública de Chile" por la profesional del Laboratorio Supranacional de Tuberculosis de la Región de las Américas, dependiente del Instituto de Salud Pública de Chile, realizada entre los días 14 al 28 de octubre de 2016 por un total de 110 horas pedagógicas.

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE
CENTRO DE REFERENCIA DE
MICOBACTERIAS



T.M. Marcela Moreno J.
Centro de Referencia Supranacional de Micobacterias
Instituto de Salud Pública de Chile

Chile, octubre 2016

Anexo.11 Avaluos

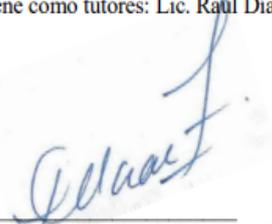
Aval de la Comisión Científica Especializada de Microbiología



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)

AVAL DE LA COMISIÓN CIENTÍFICA ESPECIALIZADA DE MICROBIOLOGÍA

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CCEM), como órgano asesor científico-técnico del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), ha aprobado la propuesta de Protocolo de trabajo para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias titulado: **Técnicas rápidas para incrementar la detección de casos de tuberculosis en el avance hacia la eliminación de la enfermedad en Cuba**, de la Dra. María Rosarys Martínez Romero M. Sc. y que tiene como tutores: Lic. Raúl Díaz Rodríguez, Dr. C y Dr. Amilcar Duquesne Alderete, Dr. C.


Dra. María Teresa Illnait Zaragoza, Dr C
Presidente CCEM, IPK

La Habana, 24 de junio de 2022



**COMITÉ DE ETICA DE LA INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 16-20

"Fortalecimiento de las capacidades investigativas, los conocimientos y las acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en Cuba"

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Lic. Alina Martínez Rodríguez

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.
3. **APROBADO SIN MODIFICACIONES**, el documento presentado.

Dado, en el IPK, La Habana, a los 3 días del mes de abril de 2020

DrCs. Eric Martínez Torres
Presidente CEI-IPK

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Eric Martínez Torres', is written over the printed name and title.



**COMITÉ DE ETICA DE LA INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**

CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD

El que firma certifica que todas las actividades de investigación de esta solicitud, que involucra humanos, fueron examinados y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", que se reunió en:

La Habana, Instituto Pedro Kourí, 3 días del mes de abril de 2020

(lugar y fecha)

El Comité de Ética estuvo formado por los siguientes miembros:

Nombre y Apellidos	Profesión	Cargo actual/ institución
DrCs Eric Martínez Torres (Presidente)	Médico (Pediatra)	Invest. Titular/IPK
DrCs. Pedro Más Bermejo (Vicepresidente)	Médico (Epidemiólogo)	Invest. Titular/IPK
DrC. Daniel González Rubio (Vicepresidente)	Médico (Infectólogo)	Invest. Titular/IPK
DrC. Iliana Valdés Hernández	Lic. Microbiología	Invest. Titular/IPK
DrC. María C. Montalvo Villalba (Miembro)	Médico (Inmunóloga)	Invest. Titular/IPK

Presidente del Comité de Ética Institucional

DrCs. Eric Martínez Torres
Presidente CEI/IPK

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"



**COMITÉ DE ETICA DE LA INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**

ANEXO 2

DECLARACIÓN DE AUSENCIA DE CONFLICTO DE INTERESES

Los abajo firmantes, miembros del CEI-IPK, que hemos revisado el protocolo de Investigación y demás documentos relacionados con el Proyecto: **“Fortalecimiento de las capacidades investigativas, los conocimientos y las acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en Cuba”** (CEI-IPK 16-20), **DECLARAMOS:**

No tener conflicto de intereses que impidan o comprometan la revisión objetiva de los mismos.


DrCs. Eric Martínez Torres
Presidente CEI-IPK

La Habana, 3 de abril de 2020

Publicaciones

1. Martínez Romero MR, Secretário Chilemo T, Lemus Molina D, Mederos Cuervo LM, Sardiñas Aragón M, García León G, Echemendía Font M, Díaz Rodríguez R. Evaluación del Xpert MTB RIF para el diagnóstico de tuberculosis y detección de resistencia a rifampicina en grupos vulnerables. Neumol Cir Tórax. 2019; 78 (3): 284-9. [dx.doi.org/10.35366/NT193D](https://doi.org/10.35366/NT193D).
2. Martínez Romero MR, Pedrera Pozo N, García León GC, Sardiñas Aragón M, Mederos Cuervo LM, Díaz Rodríguez R. Validación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en Cuba. Rev CENIC Cienc Biol 2021; 52(2): 259-66.
3. Martínez Romero MR, Pedrera Pozo N, García León G, Sardiñas Aragón M, Mederos Cuervo LM, Díaz Rodríguez R. Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en Laboratorio Nacional de Referencia de tuberculosis de Cuba. Rev cubana Med Trop 2024;76: e980. Publicación continua

Otras publicaciones relacionadas con el tema:

1. Martínez MR, Sardiñas M, García G, Mederos LM, Lemus D, Echemendía M. Impacto del Xpert MTB RIF para el diagnóstico de la tuberculosis en Cuba. Cuba Salud 2018. Disponible en: <http://www.convencionsalud2018.sld.cu/index.php/convencionsalud/2018/paper/view/251/965>
2. Mederos LM, Martínez MR, Sardiñas M, García G, Pereira EG Gross, Díaz R. Aplicabilidad de la herramienta molecular GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico de la Tuberculosis. CENIC Cienc Biol 2020; 51 (3):173-180.

Eventos (20): 12 nacionales y 8 internacionales

1. Congreso 80 Aniversario del IPK. IX Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. - Cartel: "Desempeño del Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y la detección de la resistencia a la Rifampicina en grupos vulnerables". Palacio de las convenciones. Fecha: 4-8/12/2017. Autor principal y la ponencia oral: "Impacto del Xpert MTB RIF para el diagnóstico de la TB en Cuba".
2. Convención Internacional Calixto García 2017. Cartel: "Desempeño del test molecular Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de TB en Cuba ". Fecha: 23/1/2017. Autor principal.
3. III Convención Internacional de Salud Pública. Cuba Salud 2018. Cartel: "Impacto del Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de la TB en Cuba". Fecha: 27/4/2018. Autor principal.
4. 12° Congreso de la Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). Cartel digital. "Introducción del Xpert MTB RIF para el diagnóstico de tuberculosis en Cuba". Panamá. Fecha: 03-06/07/2019. (Autor principal).
5. 15° Congreso Internacional ALAT 2022. Cartel digital. "Evaluación de la microscopia de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en personas viviendo con VIH/sida". Perú. Fecha: 20-23/julio/ 2022. (Autor principal). Cartel digital: "Importancia de diagnóstico molecular del Xpert MTB RIF en personas viviendo con VIH sida en muestras de esputo en Cuba". Colectivo de autores.
6. IV Convención Internacional de Salud Pública. Cuba Salud 2022. Presentación oral: "Evaluación de la microscopia de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en personas viviendo con VIH/sida". Fecha: 17-21/10/2022. Autor

principal. Cartel virtual: "Diagnóstico rápido de tuberculosis utilizando Xpert/MTB RIF en los grupos vulnerables después de la pandemia de covid-19 en muestras de esputo en el IPK". Colectivo de autores.

7. FLAP 2022. Evento virtual. Fecha: 1-4/11/2022. Simposio: Sostenibilidad para la Eliminación Local de La Tuberculosis. Título: "Diagnóstico rápido de TB por Xpert MTB/RIF en Cuba". Martínez Romero MR. Poster digital: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico baciloscópico de la tuberculosis en Cuba". Autor principal.

8. 16 Congreso de la ALAT 2023. Evento virtual. Cartel digital. "Diagnóstico rápido de tuberculosis extrapulmonar en personas inmunodeprimidas utilizando la técnica del Xpert MTB RIF ". Fecha: 10-13/07/2023.

9. Fórum Ciencia y Técnica 2017 (municipal, provincial y nacional). Título: "Impacto del XPERT MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis y la detección de resistencia a la rifampicina". Autor principal.

10. Taller "Determinación social, salud pulmonar y eliminación de la Tuberculosis: aportar soluciones". Panel: "Avances tecnológicos del diagnóstico bacteriológico de la TB. Ponencia: "Resultados de la microscopía LED, cultivo líquido y Xpert MTB-RIF". Martínez MR. (oral). IPK. 21-23/03/2019.

11. XXII Jornada Científica de Médicos Residentes, V Jornada de egresados, II Jornada de Maestros y doctorantes. IPK, La Habana, Cuba. Presentación oral. Título: "Utilidad de la Microscopía LED en el Diagnóstico de Micobacterias. Laboratorio Nacional de referencia e investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias. 2017-2018". Fecha: 30/04/2018. Autores: Pedrera N. Tutores: Martínez MR, Díaz R.

12. I Taller Nacional de Eliminación de la Tuberculosis. Actualización del Laboratorio. Ponencia: "Impacto de la Microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de TB. Experiencia en Cuba ". Fecha: 8-12/10/2018.
13. III Jornada de posgrado, IPK. Título: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de Micobacterias en Cuba, febrero – julio 2018". Fecha: 16/05/2019. Autores: Pedrera N. Tutores: Martínez MR, Díaz R.
14. III Jornada de posgrado de la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. 2019. Título: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de Micobacterias en Cuba. Enero - Julio 2018 ". Fecha: 15/06/2019. Autor: Dra. Nancy Pedrera Pozo. Tutores: Martínez MR, Díaz R.
15. Jornada de Resultado Relevante Institucional. IPK. 2019. Título: "Impacto de la implementación de métodos moleculares para el diagnóstico rápido de micobacterias". Autor principal. Fecha 3-23/10/2019.
16. Fórum de Ciencia y Técnica. 2019 (IPK, municipal, provincial). Título: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de micobacterias en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis de Cuba". Autor principal.
17. Premio Anual de Salud 2019. Instancia Central y Nacional (2019). Categoría: Investigación Aplicada. Título: "Impacto del XPERT MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis en Cuba, 2014-2017".
18. Jornada de Resultado Relevante Institucional. IPK. 2021. Título: "Microscopía de fluorescencia LED como técnica alternativa de diagnóstico en el marco de la Estrategia Fin a la tuberculosis en Cuba". Autor principal. Fecha 3-4/11/2021.

19. Premio Anual de Salud 2022. Instancia Central y Nacional (2022). Categoría: Investigación Aplicada. Título: "Microscopía de fluorescencia LED como técnica alternativa de diagnóstico en el marco de la Estrategia Fin a la tuberculosis en Cuba".

20. Fórum de Ciencia y Técnica 2022 (IPK, municipal). Título: "Microscopía de fluorescencia LED como técnica alternativa de diagnóstico en el marco de la Estrategia Fin a la tuberculosis en Cuba". Autor principal.

Premios

1. Premio de la Especialidad en la III Jornada de posgrado, IPK. Título: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de Micobacterias en Cuba, febrero – julio 2018". Autores: Pedrera N. Tutores: Martínez MR, Díaz R. Fecha: 16/05/2019.

2. Resultado Relevante institucional. IPK. Título: "Impacto de la implementación de métodos moleculares para el diagnóstico rápido de micobacterias ". Fecha: 23/10/2019. Autor principal.

3. Resultado Relevante en el Fórum de Ciencia y Técnica. IPK y municipal 2019. Título: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de micobacterias en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis de Cuba". Autor principal.

4. Mención en el Fórum de Ciencia y Técnica. Nivel Provincial. Título: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de micobacterias en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis de Cuba". Autor principal. Fecha: 20/12/2019.

5. Premio Anual de la Salud a instancia Central y Nacional 2019. Categoría de Investigación Aplicada. Título: Impacto del XPERT MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis en Cuba, 2014-2017. Autor principal.
6. Resultado Relevante institucional IPK. Título: "Microscopía de fluorescencia LED como técnica alternativa de diagnóstico en el marco de la Estrategia Fin a la tuberculosis en Cuba ". Fecha: 4/11/2021. Autor principal.
7. Resultado relevante Fórum de Ciencia y Técnica Institucional, IPK. Título: "Microscopía de fluorescencia LED como técnica alternativa de diagnóstico en el marco de la Estrategia Fin a la tuberculosis en Cuba". Fecha: 14/06/2022. Autor principal.
8. Premio Anual de la Salud a instancia Central y Nacional 2022. Categoría de Investigación Aplicada. Título: "Microscopía de fluorescencia LED como técnica alternativa de diagnóstico en el marco de la Estrategia Fin a la tuberculosis en Cuba". Autor principal.
9. Premio en la categoría de Tuberculosis en el 15º Congreso ALAT 2022. Título: "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en personas viviendo con VIH/sida". Fecha: 20-23/07/2022.

Salidas:

1. Tesis para optar por el título de Especialista de 1er Grado en Microbiología (2):
 - "Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de Micobacterias en Cuba, febrero – julio 2018". Autor: Pedrera N. Defendida: 7/12/2018.

- "Utilidad de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de la tuberculosis en el Hospital Benéfico Jurídico ". Enero-Junio/ 2023 ". Autor: Dra. Mariadna Alfonso Méndez. Defendida: 30/11/ 2023.

2. Tesis para optar por el título de Master en Bacteriología Micología (2):

- "Impacto del Xpert MTB/ RIF para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y detección de la resistencia a la Rifampicina en grupos vulnerables. Mayo – octubre 2016". Autor: Lic. Tynyth Secretário Chilemo. Defendida: 20/10/2017.

- "Rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de Tuberculosis en personas viviendo con VIH/sida. IPK. Abril 2019-febrero 2020". Autores: Pedrera N. Defendida: 28/03/2022.

Forman parte de tareas de proyectos de investigación:

- "Fortalecimiento de las capacidades investigativas, los conocimientos y las acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en Cuba". Código: 03.04.40.17. Coordinador: Lic. Alina Martínez. Financiación: Instituto de Medicina Tropical (IMT), Bélgica. Tarea "Mejorar y acelerar el diagnóstico de la TB en La Habana mediante la microscopía de fluorescencia LED (MF LED) y Xpert MTB/RIF". Internacional

- "Enfermedades emergentes, reemergentes y con potencial pandémico: Nuevos abordajes para el diagnóstico, la prevención y el control". Tarea 1.2. Plataforma técnica: fortalecer el diagnóstico y la vigilancia molecular de las enfermedades infecciosas. Objetivos: 1.2.1. Avanzar y consolidar la capacidad diagnóstica para arbovirus, tuberculosis, Infecciones de transmisión sexual y la resistencia antimicrobiana y 1.2.1.1. Tuberculosis. Internacional