



**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**

**Impacto de la evaluación de técnicas rápidas para incrementar la detección  
de casos de tuberculosis en Cuba**

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

**Autor:** Dra. María Rosarys Martínez Romero, MSc.

La Habana, 2024



**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**

**Impacto de la evaluación de técnicas rápidas para incrementar la detección  
de casos de tuberculosis en Cuba**

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

**Autor:** Dra. María Rosarys Martínez Romero, M.Sc.

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

La Habana, 2024

## **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 padre 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.

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, mi querido esposo, mis hermanos y a mi querida Bibi y familia.

## ABREVIATURAS

**TB:** Tuberculosis

**CMTB:** Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**INH:** Isoniazida

**RIF:** Rifampicina

**TB-MDR:** tuberculosis multidrogorresistente

**TB-RR:** tuberculosis resistente a la rifampicina

**BK:** Baciloscopía

**S:** Sensibilidad

**MF LED:** Microscopía de fluorescencia LED

**LED:** Diodo emisor de luz (siglas en inglés)

**MFC:** Microscopía de fluorescencia convencional

**ZN:** Zielh Neelsen

**IC:** intervalo de confianza

**E:** Especificidad

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**PVV:** personas viviendo con VIH

**PNCTEB:** Programa Nacional de Control y Eliminación de la Tuberculosis

**Minsap:** Ministerio de Salud Pública

**LNRI-TBLM:** Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias

**IPK:** Instituto Pedro Kourí

**GV:** grupos vulnerables

**TBp:** TB pulmonar

**PZA:** pirazinamida

**CN:** casos nuevos

**AT:** antes tratados

**MP:** método de las proporciones

**MNT:** Micobacterias no tuberculosas

**BAAR:** Bacilo ácido alcohol resistente

**LAM:** lipoarabinomanano

**TSTB:** Tamizaje sistemático de la tuberculosis

**IGRA:** interferón-gamma

**TCP:** tuberculina

**PSF:** susceptibilidad a los fármacos

**LJ:** Löwenstein Jensen

**PF:** pruebas fenotípicas

**PDR:** pruebas de diagnóstico rápidos

**LPA:** Pruebas con sondas lineales

**NAAT:** Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (siglas en inglés)

**ID:** Indicadores de desempeño

**IY:** índice de youden

**C:** Concordancia

**VPP:** Valor predictivo positivo

**VPN:** Valor predictivo negativo

## SÍNTESIS

Para el avance hacia la eliminación de la tuberculosis (TB) es necesario incrementar la detección de casos y la sensibilidad del diagnóstico. El objetivo del estudio fue evaluar dos técnicas para el diagnóstico rápido de la TB. Se comprobó el valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF y de la microscopía de fluorescencia LED (MF LED) en esputos, así como evaluación de la precisión diagnóstica de la prueba molecular en muestras clínicas y el rendimiento de la MF LED en esputos para el diagnóstico de la TB en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Pedro Kourí, de junio 2014 a julio 2018. Los resultados de ambas técnicas se compararon con los métodos convencionales. Se calcularon los indicadores de desempeño y se utilizó el cultivo bacteriológico como prueba de oro. Xpert® MTB RIF: se demostró que el % de detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) en esputos fue mayor por la prueba molecular (29,5%) en comparación con la tinción de ZN (11,5%), diferencia que fue significativa ( $p=0,0249$ ); con una sensibilidad en relación al cultivo sólido (92,86%) y líquido (100%) elevados. El índice de youden calculado tuvo valores muy cercanos a uno (por encima de 0,75). En el primer estudio de evaluación de la prueba en grupos vulnerables, las personas que viven con VIH (9/82) y antes tratados (8/82) fueron donde se detectaron mas casos de TB, de ellos en seis la baciloscopía fue negativa. En el segundo estudio se incrementó la positividad con la prueba molecular tanto en muestras pulmonares (10%) como extrapulmonares (9,4%), en relación a la baciloscopía como prueba inicial; en el caso particular de PVV se incrementó en un 9,3%. La sensibilidad de la prueba en ambos estudios fue del 100%, con un índice de youden cercano a uno. MF LED: se demostró que las técnicas fluorescentes incrementan la positividad en un 13,3%, cuando se compara con la tinción de Ziehl Neelsen (ZN), además se identificaron mayor número de frotis paucibacilares. La sensibilidad (77,55%) e índice de youden (0,78) fueron superiores a las que se obtuvo por la coloración de ZN (48,98% y 0,49). El estudio de evaluación evidenció que esta técnica permitió detectar 10 casos más con frotis positivos que la baciloscopía convencional, además de identificar mayor número de frotis con escasos bacilos (seis). Se comprueba que el Xpert® MTB/RIF y la

MF LED, resultan confiables para el diagnóstico rápido de la TB, lo que impacta y fortalece el Programa Nacional de Control en Cuba. La introducción de la prueba incrementa el diagnóstico rápido y oportuno de la TB, lo que posibilita el manejo adecuado, inicio del tratamiento específico, disminuye la transmisión y diseminación en la comunidad. La MF LED tiene mayor rendimiento y es más eficiente para identificar frotis con escasos bacilos, lo que la avala como alternativa a la tinción de ZN y permite optimizar el diagnóstico bacilosκόpico de la TB pulmonar en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.



## TABLA DE CONTENIDO

No.		Pág.
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Antecedentes.....	1
1.2.	Problema Científico .....	5
1.3.	Hipótesis .....	5
1.4.	Objetivos .....	5
1.5.	Novedad Científica .....	6
1.6.	Valor teórico – práctico .....	6
<b>II.</b>	<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
2.1.	Breve historia de la tuberculosis.....	8
2.2.	Epidemiología de la Tuberculosis.....	9
2.2.1.	Estrategia Fin a la Tuberculosis.....	9
2.2.2.	Situación Epidemiológica de la tuberculosis a nivel mundial....	10
2.2.3.	Situación Epidemiológica de la tuberculosis en Las Américas.	13
2.2.4.	Situación Epidemiológica de la tuberculosis en Cuba.....	15
2.3.	Tuberculosis resistente a fármacos .....	16
2.4.	Taxonomía y características generales de las micobacterias.....	17
2.5.	Morfología y características de las micobacterias.....	19
2.5.1.	Morfología .....	19

## TABLA DE CONTENIDO

2.5.2.	Características culturales de las micobacterias .....	20
2.5.3.	Estructura celular de las micobacterias .....	22
2.6.	Tamizaje sistemático de la tuberculosis (TSTB) .....	23
2.6.1.	Fundamento .....	23
2.7.	Diagnóstico de la tuberculosis .....	25
2.7.1.	Pruebas para el diagnóstico de la infección de tuberculosis ...	25
2.7.2.	Diagnóstico de laboratorio .....	26
2.7.2.1.	Baciloscopía .....	26
	Pruebas diagnósticas recomendadas por la OMS	
2.7.2.2.	para el diagnóstico de la TB y TB resistente a drogas .....	28
2.7.2.2.1.	Cultivo bacteriológico .....	28
2.7.2.2.2.	Diagnóstico rápido para la detección de tuberculosis .....	30
2.7.2.2.3.	Pruebas diagnósticas iniciales para el diagnóstico de TB sin detección de farmacorresistencia .....	37
2.7.2.2.4.	Otras técnicas de identificación .....	39
2.7.3.	Algoritmos de diagnóstico de tuberculosis recomendados por la OMS .....	40

## TABLA DE CONTENIDO

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
3.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF y de la microscopía de fluorescencia LED .....	42
3.1.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF .....	42
3.1.1.1. Procedimientos .....	43
3.1.1.1.1. Procedimientos para realizar el ensayo molecular Xpert® MTB/RIF .....	43
3.1.1.1.2. Procedimiento para realizar la baciloscopia de ZN .....	44
3.1.1.1.3. Procedimientos para realizar la lectura de las láminas .....	45
3.1.1.1.4. Procedimientos para el procesamiento de las muestras, inoculación en los medios de cultivo e identificación en especie .....	45
3.2. Comprobación del valor diagnóstico de la MF LED.....	48
3.2.1. Procedimientos para realizar la microscopia de ZN, tinción fluorescente y lectura de las láminas .....	49
3.3. Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares.....	52

3.3.1.	Primer estudio de evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares .....	52
3.3.2.	Segundo estudio de evaluación en muestras pulmonares y extrapulmonares.....	52
3.3.3.	Evaluación del rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras de esputo para el diagnóstico de la tuberculosis .....	54
3.4.	Procesamiento de los datos y análisis de los resultados .....	54
3.4.1.	Xpert® MTB/RIF .....	54
3.4.1.1.	Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF .....	55
3.4.1.2.	Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares.....	55
3.4.2.	Microscopía de fluorescencia LED.....	56
3.4.2.1.	Comprobación del valor diagnóstico de la microscopía de fluorescencia LED .....	56
3.4.2.2.	Evaluación del rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras de esputo para el diagnóstico de la tuberculosis .....	57
3.5.	Aspectos éticos .....	57

---

<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
4.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF y la microscopía de fluorescencia LED.....	60
4.1.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF..	60
4.1.2. Comprobación del valor diagnóstico de la microscopía de fluorescencia LED .....	63
4.2. Evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares.....	65
4.2.1. Primer estudio de evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares de personas pertenecientes a grupos vulnerables de mayor probabilidad de desarrollar TB.....	65
4.2.2. Segundo estudio de evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares.....	70
4.3. Evaluación del rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras de esputo para el diagnóstico de la tuberculosis.....	76

<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
5.1. Comprobación del valor diagnóstico y evaluación de la prueba molecular Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis .....	80
5.2. Comprobación del valor diagnóstico y rendimiento de la técnica de microscopía de fluorescencia LED en esputos.....	96
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>103</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>104</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>105</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	

## I. INTRODUCCION

### 1.1. Antecedentes

La tuberculosis (TB) es una de las diez principales causas de muerte en todo el mundo y la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, clasificado por encima del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)/sida. La TB es causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). La enfermedad de forma típica afecta los pulmones (TB pulmonar) pero también puede afectar otros sitios (TB extrapulmonar). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca de una cuarta parte de la población mundial está infectada por CMTB (1).

En mayo del 2014, en la celebración de la 67ª Asamblea Mundial de Salud, los estados miembros, adoptan una Estrategia mundial y metas para la prevención, la atención y el control de la TB después del 2015, denominada más tarde como “Estrategia Fin de la TB”. Esta estrategia cuenta con una serie de intervenciones que pueden adaptarse a nivel nacional y tiene 10 componentes organizados en tres pilares y cuatro principios fundamentales. El pilar número tres aborda el tema de la innovación e investigación intensificada, donde se expone que para poner fin de la epidemia de TB se necesitan de la introducción de nuevos métodos de diagnóstico (2).

La pandemia de la COVID-19 revierte años de progreso en la prestación de servicios esenciales y carga de la TB. El impacto más obvio es una gran caída mundial en el número de personas recién diagnosticadas y notificadas con esta

enfermedad. En 2019, se notifican 7,1 millones de personas y este valor decrece a 5,8 millones en 2020, una disminución del 18% con relación a 2012 y muy por debajo de la estimación de la OMS (10 millones de personas enfermas con TB en 2020). El acceso reducido al diagnóstico y tratamiento de la TB provoca un aumento de las muertes por este agente patógeno. Las mejores estimaciones para 2020 es de 1,3 millones de muertes entre personas VIH negativas (frente a 1,2 millones en 2019) y 214 000 más entre personas viviendo con este virus (209 000 en 2019). (1)

La TB farmacorresistente representa un problema de salud pública y para el control mundial de la TB. La resistencia a isoniazida (INH) y rifampicina (RIF), dos de los medicamentos de primera línea más efectivos, es la mayor preocupación. La resistencia a ambos fármacos se define como TB multidrogorresistente (TB-MDR). Tanto la TB-MDR como la TB resistente a RIF (TB-RR), requieren de tratamiento con medicamentos de segunda línea. (1)

La principal limitación de los Programas de Control de la TB es la dificultad para realizar el diagnóstico temprano de la enfermedad. La baciloscopía (BK) es el método inicial para el diagnóstico de la TB por su simplicidad, rapidez de procesamiento y bajo costo. Está disponible en la mayoría de los países en vías de desarrollo, sin embargo, su sensibilidad (S) es muy variable (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 en medio sólido 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. En los últimos decenios se desarrollan nuevos métodos que intentan superar las limitaciones de los métodos convencionales de diagnóstico. (3) (4)

Varias tecnologías están aprobadas para mejorar el diagnóstico de la TB. Una de ellas es la microscopía de fluorescencia (MF) LED (*Light-Emitting Diodes, por sus siglas en inglés*). Esta técnica brinda a los países con recursos limitados acceso a los beneficios de microscopía de fluorescencia convencional (MFC). Las ventajas y su buen desempeño (los microscopios ópticos se convierten a fuentes de luz LED con adaptadores, son menos costosos, requieren menos energía, pueden funcionar con baterías, consume menos tiempo de observación y lectura, además la calidad de la tinción es más fácil de controlar), hace que la OMS recomiende su uso, desde el 2011, como una alternativa a la microscopía convencional con la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) en laboratorios de alto y bajo volumen de procesamiento de muestras y que esta debe sustituirse de manera escalonada. (5) (6) (7)

También en 2011, una novedosa herramienta, que se basa en la amplificación de ácidos nucleicos, denominada ensayo Xpert® MTB/RIF (*Cepheid, Sunnyvale, EE. UU*), se recomienda por la OMS como prueba inicial para el diagnóstico de TB. (8) Es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real que permite detectar ADN (ácido desoxirribonucleico) del *CMTB* y de forma simultánea detecta la resistencia a RIF, una de las drogas de primera línea

---

en el tratamiento de la TB (9). Este método integra el procesamiento del esputo, la extracción de ADN y la amplificación en un solo paso de preparación de la muestra; es automatizada, detecta el ADN a partir de la muestra y el resultado se obtiene en menos de dos horas, además disminuye el riesgo de contaminación y no son necesarias instalaciones de bioseguridad especiales. (10)

Cuba se encuentra dentro de los diez países con una tasa incidencia estimada de TB por debajo de 10 x 100 000 habitantes en la región de Las Américas y está en condiciones de avanzar a eliminar esta enfermedad como problema de salud pública, antes de 2035. (11) Para ello, el Programa Nacional de Control y Eliminación de la TB (PNCET) en conjunto con el Ministerio de Salud Pública (Minsap) y el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en TB, lepra y otras micobacterias (LNRI-TBLM) del Instituto Pedro Kourí (IPK), cuenta con un Plan Estratégico Nacional basado en la Iniciativa Mundial de Fin de la TB donde se establecen objetivos, metas, estrategias y prioridades para alcanzar este hito. Uno de sus objetivos es implementar técnicas de laboratorio que aumenten la sensibilidad y rapidez en la detección de casos.

Para el LNRI-TBLM y el PNCET de Cuba, constituye una prioridad contar con herramientas que permitan un diagnóstico oportuno tanto de la TB como de la resistencia a las drogas antituberculosas.

Las estrategias actuales de control de la TB deben adaptarse para lograr un progreso sostenible hacia la eliminación de la enfermedad. Mejorar la calidad de los métodos de diagnóstico es uno de los pilares para alcanzar este propósito. A este

---

respecto, el Xpert® MTB/RIF puede ser uno de los mejores enfoques para aumentar la sensibilidad y la velocidad de detección de casos. Además, tiene el valor agregado de detectar de forma simultánea la resistencia a RIF en dos horas. Esta tecnología tiene como activo una mayor sensibilidad para detectar TB pulmonar (TBp) entre los casos de frotis negativo, lo que es útil en particular para la detección de esta enfermedad en personas viviendo con VIH (PVV).

### 1.2. Problema científico

En Cuba existe una brecha entre los casos estimados de tuberculosis y los que se notifican al Programa Nacional de Control. Para incrementar la detección de los casos es necesario introducir técnicas rápidas y más sensibles. ¿En qué medida el Xpert® MTB/RIF y la microscopía de fluorescencia LED pueden incrementar la detección de casos y contribuir a la eliminación de la tuberculosis en Cuba?

### 1.3. Hipótesis

La Microscopía de Fluorescencia LED y el XPERT MTB/RIF puede contribuir a la eliminación de la tuberculosis en Cuba mediante la detección de entre un 5 y 10% de los casos, con una estrategia de búsqueda adecuada.

### 1.4. Objetivos

- Comprobar el valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF y de la microscopía de fluorescencia LED para la identificación rápida del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en esputos de pacientes con sospecha de tuberculosis en Cuba.

- Evaluar la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares, así como el rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en esputos para el diagnóstico de la tuberculosis a nivel nacional.

### 1.5. Novedad Científica

Se abordan nuevas tecnologías diagnósticas, recomendadas por la OMS, introducidas por primera vez en Cuba, para el diagnóstico rápido de la TB y TB resistente a medicamentos antituberculosos.

Se demuestran y se aportan evidencias científicas sobre la mayor sensibilidad de la Xpert® MTB/RIF y de la microscopía de fluorescencia LED para incrementar la detección de casos de tuberculosis, lo cual se traduce en mejorar la calidad del diagnóstico de la enfermedad en Cuba.

### 1.6. Valor teórico – práctico

Los resultados alcanzados contribuyen a dar respuesta en términos de diagnóstico y referencia. Permite elevar el conocimiento sobre esta temática en los aportes que brinda en cuanto al impacto que tienen estas herramientas para mejorar la detección de casos con TB y TB resistente a RIF.

El valor práctico radica en que el LNRI-TBLM-IPK dispone de técnicas rápidas y con alta sensibilidad, recomendadas por la OMS, para la detección de casos con TB, lo que permite un mejor manejo y enfrentamiento a la problemática de esta enfermedad en Cuba y otros países de la región.

Los resultados con respecto al Xpert® MTB/RIF y a la microscopía de fluorescencia LED contribuirán a la implementación de dichas tecnologías en el Laboratorio Nacional de Referencia y otros laboratorios de la red del país.

## II. 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 y su dispersión a 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 predinastía egipcia (3500-2650 a.C.) y en restos humanos ubicados en Suecia e Italia que datan del período Neolítico. (12) (13)

Esta enfermedad no se convierte en un problema importante hasta la Revolución Industrial, cuando el hacinamiento y las condiciones socioeconómicas 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. Antes de la aparición de los agentes antituberculosos, la piedra angular del tratamiento consiste en descansar al aire libre en sanatorios especializados. (13)

La era moderna de la TB comienza en el año 1946 con la demostración de la eficacia de la estreptomina. En 1952, la introducción de la INH, permite la curación TB en la mayoría de los pacientes. En 1970, con la adición de la RIF al tratamiento, hace la cura de la enfermedad más efectiva. Con la disponibilidad de este medicamento, la duración de la quimioterapia disminuye de dos años a nueve meses (INH más RIF), y luego a seis meses cuando se usa la terapia multi-medicamentos con INH, RIF y pirazinamida (PZA). Con INH también se vuelve

---

práctico tratar a personas asintomáticas que se cree albergan bacilos tuberculosos basadas en pruebas positivas de tuberculina. (13)

## 2.2. Epidemiología de la Tuberculosis

### 2.2.1. Estrategia Fin a la Tuberculosis

A nivel mundial, la TB continúa como la causa más importante de muerte por único microorganismo infeccioso. A pesar de los esfuerzos en las últimas décadas en la lucha para acabar con la enfermedad, existen muchas brechas que obstaculizan estos esfuerzos, en entornos con recursos limitados y con alta carga de la enfermedad. (14)

Poner fin a la epidemia de la TB, es uno de los pilares de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), que requieren una acción intensiva por parte de todos países, en especial a los territorios con una alta carga de TB. La reducción del 90% de muertes y disminuir el 80% de la tasa de incidencia para 2030, son objetivos de esta estrategia. (15) La misma está organizada en tres pilares: atención y prevención centradas en el paciente, políticas audaces y sistemas de apoyo e intensificar la investigación e innovación, las cuales deberían adaptarse a nivel de país. Además, 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 mientras se abordan todas las determinantes de la epidemia de TB con compromiso de alto nivel y un enfoque multisectorial. (14)

### 2.2.2. Situación Epidemiológica de la tuberculosis a nivel mundial

La TB es una enfermedad transmisible, y a su vez una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Hasta la pandemia del coronavirus (COVID-19), constituye la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, situándose por encima del VIH/sida. Es causada por 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. Del total de personas que desarrollan TB cada año, alrededor del 90% son adultos, con predominio de los hombres sobre las mujeres. (16)

Sin tratamiento, la tasa de mortalidad de la TB es elevada (alrededor del 50%). En la época actual, se recomienda que, con tratamientos de cuatro a seis meses de medicamentos antituberculosos, cerca del 85% de las personas se pueden curar. Además, están disponibles regímenes acortados de uno a seis meses para tratar la infección. La cobertura sanitaria universal es necesaria para garantizar que todas las personas con enfermedad o infección pueden acceder a estos tratamientos. El número de personas que adquieren la infección y desarrollan enfermedad (y a su vez el número de muertes causadas por TB) también se puede reducir a través de acciones multisectoriales que aborden los determinantes sociales, como la pobreza, la desnutrición, la infección por el VIH, el tabaquismo y la diabetes. (16)

La pandemia de COVID-19 tiene un efecto perjudicial en relación al acceso al diagnóstico y tratamiento de la TB, así como la carga de la enfermedad. Los progresos alcanzados en los años anteriores al 2019, se desaceleran, estancan o



se revierten. (16) El impacto más obvio e inmediato es una gran caída global en el número informado de personas recién diagnosticadas con TB. Desde un pico de 7,1 millones en 2019 disminuye a 5,8 millones en 2020 (-18%), de vuelta al nivel visto por última vez en 2012. En 2021, se logra una recuperación parcial (6,4 millones) al nivel informado de 2016-2017. Los tres países que representan la mayor parte de la reducción en 2020 son la India, Indonesia y Filipinas (67% de la población mundial total). Se recuperan de forma parcial en 2021, pero aun así representa el 60% de la reducción global en comparación con 2019. (16)

La reducción de personas diagnosticadas con TB en 2020 y 2021 sugiere un aumento del número de personas no diagnosticadas y no tratadas, lo que conduce a mayor transmisibilidad comunitaria, incremento de muertes, y en consecuencia, con cierto retraso, el aumento de personas desarrollar la TB. (16)

Entre 2019 y 2021, se incrementa el número estimado de muertes por TB a nivel mundial y se revierten años de disminución entre 2005 y 2019. En 2021, se estima 1,4 millones de muertes entre personas seronegativas, con un intervalo de confianza (IC) del 95 %: 1,3–1,5 millones, y de 187 000 muertes (IC 95%: 158 000–218 000) entre personas seropositivas, para un total combinado de 1,6 millones. Esto es superior a las mejores estimaciones de 1,5 millones en 2020 y 1,4 millones en 2019, y da vuelta al nivel del año 2017. La reducción neta de 2015 a 2021 es del 5,9%, alrededor de un sexto del camino hacia el primer hito de la Estrategia Fin a la TB. (16)

En 2021 se estima que enfermarán 10,6 millones de personas (IC 95%: 9,9–11 millones) por TB, un aumento del 4,5 % desde 10,1 millones (IC 95%: 9,5-10,7 millones) en 2020. La tasa de incidencia (casos nuevos por 100 000 habitantes) se incrementa en un 3,6% entre 2020 y 2021, y se invierten descensos de alrededor del 2% por año durante la mayoría de las dos décadas anteriores. La reducción neta de 2015 a 2021 es del 10%, a medio camino del primer hito de la Estrategia Fin de la Tuberculosis. (16)

En 2021, la mayoría de las personas que desarrollan TB se concentran en las regiones del Sudeste Asiático (45%), África (23%) y el Pacífico Occidental (18%), con menores proporciones en el Mediterráneo Oriental (8,1%), las Américas (2,9%) y Europa (2,2%). Los 30 países con alta carga de TB, representan el 87% de todos los casos incidentes estimados en todo el mundo, y ocho de estos países más de dos tercios del total global: India (28%), Indonesia (9,2%), China (7,4%), Filipinas (7,0 %), Pakistán (5,8 %), Nigeria (4,4 %), Bangladesh (3,6%) y la República Democrática del Congo (2,9%). (16)

Existe una estrecha y duradera relación entre las tasas de incidencia de TB y los indicadores de desarrollo, tales como el ingreso medio y la desnutrición. Tanto las barreras económicas como las financieras pueden afectar el acceso a la atención médica para el diagnóstico y la terminación del tratamiento de esta enfermedad. La mitad de los pacientes enfermos y sus hogares enfrentan costos totales catastróficos. Los avances hacia la cobertura sanitaria universal, mejores niveles de protección social y multisectorial, así como la acción sobre los determinantes

---

sociales más amplios de la TB, son factores esenciales para reducir la carga. (16)

Sin embargo, en los últimos años a nivel mundial se encuentran algunos hallazgos positivos. La tasa de éxito de las personas tratadas por TB en 2020 es del 86%, el mismo nivel que en 2019, lo que sugiere que la calidad de la atención se mantiene en el primer año de la pandemia de COVID-19. (16)

### 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 ODS 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. (17)

En el 2020, durante el primer trimestre, se afecta la prestación de 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 COVID 19. Esto afecta a las intervenciones de prevención y control en todos los países. En las Américas se observa, en este año, descenso en la notificación de casos del 16,8% en relación con el 2019, entre los 28 países que notifican. (18)

La OMS estima que en el 2020 se diagnostican 291 000 casos nuevos (CN) y recaídas, que representa 3% de la carga mundial (9,8 millones de casos), con una

---

tasa de incidencia de 28,5 casos por 100 000 habitantes. Los casos de TB notificados (CN y recaídas) en el continente pasan de 239 121 en el 2019 a 197 364 en el 2020, lo cual representa 68% de cobertura de tratamiento. La brecha entre los casos estimados y notificados casi se duplica en el 2020 con respecto al año anterior, pasa de 52 500 a 93 600 casos. (18)

No obstante, se evidencian avances en la introducción y expansión de las pruebas moleculares rápidas en la región. En este sentido, se diagnostican 4007 casos de TB resistente a la RIF o multirresistente (TB-RR/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. En cuanto a la TB extensamente resistente, se diagnostican y notifican 210 casos en 14 países. Se estima que hubo 29 000 CN de TB en PVV (10%), así como 27 000 muertes por TB, de las cuales 29% corresponden 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. (18)

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. (18)

#### 2.2.4. Situación Epidemiológica de la tuberculosis en Cuba

En Cuba, 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 multirresistencia. El reto de PNCETB es lograr una incidencia anual de 1 bacilífero por cada millón de habitantes, equivalente a una prevalencia de infección anual en la población general del 1 %. (19)

A partir del año 1994, la búsqueda de casos se recupera gradualmente con una adecuada detección y estudio de sintomáticos respiratorios de más 21 días. La asociación de la infección por el virus del VIH y la 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 INH en las PVV. Para mejorar algunas de estas deficiencias, el PNCETB actualiza el manejo de casos en función de las nuevas pautas internacionales y se fortalece el trabajo interprogramático en todos los niveles del sistema de salud. (19)

En Cuba se logra disminuir la tasa de incidencia de la TB, pero en los últimos años mantiene un estancamiento en valores cercanos de  $6 \times 10^5$  habitantes. Entre 2004 y 2012 la incidencia de TB en niños 10 menores de 15 años se incrementa desde 0,3 a  $0,9 \times 100$  mil habitantes. (20)

En el año 2016 se registran 689 enfermos para una tasa de 5,7 por 100 habitantes. (21) En 2017 se notifican 653 casos y en 2018 un total de 651, para una tasa de 5,8 por 100 habitantes, en ambos casos, lo que evidencia un detenimiento del incremento de la TB en ese período. (22)

### 2.3. Tuberculosis resistente a fármacos

La TB farmacorresistente es una amenaza para la salud pública y para su control a nivel mundial. Entre 2020 y 2021 se incrementa la carga de TB farmacorresistente, con 450 000 CN de TB con resistencia a RIF (IC 95%: 399 000–501 000). Se estima que el porcentaje de casos con TB-MDR y TB RR es de 3,6% (IC 95%: 2,7–4,4%) entre CN y 18% (IC 95%: 11-26%) entre los pacientes antes tratados (AT); inferior si se compara con el año 2015 con 3,9% (II 95%: 2,8-5,0%) y 20% (II 95%: 9,5-31%). 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 AT con MDR/RR-TB) se encuentran en la Federación Rusa y en varios países en Europa del Este y Asia Central. (16)

En Cuba, la vigilancia de la resistencia a fármacos antituberculosos comienza en 1982, por el LNRI-TBLM-IPK. En sus inicios se utiliza el método de las proporciones (MP). Luego se incorporan otras pruebas moleculares para drogas de primera (GenoType® MTBDR*plus*) y segunda línea (GenoType® MTBDR*s*). (23)

Como resultado de la vigilancia de la TB, en el período del 2010 al 2011, en el 95,6 % de los aislados recuperados de CN y el 72,6 % de los AT, resultan sensibles a

INH y RIF. Se detecta MDR en el 1,03 % para CN, este porcentaje se incrementa a 10,3 %, para aislados de pacientes con tratamiento previo. Se detectan, además, dos aislados con comportamiento XDR. De 2012 al 2014 se reporta que el 95,6% de los CN y el 89,6% de los casos con tratamiento previo son sensibles a la INH y RIF. Se reporta MDR en el 0,8% de los CN y 5,2% de los AT, solo se identifica un aislado con comportamiento XDR. (23)

La prevalencia estimada de TB MDR en el país continua baja en CN (0,74%) y retratados (4,2%) en el 2014. La vigilancia sostenida permite demostrar que la resistencia del *CMTB* a los medicamentos utilizados en el tratamiento de la TB, no constituye hasta la fecha un problema de salud en Cuba. (24)

#### 2.4. Taxonomía y características generales de las micobacterias

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 grupos (25):

- 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* se agrupan como 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. (13)

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. *M. caprae*, es otro patógeno del ganado, *M. microti*, un patógeno para roedores, y se informa que *M. pinnipedii*, un patógeno para las focas, es causa TB zoonótica. (13) La cepa atenuada de *M. bovis*, *M. bovis* BCG (*Bacille Calmette Guérin*), se usa como vacuna en muchos países con alta carga para proteger contra el contagio de TB, aunque su eficacia es cuestionable. (25)

Los avances en el análisis genético, incluida la secuenciación del genoma completo, da una nueva visión sobre la filogenética sobre el *CMTB*. Estos estudios muestran que *M. tuberculosis sensu stricto* y *M. africanum*, comprenden ocho linajes filogenéticos (L1–L8), siendo L1–L4 y L7–L8 *M. tuberculosis sensu stricto*, y L5 y L6 *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. (25) 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. (13)

Se reporta otra clasificación de las micobacterias según su infectividad, y se dividen en tres categorías (25):

- Categoría 1 (patógenos estrictos): a este grupo pertenecen los miembros del *CMTB* y *M. leprae* que tiene el mayor impacto en la salud pública.
- Categoría 2 (patógenos oportunistas): como *M. avium*, que se encuentran en el medio ambiente y pueden causar enfermedades en personas con condiciones predisponentes o inmunidad comprometidas.
- Categoría 2 (saprofitos): como *M. gordonae*, que son ubicuos y se pueden encontrar en fuentes ambientales, pero rara vez o nunca causan infección y se consideran en general no patogénicos.

## 2.5. Morfología y características de las micobacterias

### 2.5.1. Morfología

Las micobacterias son bacilos inmóviles en forma de bastón, que se caracteriza por poseer una pared celular rica en lípidos, sobre todo ácidos micólicos. Estos de

---

cadena larga (C-60 a los ácidos grasos C-90), hacen que todas las especies de micobacterias sean "ácido alcohol resistentes" (BAAR), ya que resisten la decoloración por alcohol ácido después de la tinción con colorantes fenicados como la fucsina, lo que permite su detección con la microscopía. 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 (C-22 a C-64) y pueden teñirse como BAAR. (25)

Las micobacterias son bacilos rectos y delgados, miden de 0,2 - 0,6 x 1-10  $\mu\text{m}$ , en el caso particular de los bacilos tuberculosos son finas estructuras rectas, cilíndricas que miden 0,4 x 3  $\mu\text{m}$ . 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. (26)

#### 2.5.2. Características culturales de las micobacterias

Los medios para el aislamiento primario de micobacterias deben incluir un cultivo de 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). (26)

Las micobacterias tienen una velocidad de crecimiento mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. El *CMTB* tiene un tiempo de generación de 18 horas, por lo que necesita de 3-4 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. Son resistentes a la decoloración con alcohol o ácido, debido a la composición de la pared celular que es rica en lípidos de alto peso molecular. (26)

Las micobacterias poseen una elevada resistencia a los desinfectantes, por la naturaleza hidrófoba de su superficie celular y su proliferación en cúmulos, pero se destruyen por la pasteurización y la esterilización al calor. Son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir durante largos períodos en esputos secos u otros líquidos corporales. Estos hechos son de importancia para la prevención de las infecciones por micobacterias, tanto en el medio hospitalario como en la comunidad. (26)

Las diferentes especies varían en su pigmento, morfología macroscópica y microscópica, sus colonias pueden ser rugosas, color hueso crema, elevadas convexas y de bordes irregulares (*CMTB*); lisas y transparentes, con bacilos sin agrupaciones discernibles (Complejo *M. avium-intracellulare*), o de aspereza intermedia. Se pueden observar de formas cocoides a largos filamentos, de forma ocasional forman ramificaciones, estas se observan en cultivos enriquecidos (*M. kansasii*). La temperatura ideal para su crecimiento es de 32-37°C, y su pH óptimo

es entre 6,5 - 6,8. En dependencia de la producción de pigmento se dividen en: fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmentos), escotocromógenas (forman pigmento con y sin luz) y no cromógenas. (26)

Estos bacilos son difíciles de teñir con la tinción de Gram, aunque se consideran débilmente grampositivos. La coloración recomendada es la tinción de ZN la cual utiliza como colorante principal la fucsina básica fenicada. Estos microorganismos resisten la decoloración con alcohol clorhídrico al 3%, de ahí que se denominan BAAR, por lo que mantienen su color rosado brillante. (26) El método de Kinyoun, descrito desde 1915, es una tinción en frío, pero hay que tener en cuenta que se debe realizar primero un método de concentración del esputo. (27)

### 2.5.3. 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%) que le confieren un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática. Es una barrera efectiva frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales. Está compuesta por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano, por eso, es la estructura más estudiada de estos microorganismos. Esta pared celular es la responsable de muchas de las propiedades características del género: acidorresistencia, crecimiento lento, resistencia a detergentes, y resistencia a los antibacilares. (27)

En la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y

lipoarabinomanano (LAM). El LAM presenta una relación funcional con los liposacáridos O antigénicos presentes en otras bacterias. (27)

La capa de peptidoglucano forma el esqueleto básico al que se unen los arabinogalactanos, unos polisacáridos ramificados formados por D-arabinosa y D-galactosa. El residuo terminal de D-arabinosa se esterifica para dar lugar a ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular a los que se anclan moléculas de glucolípidos de superficie. También se detectan otros lípidos, glucolípidos y peptido- glucolípidos. (27)

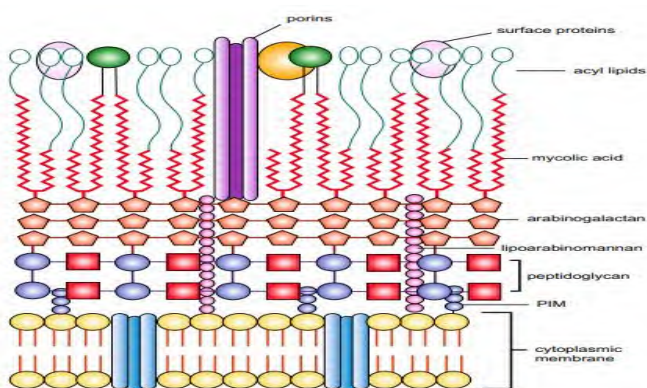


Figura 1. Diagrama esquemático de la pared celular de *Mycobacterium*. Tomado de: Atlas of *Mycobacterium tuberculosis*© 2017 Elsevier Inc.

## 2.6. Tamizaje sistemático de la tuberculosis (TSTB)

### 2.6.1. Fundamento

El objetivo del tamizaje (o búsqueda activa de casos de TB) es detectar la enfermedad de forma temprana, con el objetivo de minimizar los retrasos en el diagnóstico e inicio del tratamiento, lo que resulta en reducción del riesgo de

---

resultados desfavorables (tratamiento, secuelas de salud y consecuencias sociales-económicas adversas de la TB para las personas y sus familias). Además, disminuye la transmisión de la TB en el hogar, el lugar de trabajo, la escuela y otros entornos comunitarios, al aislar a las personas con enfermedad activa y acortar el período de contagiosidad. Por otro lado, se reduce la incidencia de infección por TB y, en consecuencia, la incidencia y prevalencia de TB activa. (28)

El TSTB se utiliza en los grupos en alto riesgo, como un componente central del primer pilar de la Estrategia Fin a la TB, lo cual garantiza el diagnóstico temprano de todas las personas con esta enfermedad. Este tamizaje se puede realizar en la población general en zonas con una prevalencia estimada de 0,5% o más, a grupos de la población que tienen factores de riesgo de contraer la TB (comunidades urbanas desfavorecidas, personas sin hogar, comunidades en zonas remotas o aisladas, poblaciones indígenas, migrantes, refugiados, desplazados internos y otros grupos vulnerables o marginados con acceso limitado a la atención de salud), a las PVV en cada visita a un establecimiento de salud, contactos del hogar y otros contactos estrechos de las personas con TB activa, en las cárceles y los centros penitenciarios, a trabajadores actuales y antiguos expuestos a la sílice, en entornos donde la prevalencia de TB es de 100 por 100 000 habitantes o más en la población general en las personas con un factor de riesgo para TB que buscan atención de salud o que ya la reciben, y en personas con una lesión fibrótica en la radiografía de tórax, que no estén recibiendo tratamiento. (28)

## 2.7. Diagnóstico de la tuberculosis

### 2.7.1. Pruebas para el diagnóstico de la infección de tuberculosis.

La infección de TB es un estado que se caracteriza por una respuesta inmunitaria persistente a estimulación por antígenos del *CMTB* sin evidencia de manifestación clínica de la enfermedad. (29)

La prueba de infección de TB aumenta la probabilidad de que las personas que son el objetivo del tratamiento preventivo de la TB (TPT) se beneficien de dicho tratamiento. Sin embargo, no hay una prueba estándar de oro para diagnosticar la infección. Hay dos clases de pruebas disponibles en el mercado: los ensayos de liberación de interferón-gamma (IGRA) y la prueba cutánea de la tuberculina (TCT). Son métodos indirectos y requieren del desarrollo de una respuesta inmune para identificar a las personas infectadas. Un resultado positivo de la prueba por cualquier método no es, por sí mismo, un indicador fiable del riesgo de progresión a enfermedad activa. (29)

En 2011, la OMS recomienda el uso del IGRA para el diagnóstico de la infección por TB. En ese momento se incluyeron las siguientes tecnologías en la evaluación: TCT, QIAGEN QuantiFERON®-TB Gold (QFT-G), QIAGEN QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) y el ensayo Oxford Immunotec T-SPOT®.TB (T-Spot) assays. (29)

En 2018, se actualizan las recomendaciones que estipulan que la TCT, los IGRA (o ambos) se pueden utilizar para la detección de la infección de TB y en 2021, se

---

amplían para las siguientes tecnologías: TB-IGRA de Beijing Wantai y QIAGEN QuantiFERON-TB Gold Plus. (29)

Existen otras pruebas cutáneas que se basan en antígenos específicos del *CMTB* (PCAgETB) y utilizan como diana la proteína secretora temprana antigénica de seis kDa (ESAT-6) y el cultivo de la proteína filtrada 10 (CFP-10). Estas pruebas combinan la plataforma de prueba cutánea más simple con la especificidad de los IGRA. Ya en 2022, la OMS recomienda su uso para el diagnóstico de la infección por TB. (29)

## 2.7.2. Diagnóstico de laboratorio

### 2.7.2.1. Baciloscopía

Las técnicas de coloración se mantienen sin modificaciones en el tiempo. Se utilizan de rutina por su facilidad, rapidez y alta especificidad; sin embargo, la S es menor que en los métodos de cultivo, esta depende de factores tales como: tipo de muestra, número y concentración de micobacterias, técnica de coloración utilizada, tiempo dedicado a la observación, y actitud y perseverancia del microscopista ante una muestra sospechosa de TB. (30)

Se basan en la propiedad de ácido-alcohol resistencia que tienen las micobacterias de unir en sus paredes colorantes, como la fucsina fenicada o auramina, y ser capaz de retenerlas frente a la acción de decolorantes como la mezcla de ácido y alcohol. Si se utiliza una técnica adecuada, es posible reconocer a los BAAR en la muestra del enfermo como un bastoncito rojo fucsia o fluorescente sobre una



---

coloración de fondo que facilita su visualización. (31)

La BK, en muchos entornos, es la técnica diagnóstica básica para la evaluación de las personas que acuden con signos y síntomas sugestivos de TB. Es una técnica sencilla y fácil de realizar, sin embargo, la S es moderada, con un umbral de detección de 5000-10 000 bacilos por mililitro de esputo para que tengan un 50% de posibilidades de detectarse al microscopio. (32)

Las dos tinciones más utilizadas son la clásica de ZN y la tinción con fluorocromos (auramina O). Esta última permite una lectura más rápida (2-3 min) y se recomienda cuando el número de muestras a examinar es superior a diez láminas diarias; también hay que tener en cuenta que los frotis teñidos por auramina pueden reteñirse por ZN, lo que posibilita la diferenciación de la morfología bacteriana. Esta tinción permite distinguir ciertas características morfológicas, pero no permite diferenciar con certeza las especies de micobacterias o si los bacilos son viables o no. (31)

La MF LED, es una microscopia de fluorescencia con lámpara LED, que se desarrolla en la última década. Tiene la ventaja que es relativamente barata, emiten luz en casi cualquier tipo de longitud de onda, tienen una vida media de alrededor de 20 000-30 000 horas, es más sensible y rápida que la microscopía convencional de ZN. Además, la calidad de la tinción por la microscopía de fluorescente puede ser más fácil de controlar, ya que la calidad del polvo de auramina comercial es menos variable que el de la fuchsina básica, necesita menos mantenimiento y se puede operar incluso con pilas. (6) (7)

2.7.2.2. Pruebas diagnósticas recomendadas por la OMS para el diagnóstico de la TB y TB resistente a drogas.

Según las últimas recomendaciones de la OMS, los programas de TB deben realizar la transición de la microscopia a las PMDR, como prueba diagnóstica inicial. (32) (33)

El manejo eficaz de la TB se basa en el diagnóstico rápido de esta enfermedad, la detección rápida de la resistencia a los medicamentos y el inicio oportuno de un régimen de tratamiento eficaz. Para lograrlo se requiere de acceso rápido a la información, pruebas de detección, así como pruebas rápidas y precisas de susceptibilidad a los fármacos (PSF) para todos los pacientes con TB. (34)

#### 2.7.2.2.1. Cultivo bacteriológico

El cultivo en medios líquidos, es el método de referencia para la confirmación bacteriológica de la TB a partir de muestras clínicas. (25) Sin embargo, no se utiliza como prueba diagnóstica primaria en muchos países con alta carga debido al costo, los requisitos de infraestructura y el período de tiempo requerido para generar resultados. No obstante, la microscopía convencional y el cultivo siguen siendo necesarios para monitorear la respuesta de un paciente al tratamiento. (29)

El cultivo es más sensible que la BK (detecta un mínimo de 10 bacilos viables x mL de muestra), incrementa la confirmación del diagnóstico en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de TB pulmonar. Además, permite identificar al *CMTB* y realizar las PSF antituberculosos, así como detectar

los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. Su rol es vital importancia en escenarios con mediana o baja incidencia de TB, así como en contextos de alta coinfección TB/VIH. (31) (35)

Los medios de cultivo sólidos a base de huevos, tales como Löwenstein Jensen (LJ) y el Ogawa, son los más utilizados para cultivo de micobacterias, con un promedio de 3 a 4 semanas de incubación para recuperar las micobacterias a partir de muestras clínicas. 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, así como en la obtención de los resultados de PSF. (35)

Existen diferentes sistemas automatizados para la detección del crecimiento de micobacterias en medio líquido. Se basan en diferentes tecnologías: métodos de detección radiométrica como Radiometric BACTEC 460 System, métodos colorimétricos que detectan producción bacteriana de CO<sub>2</sub> como el sistema BacT/ALERT 3D y otros usan sensores de presión (ESP Culture System II) o métodos fluorométricos para detectar el consumo de oxígeno (BACTEC MGIT 960 System). Estos métodos proporcionan tiempos similares a la detección y son instrumentos totalmente automatizados. (36)

El método convencional para detectar la resistencia a los medicamentos antituberculosos se basa en pruebas fenotípicas (PF), que utilizan cultivos utilizando medios líquidos o sólidos. Sin embargo, estas requieren mucho tiempo (de semanas a meses para generar resultados), debido a la lenta tasa de

crecimiento de *CMTB*. Esto es a menudo demasiado tarde para la terapia, detener la adquisición o propagación de resistencia adicional, o prevenir la mortalidad. Igual que para el cultivo, requieren una infraestructura de laboratorio sofisticada, personal calificado y estricto control de calidad. Por otro lado, no se dispone de métodos fiables para algunos medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea, como la PZA. (32) (33)

A pesar de las desventajas, la PF (basada en cultivos) es esencial para los fármacos donde no hay pruebas moleculares confiables, pero que existen pruebas precisas y reproducibles por los métodos fenotípicos (por ejemplo, la bedaquilina). También es puede ser necesaria para medicamentos donde hay pruebas moleculares confiables y existe la necesidad de investigar resultados, o para realizar más pruebas en el caso de resultados de pruebas moleculares inesperados (ya sea resistencia o susceptibilidad). (32) (33)

#### 2.7.2.2.2. Diagnóstico rápido para la detección de tuberculosis

La Estrategia Fin de la TB tiene hitos para lograr reducciones significativas en las tasas de mortalidad e incidencia, así como de los costos catastróficos relacionados con la TB para 2025. Dentro del pilar 1, la primera acción está dirigida a la atención y la prevención integradas centradas en el paciente, el diagnóstico precoz de la TB, incluida la PSF y la detección sistemática de contactos y grupos vulnerables. (37) (38)

En el año 2021, una década después de las primeras directrices y recomendaciones de la OMS sobre el uso de pruebas de diagnóstico rápidos (PDR), solo el 38% de los pacientes notificados con TB (CN o recaídas) se testaron con una PDR. El progreso para lograr este objetivo es lento, debido en parte al acceso limitado a estas pruebas; en 2021, en general, solo el 25% de los casos, tuvieron acceso a una de estas pruebas moleculares en los sitios de diagnóstico de TB. (37) (38)

El término PDR se refiere a las pruebas moleculares a menos que se especifique lo contrario y comprende productos de siete fabricantes. Estas se utilizan como diagnóstico inicial de TB. Detectan ADN del *CMTB*, o un biomarcador. Por definición, no incluyen a la BK, aunque esta prueba sigue siendo relevante para el seguimiento del tratamiento. En la actualidad, el único PDR no basado en biomarcadores moleculares es el Alere Determine™ TB LAM Ag. Su uso está limitado a indicaciones específicas entre PVV y no para todos los pacientes con presunción de TB, independiente de su estado del VIH. (37) (38)

La cascada diagnóstica se utiliza en la atención al paciente y se manejan cada vez más por los programas nacionales de control de la TB. Son útiles para identificar brechas y planificar estrategias para cerrarlas. Consta de cuatro pasos: identificación de los casos presuntivos de TB, acceso a las PDR, aumentar las pruebas de resistencia a los medicamentos y PDR, por último, la recepción de un diagnóstico. (37) (38)

---

Las nuevas herramientas para detectar la presencia del *CMTB* y la resistencia a los medicamentos requieren recomendaciones de política basadas en la evidencia. En los 10 últimos años, la OMS aprueba una serie de nuevas tecnologías de diagnóstico. La amplificación y detección de los ácidos nucleicos del *CMTB*, es una tecnología que demuestra ser sensible y específica. (32) (37):

- Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por su sigla en inglés) en tiempo real como: Xpert® MTB/RIF Ultra (basada en cartuchos) y Truenat™ (basada en chips).
- Pruebas con sondas lineales (*LPA*, por su sigla en inglés): como GenoType® MTBDR*plus*, versiones 1 y 2, Genoscholar™ NTM+MDRTB II y GenoType® MTBDR*sl*.
- Amplificación isotérmica mediada por bucles (*LAMP*, por su sigla en inglés): conocida como TB LAMP.
- Detección de antígenos en un formato de flujo lateral (detección basada en biomarcadores) como: Alere Determine™ TB LAM Ag.

La PCR en tiempo real, es la tecnología que más se utiliza en la actualidad. Estas herramientas, además de detectar el ADN del *CMTB*, pueden distinguir mutaciones en el gen vinculado a la resistencia a la RIF. Las técnicas disponibles para informar los resultados, utilizan programas y equipos informáticos, requieren redes de laboratorios establecidos y de personal capacitado. (32) (37)

## Plataforma GeneXpert

Xpert® MTB/RIF es una PCR automatizada que utiliza la plataforma GeneXpert. Puede detectar el *CMTB* y el patrón de la resistencia de la RIF dentro de las dos horas posteriores al inicio de la prueba. El procesamiento de muestras, la amplificación y la detección de la PCR se integran en un solo cartucho. Estas características permiten la tecnología se pueda utilizar en un laboratorio central o laboratorio de referencia. (29) (32) (37)

El 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 mejorar la sensibilidad, el ensayo incorpora dos objetivos de amplificación multicopia (*IS 6110* e *IS 1081*), además incorpora la amplificación de ácido nucleico anidada, ciclos térmicos más rápidos, fluidos y enzimas mejoradas, esto resulta en que tenga un límite de detección de 16-18 unidades formadoras de colonias bacterianas (ufc) por mililitro. Para mejorar la precisión de la detección de 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 *rpoB* mediante la detección de cambios en la temperatura de fusión lejos del rango de referencia de tipo salvaje. (29) (32) (37)

## 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. De ellos el Truenat MTB y MTB Plus se usan como pruebas diagnósticas iniciales para la TB, mientras que MTB-RIF Dx como prueba refleja para detectar la resistencia a la RIF en aquellos con resultados positivos en las pruebas iniciales de Truenat. (29) (32) (37)

Estas pruebas utilizan una micro-PCR en tiempo real para la detección del *CMTB* y la resistencia a la RIF en el ADN extraído a partir de una muestra de esputo. Estas tecnologías se pueden utilizar en laboratorios periféricos y reportan los resultados en menos de una hora. Si el resultado del ensayo Truenat MTB es positivo, se toma otra alícuota y se ejecuta el ensayo MTB-RIF Dx para detectar la presencia de mutaciones seleccionadas asociadas a la resistencia a la RIF. (29) (32) (37)

#### Pruebas con sondas en línea (LPA)

Las LPA utilizan tiras reactivas que pueden detectar al *CMTB* y determinar su perfil de farmacoresistencia. Esta 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). Desde el punto de vista técnico son más complejas de realizar que la prueba Xpert® MTB/RIF y Xpert® MTB/RIF ULTRA; sin embargo, pueden detectar la resistencia a una gama más amplia de fármacos de primera y segunda línea, los resultados se obtienen en 5 horas. (29) (32) (37)



Existen dos grandes grupos, las que detectan el *CMTB* y la resistencia a fármacos contra la TB de primera línea (conocidas como LPA de primera línea), como 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 (conocidas como LPA de segunda línea), como GenoType MTBDR*sl*.

En el período 2020–2021 la OMS informa una nueva clasificación, para las nuevas tecnologías (33):

- Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (*nucleic acid amplification test* [NAAT], por sus siglas en inglés) automatizados de complejidad moderada para la detección de TB y resistencia a la RIF e INH.
- NAAT automatizadas de baja complejidad para la detección de resistencia a INH y agentes antituberculosos de segunda línea.
- NAAT basadas en hibridación inversa de alta complejidad para la detección de resistencia a la PZA.

NAAT automatizadas de complejidad moderada para la detección de TB y resistencia a RIF e INH

Estas tecnologías se desarrollan en plataformas de alto rendimiento. Las pruebas que pertenecen a esta clase son más rápidas y menos complejas de realizar que las PSF fenotípicas y las LPA. Después del paso de preparación de la muestra, estas son en gran medida automatizadas. Tienen el potencial de proveer resultados rápidos y precisos (33)

La plataforma *Abbott Molecular* tiene dos NAAT para TB: una para detección de *MTB* (RealTime MTBt) y otro para la detección de resistencia a la RIF e INH (RealTime BTT RIF/INH). Para la detección de TB se utiliza como blanco el elemento de inserción *IS 6110* y el gen *pab*. Para la detección de resistencia a RIF utiliza ocho sondas marcadas con colorantes para detectar variantes en la región determinante (RRDR) del gen *rpoB* y cuatro sondas para detectar resistencia a la INH, con dos sondas cada una para los genes *katG* e *inhA*. (33)

La plataforma *Becton Dickinson* (BD) se basa en una PCR en tiempo real multiplexada (BD MAX™ MDR-TB). Esta metodología utiliza para la detección del *CMTB* cinco sondas. Como blanco utiliza los elementos genómicos multicopia *IS 6110* e *IS 1081*, 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 *rpoB*; para la detección de resistencia a INH, se dirige tanto a la región promotora de *inhA* como al codón 315 del gen *katG*. (33)

Otra plataforma que se utiliza es la *Bruker-Hain Diagnostics* (por sus siglas en inglés), la cual tiene dos NAAT en tiempo real: el FluoroType® MTB, que detecta *CMTB* y el FluoroType MTBDR, que detecta *CMTB* y resistencia a RIF e INH. Son plataformas independientes de las plataformas GenoType MTBDR. Los genes diana son *rpoB* para la detección de TB y resistencia a la RIF y el promotor *inhA* y el gen *katG* para detectar la resistencia a la INH. Las plataformas utilizadas para la amplificación y detección son FluoroCycler® para el ensayo MTB y FluoroCycler XT

---

para el ensayo MTBDR (33).

La plataforma *Roche Diagnostics* (Roche) dispone de también de dos NAAT: el ensayo *Cobas® MTB* para detectar el *CMTB* y *Cobas® MTB RIF/INH* para detectar la resistencia (RIF e INH). El ensayo *Cobas® MTB* detecta tanto el ARN ribosómico 16S (ARNr) como los genes *esx* como genes diana para la detección del *CMTB*. Para la detección de la resistencia a los medicamentos se utiliza la región RRDR (para la RIF) y región promotora *inhA* y el gen *katG* para la INH. (33)

2.7.2.2.3. Pruebas diagnósticas iniciales para el diagnóstico de TB sin detección de farmacorresistencia

Amplificación isotérmica mediada por bucles

Este ensayo *Loopamp™ Mycobacterium tuberculosis kit* (*Eiken Chemical Company, Tokio, Japón*), se basa reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles, conocido como TB-LAMP. Es manual y requiere alrededor de una hora para realizarlo. La lectura es a simple vista, bajo la luz ultravioleta. Requiere poca infraestructura y es fácil de usar. Se utiliza como una prueba rápida de diagnóstico, la cual es una alternativa a la microscopía de frotis en entornos de recursos limitados. Tiene como ventaja que no requiere instrumentos sofisticados y tiene requisitos de bioseguridad similares a los de la microscopía. (33)

Ensayo de flujo lateral para la detección de LAM en orina

Esta prueba se basa en la detección del antígeno LAM, que es un lipopolisacárido presente en las paredes celulares de las micobacterias, que se liberado

---

metabólicamente activo o por degeneración de células bacterianas durante la enfermedad. 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 CD<sub>4</sub> bajos. (33)

La tira disponible en estos momentos de forma comercial es el Alere Determine TB LAM Ag (EE. UU.), también denominado Alere LAM, que se utiliza para detección TB en pacientes con enfermedad avanzada e inmunosupresión inducida por el VIH y facilitar el inicio temprano del tratamiento antituberculoso. (33)

NAAT 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 monorresistencia a este fármaco es rara; sin embargo, la resistencia a la PZA se asocia con frecuencia con TB MDR y TB RR. Se estima que entre el 30-60% de TB MDR y TB-RR, también es resistente a la pirazinamida. Por tanto, en aquellas personas diagnosticadas con TB-RR es importante detectar también la resistencia a la pirazinamida para que los médicos puedan tomar una decisión sobre si incluir o excluir este medicamento en el régimen de tratamiento. (33)

La NAAT, basada en hibridación de alta complejidad, se usa para el diagnóstico de resistencia a la pirazinamida a partir de aislados de pacientes. Una de estas tecnologías se desarrolla por Nipro (Osaka, Japón), y se denomina Genoscholar™ PZA-TB. Es un LPA con tecnología basada en hibridación inversa. Este ensayo está comercialmente disponible para la detección de resistencia a la pirazinamida. Comparado con el Genotype MTBDR<sub>plus</sub> y MTBDR<sub>sl</sub>, no incluye sonda mutante específica. En cambio, tiene como objetivo un fragmento de 700 pares bases de (pb) que cubre todo el gen *pncA* y la región promotora hasta el nucleótido-18 del tipo salvaje de la cepa de referencia H37Rv. (33)

#### 2.7.2.2.4. Otras técnicas de identificación

##### Identificación basada en inmunocromatografía

Existen en el mercado tres ensayos inmunocromatográficos rápidos de flujo lateral que permiten diferenciar los aislados del *CMTB* de las MNT: el BD's MGIT TBc ID, el Taun's Capilia TB (Japón) y el SD Bioline TB Ag MPT<sub>64</sub> Rapid Test (Corea). El BD y el SD Bioline detectan el antígeno MPT<sub>64</sub>, mientras que el Capilia detecta el antígeno MPB<sub>64</sub>; ambas son proteínas secretoras específicas del *CMTB*. (38)

##### Análisis del perfil lipídico

El análisis de la composición lipídica por varios procedimientos cromatográficos se reconoce como una herramienta útil para diferenciar las especies de micobacterias. Se sabe del valor del estudio de los ácidos micólicos por cromatografía en capa delgada como primer paso en la identificación de micobacterias: cromatografía en

---

capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta presión. Esta última en fase reversa de los ésteres de ácidos micólicos, demuestra ser un método rápido, reproducible y específico para la identificación de especies micobacterianas, con una E y S elevada para el *CMTB*. (39)

### 2.7.3. Algoritmos de diagnóstico de tuberculosis recomendados por la OMS.

Contar con algoritmos efectivos y eficientes, son componentes claves para el diagnóstico de TB. La cascada asegura que los pacientes sean diagnosticados con precisión y rapidez, además de comenzar de forma inmediata con el tratamiento adecuado, lo cual conlleva a reducir la morbimortalidad, mejorar los resultados de los pacientes, reducir la transmisión y evitar el desarrollo de resistencia a los medicamentos. (32) (33)

Siempre que se produce una mejora de la capacidad de laboratorio de una determinada región o se implementan nuevas pruebas de diagnóstico, es necesario modificar e implementar modificaciones a los algoritmos, siempre después de una evaluación, revisión y aprobación formal por parte de los funcionarios del Ministerio de Salud en conjunto con el Programa Nacional de Control. (32) (33)

Para el diseño o revisión de los algoritmos hay que tener en cuenta: las características de la población a la que se atiende (grupos de riesgo); las pruebas diagnósticas específicas en uso o las que se consideran a usar; la capacidad actual y prevista de los laboratorios del país, infraestructura de los laboratorios y la disponibilidad de personal competente para realizar las pruebas. También hay que considerar la idoneidad de los sistemas de recogida y transporte de muestras, así

como la media del tiempo de respuesta entre sitios; la capacidad de los servicios clínicos para ofrecer el diagnóstico y tratamiento; así como los medicamentos utilizados para el tratamiento de la TB (32) (33)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las investigaciones se realizaron en el LNR-TBLM-IPK. Para dar salida al objetivo 1 de la tesis se realizó un estudio de verificación diagnóstica parcial del Xpert® MTB/RIF y de la microscopía de fluorescencia LED, en el contexto de un país de baja prevalencia de TB, para conocer su factibilidad en las condiciones del laboratorio.

#### 3.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF y de la microscopía de fluorescencia LED

##### 3.1.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF.

Diseño: se realizó un estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal. La población de estudio fueron todas las muestras de esputo de pacientes con sospecha de TB que se recibieron en el LNR-TBLM-IPK en el período de junio a diciembre del 2014.

Criterios de inclusión: todos los esputos con la calidad adecuada para el diagnóstico de TB (mucosos o mucopurulentos), con indicación del Xpert® MTB/RIF (según las normativas del PNCETB), con volumen mayor o igual a tres mililitros (mL) de muestra, bien identificados y que se realizó el cultivo bacteriológico.

Criterios de exclusión: los especímenes derramados y cultivos contaminados.

La muestra final del estudio se conformó por 61 muestras. Cada espécimen se dividió en dos alícuotas, un mL se destinó para realizar la prueba molecular (Xpert®



---

MTB/RIF) y los dos mL restantes para la BK por tinción de ZN y el cultivo bacteriológico.

#### 3.1.1.1. Procedimientos

##### 3.1.1.1.1. Procedimientos para realizar el ensayo molecular Xpert® MTB/RIF

A un mL de esputo se adicionaron dos mL del reactivo de muestra (SR) del Xpert® MTB/RIF. A continuación, se agitó por vórtex por unos segundos y se dejó actuar por 10 minutos, luego se mezcló por vórtex de nuevo y se esperó cinco minutos más. El esputo tratado se transfirió con pipeta plástica estéril desechable (hasta la marca visible) al cartucho Xpert® MTB/RIF, se cargó al equipo y se esperó la salida de los resultados de la prueba.

Los resultados se clasificaron como sigue:

- *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.

Las muestras, además, se procesaron para BK, cultivo e identificación en especie, según lo que establece el PNCETB (19) y los procedimientos técnicos normados de

---

operación (PNO) del laboratorio.

#### 3.1.1.1.2. Procedimiento para realizar la baciloscopía de ZN

Marcado de los portaobjetos: Se marcó el número del registro de la muestra en el extremo de un portaobjetos nuevo, utilizando marcador permanente o un lápiz con punta de diamante; se aseguró que el número de cada extendido correspondiera con el número colocado en el recipiente con la muestra.

Preparación del extendido: Se utilizó la partícula más purulenta usando asa desechable de 5 mm de diámetro. Se realizó la extensión en 2/3 de la lámina sin tocar los bordes.

Secado y fijación del extendido: se dejó secar al aire, luego 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 y se aplicó calor hasta la emisión de vapores dejándose actuar por cinco minutos y se enjuagó con agua. Seguido se decoloró con alcohol ácido al 3% por dos minutos. Luego se enjuagó con agua para luego aplicar el azul de metileno al 0,1% por 45 segundos a un minuto, se enjuagó con agua y se dejó secar al aire para la posterior lectura de las láminas.

#### 3.1.1.1.3. Procedimientos para realizar la lectura de las láminas.

Se realizó con un microscopio AxioStar plus. La codificación de la lámina se realizó según el número de BAAR vistos en cuatro líneas (dos horizontales y dos verticales), según establece el PNCETB, como sigue. (19)

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

3.1.1.1.4. Procedimientos para el procesamiento de las muestras, inoculación en los medios de cultivo e identificación en especie.

#### Procesamiento de las muestras

A las muestras procedentes de sitios no estériles se realizó el proceso de descontaminación/digestión por el método de Petroff modificado con hidróxido de Sodio al 4%. (19)

Descontaminación por el método de Petroff modificado con solución salina: para 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 agitó con vórtex. Luego se centrifugó a 3000 gravedades (g) durante 15 minutos (min.) y se decantó el sobrenadante. Se agregó 15 mL de solución salina fisiológica y se centrifugó por segunda ocasión a 3000 g durante 15 min. Se decantó el sobrenadante. Pasado este paso se resuspendió el sedimento en dos mL de solución salina fisiológica.

A las muestras, una vez que se realizó el proceso de descontaminación, se inocularon de forma simultánea en el medio de cultivo sólido LJ y en el medio líquido (Sistema automatizado Bact ALERT 3D).

Inoculación en los medios de cultivo.

La elaboración de medio de cultivo LJ, se describe en el anexo 1.

Inoculación en el medio de cultivo sólido LJ: una vez que se descontaminaron las muestras se inoculó 0,2 mL en dos tubos de LJ y 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 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 en la tabla.

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

Inoculación en el medio de cultivo líquido (Sistema automatizado Bact ALERT 3D)

Primero se descontaminó la parte superior de la botella MP con alcohol al 70%. Se adicionó con jeringa estéril 0,5 mL del antibiótico liofilizado reconstituido antes en 10 mL del fluido de reconstitución, según las instrucciones del fabricante. (40) (41)

Después se inoculó, con jeringuilla estéril 0,5 mL de la muestra tratada y descontaminada, de forma simultánea con el cultivo sólido. Se volvió a descontaminar la parte superior de la botella MP con alcohol al 70% y se cargó al equipo Bact/ ALERT 3D.

De las botellas presuntas positivas detectadas por el equipo, se extrajo, con jeringuilla estéril, un mL de la botella y se transfirió a un tubo con tapa de rosca de 15 mL y se centrifugó a 3000 g por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y del sedimento se realizó una tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.

A los cultivos positivos a BAAR, tanto por el medio sólido como líquido, se procedió a la identificación en especie utilizando la tira SD BIOLINE, ensayo inmunocromatográfico para la detección de la Ag MPT64 (presente solo en el *CMTB*).

En los casos donde la tinción fue negativa por el medio líquido, se transfirió 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. Si se confirmó la presencia de BAAR se procedió a realizar la tira SD BIOLINE, para diferenciar el *CMTB* de las MNT.

Procedimiento del ensayo inmunocromatográfico (Tira SD BIOLINE)

En los aislados donde se confirmó la presencia de BAAR, se tomaron de 3 a 4 colonias con asa estéril y se resuspendieron en 200 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) del tampón (suministrado por el fabricante). Se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana en

la ventana para inocular la muestra. En el caso del cultivo líquido, se utilizaron 100 mL de la botella MP. La lectura e interpretación de los resultados se realizó a los 15 minutos, como aparece a continuación:

- Resultado negativo: La presencia de una sola banda color fucsia (banda control). Identificación de micobacteria no tuberculosa.
- Resultado positivo: La presencia de las dos bandas color fucsia (banda control y la banda en la sección derecha de la ventana). Identificación del *CMTB*.
- Resultado invalidado: cuando no aparece ninguna banda o sólo la de la muestra y no la del control. En ese caso se repitió la prueba.

Los aislados donde se identificó el *CMTB* se transfirieron para la vigilancia de la resistencia a fármacos antituberculosos a la sección encargada de dicho diagnóstico.

### 3.2. Comprobación del valor diagnóstico de la MF LED.

Diseño: se realizó un estudio verificación diagnóstica, secundaria y parcial en las condiciones del laboratorio, para conocer su factibilidad y poder extenderlo al resto de la red del país. Cuba es un país de baja de prevalencia de TB, por lo que se siguió la metodología de Minion y colb. (42)

Población estudio: todas las muestras de esputo de pacientes con sospecha de TB, que se recibieron en el LNR-TBLM-IPK en el período de febrero a julio 2018.

Criterios de inclusión: los esputos con la calidad adecuada para el diagnóstico de TB (mucosos o mucopurulentos), con volumen mayor o igual a dos mL de muestra,

muestras identificadas de forma adecuada y a las que se realizó el cultivo bacteriológico.

Criterios de exclusión: los especímenes derramados y cultivos contaminados.

Para la inclusión de los frotis se esperó el resultado del cultivo, para disminuir el sesgo. Se incluyeron todas las muestras que tuvieron cultivo positivo al *CMTB* (49 esputos) y la misma cantidad donde el cultivo fue negativo, por lo que la muestra final fue de 98 especímenes.

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

El procesamiento de las muestras para realizar la microscopía (de ZN y fluorescente) y lectura de las láminas (en cruces), para ambos tipos de tinciones, se realizó de acuerdo a las normas internacionales. (31)

Procedimiento para realizar el extendido de las muestras

El marcado de los portaobjetos se realizó igual a como se describe en el acápite 3.1.1.1.2.

Preparación del extendido: Se utilizó la partícula más purulenta para el extendido usando asa desechable de cinco milímetros de diámetro. Se realizaron dos extendidos en forma de óvalo de dos centímetros (cm) de largo por un cm de ancho. Después de que los extendidos estuvieron secos y fijados, 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. A continuación

---

se procedió a incluir los frotis de las muestras a estudiar para luego realizar la coloración de ZN y fluorescente.

Tinción de ZN: Se realizó de la misma manera al descrito en 3.1.1.1.2.

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 2.

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 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.

Lectura de las láminas

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

Para la lectura de los frotis con tinción de ZN se utilizó el microscopio modelo Axiostar plus, para la MF LED se utilizó el un microscopio PrimoStar plus con el adaptador ParaLens con el lente de 40x (*QBC Diagnostics*, EE. UU.), ambos de Carl Zeiss, Alemania. Para la microscopía de fluorescencia convencional (como técnica de referencia para microscopia fluorescente) se utilizó el microscopio de



fluorescencia Olympus BX41.

La codificación de la lámina en el caso de la tinción de ZN se realizó de la forma siguiente:

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

Para la tinción con Auramina O se codificó de esta manera

Informe	Lectura 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, inoculación e identificación en especie, se realizó igual a como se describe el acápite 3.1.1.1.4.

### 3.3. Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares

#### 3.3.1. Primer estudio de evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares.

Diseño: se realizó un estudio observacional, descriptivo, prospectivo de corte transversal. La población de estudio estuvo conformado por todas las muestras pulmonares de pacientes con sospecha clínica de TB con indicación de Xpert® MTB/RIF, recibidas en el LNRI-TBLM-IPK, durante el período de mayo a octubre del 2016.

Según las normativas elaboradas por el PNCETB (19), se da prioridad para realizar el ensayo molecular a los grupos vulnerables (GV) con mayor riesgo de enfermar de TB y desarrollar resistencia a las drogas, tales como: contacto de casos de TB pulmonar BK positivo, 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, así como personas de unidades con internamiento prolongado (hogares de ancianos e impedidos físicos).

Criterios de inclusión y exclusión: se aplicaron los mismos descritos en el acápite

3.1.1. La muestra final quedó constituida por 82 especímenes.

Las muestras fueron divididas en dos alícuotas: un mL se procesó mediante el Xpert® MTB/RIF; y al resto se utilizó para realizar la BK (con tinción de ZN) y el procesamiento para el cultivo sólido y líquido, según lo establecido en el PNCETB.(19)

El procesamiento de las muestras para el cartucho Xpert® MTB/RIF, carga al equipo GeneXpert e interpretación de los resultados generados por el equipo, procesamiento de las muestras pulmonares no estériles, cultivo, identificación en especie, tinción de ZN, se realizó igual a como se describió en el acápite 3.1.1.1.

Los líquidos pleurales se inocularon en los medios de cultivo.

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

### 3.3.2. Segundo estudio de evaluación en muestras pulmonares y extrapulmonares.

Diseño: se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo, de corte transversal. Se revisaron las bases de datos del Xpert® MTB/RIF del LNRI-TBLM-IPK, correspondientes al período de julio 2014 a septiembre 2017.

Se incluyeron los resultados de todas las muestras pulmonares y extrapulmonares a las que se les realizó la prueba molecular Xpert® MTB/RIF y además tuvieran resultados de la BK de ZN y del cultivo bacteriológico (medio sólido o líquido). Por lo que la muestra final fue de 847 especímenes.

3.3.3. Evaluación del rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras de esputo para el diagnóstico de la tuberculosis.

Diseño: se realizó un estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal. La población de estudio estuvo constituido por todas las muestras de esputo de pacientes con síntomas respiratorios con sospecha de TB pulmonar (n = 549), que se recibieron en el LNRI-TBLM del IPK, en el período comprendido de febrero a julio del 2018.

Criterios de inclusión y exclusión en el estudio: se utilizaron los mismos descritos en el acápite 3.2.1. La muestra final quedó conformada por 208 especímenes. Al igual que la validación diagnóstica parcial se siguió la metodología utilizada por Minion y colb. (42)

Los procedimientos para realizar la tinción de ZN y fluorescente, así como lectura y codificación de las láminas se realizó como se describe en el acápite 3.2.1. Para el procesamiento de las muestras de esputo, inoculación en los medios de cultivo e identificación en especie se realizó como se describe en el acápite 3.1.1.1.4.

#### 3.4. Procesamiento de los datos y análisis de los resultados

Se confeccionó una base de datos en el programa Microsoft EXCEL con los datos e información necesaria para la investigación. Se confeccionaron las tablas utilizando el mismo programa estadístico.

##### 3.4.1. Xpert® MTB/RIF

Para la verificación y la evaluación de la prueba molecular se incluyeron las muestras con resultados de Xpert® MTB/RIF válidos (CMTB detectado/ Resistencia

a RIF no detectada, *CMTB* detectado/ Resistencia a RIF detectada y *CMTB* no detectado), que a su vez tenían resultados de la BK y el cultivo bacteriológico (prueba de referencia para la detección del *CMTB*). En relación a la detección de resistencia a RIF, se solicitaron los resultados del patrón de susceptibilidad/resistencia a la RIF por el método de las proporciones (prueba de referencia para la detección de resistencia a RIF), a la sección de resistencia del LNRI-TBLM.

#### 3.4.1.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF

Para el análisis de los resultados en relación a la detección del *CMTB* y detección de resistencia a RIF, se utilizó el programa estadístico para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDAT (por sus siglas en inglés), versión 3.1, en función del cálculo de los indicadores de desempeño (ID), con un intervalo de confianza del 95%. Para el cálculo de los ID (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, índice de validez y de youden) se excluyeron los cultivos contaminados y los resultados del Xpert® MTB/RIF error al correr la prueba, invalidados o sin resultados.

Se calcularon los porcentajes de detección para cada prueba diagnóstica y se compararon los resultados, utilizando el mismo programa para determinar la significación estadística.

#### 3.4.1.2. Evaluación de la precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares

Para la evaluación, se incluyeron todos los casos nominales con sintomatología

respiratoria sugestiva de TB. Se compararon los resultados del Xpert® MTB/RIF con la BK, el cultivo sólido y líquido. El análisis de los resultados, para ambos estudios se realizó de la misma manera que el descrito en la sección 3.4.1.1.

#### 3.4.2. Microscopía de fluorescencia LED

Tanto para la verificación, como para la evaluación del rendimiento diagnóstico, de la técnica, se esperó el resultado del cultivo bacteriológico para seleccionar los frotis.

##### 3.4.2.1. Comprobación del valor diagnóstico de la microscopía de fluorescencia LED

Para este análisis se utilizó el programa estadístico EpiDAT, versión 3.1, en función de calcular los ID de la MF LED y la coloración de ZN (sensibilidad, especificidad, I valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de validez y el índice de Youden), para este análisis se excluyeron los cultivos contaminados. Se utilizó el cultivo bacteriológico como prueba de referencia. También se calcularon los porcentajes de detección por cada herramienta diagnóstica y se compararon los porcentajes, utilizando el mismo programa para determinar la significación estadística.

En cuanto a la estimación de la concordancia entre las BK se utilizó el índice de kappa ( $k$ ), según lo que sugiere Landis y Koch (43), como se muestra en la tabla siguiente.

<b>Índice de Kappa</b>	<b>Nivel de concordancia</b>
<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

3.4.2.2. Evaluación del rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras de esputo para el diagnóstico de la tuberculosis.

Se incluyeron todos los casos nominales con sintomatología respiratoria sugestiva de TB. Para este estudio se estratificaron los resultados de la MF LED y tinción de ZN por grados de codificación. El análisis estadístico y la estimación de la concordancia entre las BK se realizaron de la misma forma que la descrita en el acápite 3.4.2.1.

También se realizó el análisis de las curvas de ROC (Receiver Operating Characteristic, en inglés), donde se calculó el área bajo la curva (ABC) de la MF LED y la coloración de ZN, utilizando el mismo programa estadístico y se compararon los resultados obtenidos.

3.5. Aspectos éticos.

a) El presente trabajo se ajustó a los principios establecidos en 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.

b) Se cuenta con el aval de la Comisión Científica Especializada de Microbiología (anexo 3) y aval de la comisión de ética del IPK, CEI-IPK 16-20. (anexo 4)

c) El trabajo se llevó a cabo en gabinetes de seguridad clase II, según la clasificación del Centro Nacional de Seguridad Biológica de Cuba para el trabajo con micobacterias. De esta manera, se impidió la liberación de microorganismos patógenos al exterior, por lo que dicho trabajo no representó riesgos para la comunidad donde se encuentra enclavado el laboratorio.

d) El estudio se realizó en el LNRI-TBLM, perteneciente al IPK, que dispone de la infraestructura necesaria, el personal calificado y los principales recursos materiales necesarios, que permitió realizar esta investigación.

e) La experiencia y calificación del personal de laboratorio que participó en el estudio permitió tener confiabilidad y credibilidad de los resultados obtenidos.

f) El personal del laboratorio que procesó y analizó las muestras tuvo pleno conocimiento de las normas de bioseguridad en el manejo de las muestras y aislados.

g) Solo el personal médico y del laboratorio involucrados tuvieron el derecho a tener acceso a los resultados derivados de este estudio. Los nombres de los pacientes involucrados se mantuvieron en total confidencialidad. Esto se garantizó asignándole un código o contraseña, al que solo tuvo acceso el equipo de la



---

investigación.

h) Los resultados se enviaron mediante escaneo o foto de la indicación con el resultado mediante correo electrónico o redes sociales whatsapp (con código) para mantener la confidencialidad de los pacientes.

## IV. RESULTADOS

El Xpert® MTB/RIF y la MF LED han sido objeto de evaluaciones en múltiples estudios a nivel internacional con resultados satisfactorios. Sin embargo, la gran mayoría se realizaron en entornos de alta carga de TB y TB resistente. Cuba es un país de baja prevalencia de esta enfermedad, por lo que se hizo necesario realizar la verificación diagnóstica de ambas tecnologías en el contexto del país y en las condiciones del laboratorio.

4.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF y la microscopía de fluorescencia LED.

### 4.1.1. Comprobación del valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF

Se estudiaron 61 muestras de esputo. Todas se procesaron para realizar el Xpert® MTB/RIF, el examen directo por ZN y el cultivo bacteriológico (medio sólido y líquido).

Por el Xpert® MTB/RIF se detectó el *CMTB* en 18/61 (29,5%) esputos, cuatro más que por el cultivo en medio sólido (14; 22,9%) en LJ y tres más que por el líquido (15; 24,6%). El Xpert® MTB/RIF, como prueba inicial, detectó 11 casos más que la tinción de ZN (7; 11,5%). Tabla 1

Tabla 1. Porcientos de detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* según las herramientas de diagnóstico utilizadas, junio a diciembre 2014. LNRI-TB-IPK.

Pruebas Diagnósticas (N=61)	% Detección del <i>Complejo</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	No	%
Xpert® MTB/RIF	18	29,5
Cultivo Löwenstein Jensen	14	22,9
Cultivo líquido Bact ALERT 3D	15	24,6
Baciloscopía Ziehl Neelsen	7	11,5

Se compararon los porcentos de detección del Xpert® MTB/RIF en relación con los métodos de cultivo utilizados. En relación al cultivo bacteriológico (prueba de oro) las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Para el medio LJ el valor de  $p$  fue de 0,5369 con un IC de -0,106-0,238 y para el cultivo líquido de 0,6836 (IC: -0,125- 0,223). Sin embargo, al comparar con la tinción de ZN como prueba inicial, estas diferencias si tuvieron significación estadística ( $p = 0,0249$ ; IC: 0,024-0,336).

De las 18 muestras positivas al *CMTB* por el Xpert® MTB/RIF, en 15/18 (83,3%) se confirmó el agente etiológico por el cultivo. Los tres donde no hubo confirmación bacteriológica correspondieron a pacientes en seguimiento del tratamiento. No se detectó TB por la prueba molecular en 42 muestras, de las cuáles en una se identificó el *CMTB* por el cultivo, que correspondió a un caso en tratamiento. En

una muestra el resultado fue error al correr la prueba.

En la tabla número dos se muestra la comparación de los indicadores de desempeño de la BK de ZN y la prueba molecular (en relación al cultivo sólido y líquido) como prueba inicial para diagnóstico de la TB. La S del Xpert® MTB/RIF fue muy superior (92,86 utilizando el cultivo LJ y 100% el cultivo líquido), en comparación con la BK de ZN, que alcanzó un valor de 46,67%. Del mismo modo sucedió para el índice de youden (IY) que fue de 0,83 utilizando el medio sólido y 0,95 con el medio líquido, mayor que el que se obtuvo por la tinción de ZN (0,47).

Tabla 2. Comparación de los Indicadores de desempeño del Xpert® MTB/RIF y de la Tinción de Ziehl Neelsen, junio a diciembre 2014. LNRI-TB-IPK.

Indicadores de desempeño (%)	Xpert® MTB/RIF en relación a		Tinción de Ziehl Neelsen
	Cultivo Löwenstein Jensen	Cultivo líquido Bact ALERT 3D	
Sensibilidad	92,86	100,0	46,67
Especificidad	90,0	95,12	100,00
Índice de validez	90,74	96,43	86,21
Valor predictivo positivo	76,47	88,24	100,00
Valor predictivo negativo	97,3	100,00	84,31
Índice de Youden	0,83	0,95	0,47

#### 4.1.2. Comprobación del valor diagnóstico de la microscopía de fluorescencia LED

Para la verificación de la MF LED se realizó la comparación de los resultados de tres técnicas de microscopía. Para la tinción fluorescente se utilizó la MF LED y la MFC (como referencia para el diagnóstico microscópico con tinción con fluorocromos) y la tinción de ZN. Coincidió que por ambas técnicas fluorescentes se identificaron 38 (37,8%) láminas positivas a BAAR, de ellas 18 paucibacilares (10 más que por la tinción de ZN), confirmando la mayor sensibilidad de las microscopías que utilizan la tinción con auramina O. Por la microscopía utilizando tinción de ZN, fueron positivas 24 (24,5%) láminas; sin embargo, al comparar este resultado con los de las MF LED y MFC, las diferencias no fueron significativas ( $p=0,1590$ ). (Tabla 3)

Tabla 3. Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED con la microscopía de fluorescencia convencional y la tinción de Ziehl Neelsen, febrero a julio, 2018. LNRI-TB-IPK.

Tipos de microscopías	Láminas Negativas	Láminas positivas					Total
		Paucibacilar	+	++	+++		
Fluorescencia LED	60	18	4	2	14	38 (37,8%)	
Fluorescencia Convencional	60	18	4	2	14	38 (37,8%)	
Tinción de Ziehl Neelsen	74	8	3	2	11	24 (24,5%)	

Leyenda: Paucibacilares: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces

Se analizaron también los resultados de la comparación entre las técnicas microscópicas en dependencia de los grados de codificación de las láminas. Con la MF LED se detectaron 14 láminas positivas a BAAR que resultaron negativas con la tinción de ZN (12 paucibacilares, uno positivo +, y otro fuertemente positivo, +++), por lo que se incrementó la tasa de positividad a 13,3%, además se observaron más frotis con escasos BAAR (18/98) que la tinción de ZN (8/98), que confirma la mayor sensibilidad de esta técnica.

Al realizar el mismo análisis entre la MF LED y la MFC, se identificaron tres láminas que fueron codificadas como paucibacilares por la MF LED que resultaron negativas por la MFC, y tres que fueron negativas por la MF LED, se codificó como paucibacilar por la MFC.

La concordancia entre la MF LED y la tinción de ZN se consideró buena ( $k=0,6773$ ), y muy buena al comparar las dos técnicas fluorescentes ( $k=0,8711$ ).

En la tabla cuatro se muestra la comparación de los ID de las técnicas microscópicas utilizadas. La S de la MF LED fue de 77,55%, con un IY de 0,78, muy similar a la que se obtuvo con la MFC, técnica microscópica de referencia que se utilizó en esta investigación (75,51 y 0,73, en ese orden). La S para la microscopía por tinción de ZN fue de 48,98%, inferior al que se obtuvo por la MF LED. El IY calculado para la MF LED (0,78) fue muy superior comparado con la tinción de ZN (0,49), muy por debajo de 0,75 que es el límite inferior para considerar una prueba diagnóstica adecuada.

Tabla 4. Comparación de los resultados de los indicadores de desempeño de las tinciones fluorescentes y la tinción de Ziehl Neelsen, febrero a julio 2018. LNRI-TB-IPK.

Indicadores de desempeño (%)	Tipos de microscopías		
	Fluorescencia LED	Fluorescencia Convencional	Tinción de Ziehl Neelsen
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

4.2. Evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares.

Se realizaron dos estudios, el primero solo en muestras pulmonares y otra investigación en muestras pulmonares y extrapulmonares.

4.2.1. Primer estudio de evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares de personas pertenecientes a grupos vulnerables de mayor probabilidad de desarrollar TB.

Esta investigación incluyó 82 muestras. El mayor número de muestras estudiadas correspondieron a esputos con 78 (95,2%), seguidas de lavados bronquiales y

líquidos pleurales (2 muestras en cada caso: 2,4%).

La tabla cinco muestra los resultados del Xpert® MTB/RIF de acuerdo a los grupos GV estudiados y resultados de la BK. Las PVV fue el GV mas estudiado con 51 (62,2%), es importante señalar que dentro de este grupo se estudiaron 5 personas que también cumplieron la condición ser exreclusos o reclusos, pero fue prioritaria la condición de ser VIH para la clasificación, según se establece en las normativas por el PNCETB (19). Del total de PVV, en nueve (17,6%) se detectó el *CMTB*, cuatro de ellos BK por ZN negativa.

Dentro del grupo con tratamiento previo se estudiaron ocho casos (9,8%), todos con resultados positivos al *CMTB* por la prueba molecular, dos de ellos con BK negativa. Se investigaron también ocho muestras (9,8%) de extranjeros procedentes de países de alta carga de TB, con sólo un positivo al *CMTB* con BK negativa. (Tabla 5)

De las cuatro muestras de niños mayores de 12 años estudiados solo detectó TB en un caso con BK positiva. A su vez se estudiaron cinco (6,1%) muestras de personas con otras enfermedades crónicas, como la EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), siendo positivos dos casos, uno negativo a la BK. Otras seis muestras pertenecientes a personas con alta sospecha clínica de TB (hogar de ancianos, fumadores y trabajador de la salud) fueron negativas por el Xpert. (Tabla 5)



Tabla 5. Resultados de Xpert® MTB/RIF según los grupos vulnerables estudiados y resultados de la BK, mayo a octubre 2016. LNRI-TB-IPK.

GRUPOS VULNERABLES	No.	%	Casos positivos Xpert® MTB/RIF		
			Total	BK (+)	BK (-)
Personas viviendo con VIH	51	62,2	9	5	4
Tratamiento Previo	8	9,8	8	6	2
Extranjeros procedentes países de alta carga	8	9,8	1	0	1
Niños (Mayor 12 Años)	4	4,9	1	1	0
Otras enfermedades crónicas (EPOC)	5	6,1	2	1	1
Hogar de ancianos	3	3,7	0	0	0
Fumadores	2	2,4	0	0	0
Trabajador Sector de Salud	1	1,2	0	0	0
Total	82	100,0	21	13	8

Leyenda: BK: baciloscopía/ EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

El ensayo Xpert® MTB/RIF detectó ADN del *CMTB* en 21 de los casos estudiados, en 20 (24,4%) de ellos no se detectó resistencia a RIF y en solo uno se detectó resistencia a este antibiótico, perteneciente al grupo de PVV. La prueba resultó negativa en 57 (69,5%) individuos y en cuatro (4,9%) se observó errores al correr la prueba o el resultado fue no válido. Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de Xpert® MTB/RIF por categorías, mayo a octubre 2016. LNRI-TB-IPK.

Categorías	No.	%
No Detección <i>CMTB</i>	57	69,5
Detección <i>CMTB</i> / No Resistencia a RIF detectada	20	24,4
Detección <i>CMTB</i> / Resistencia a RIF detectada	1	1,2
Detección <i>CMTB</i> / Resistencia Indeterminada a RIF	0	0
Error al correr la prueba o resultado inválido	4	4,9
Total	82	100

Legenda: *CMTB*: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*/ RIF: Rifampicina

También se compararon los resultados del Xpert® MTB/RIF con el cultivo bacteriológico (medio sólido LJ y líquido). Para este análisis no se tuvieron en cuenta los cultivos contaminados, así como los resultados invalidados o con error al correr la prueba por el ensayo molecular. De los 21 casos positivos al *CMTB* por el ensayo molecular, se confirmaron 15 (71,4%) por el cultivo (de los 6 no confirmados dos fueron seguimiento de tratamiento y cuatro cultivos contaminados). No obstante, no existieron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico ( $p=0,2528$ ) entre el ensayo de Xpert® MTB/RIF y los métodos de cultivo empleados. Es importante destacar que la prueba molecular permitió detectar seis casos de TB más que el cultivo bacteriológico (todos de diagnóstico, cuatro que fueron cultivos negativos y dos contaminados).

Como prueba inicial, el Xpert® MTB/RIF permitió detectar la TB en ocho casos negativos por la BK. Hubo un caso con BK positiva con resultados de TB no detectada por el ensayo molecular, que resultó una micobacteria no tuberculosa por el cultivo.

Los ID del Xpert® MTB/RIF, para los pacientes con BK negativa, evidenció valores de S, E, concordancia (C), valor predictivo positivo (VPP+), valor predictivo negativo (VPN-) de 100%, 92,86%, 93,22%, 42,86% y 100%, en ese orden, con un IY muy cercano a uno (0,93), superior a 0,75 (límite mínimo para considerar una prueba diagnóstica aceptable). Para los casos BK (+), todos los ID de la prueba fueron del 100% con un IY perfecto (Tabla 7).

Tabla 7. Indicadores de desempeño del Xpert® MTB/RIF de acuerdo a los resultados de la BK, mayo a octubre 2016. LNRI-TB-IPK.

Indicadores de desempeño	Pacientes con Baciloscopía Negativa	Pacientes con Baciloscopía Positiva
Sensibilidad (%)	100	100
Especificidad (%)	92,86	100
Concordancia (%)	93,22	100
Valor Predictivo Positivo (%)	42,86	100
Valor Predictivo Negativo (%)	100	100
Índice Youden	0,93	1

Los resultados de la prueba de susceptibilidad a la RIF, por el método de las proporciones, se solicitaron a la sección de resistencia del LNRI-TB. Esta prueba solo se realizó a los aislados del *CMTB* con un número de colonias  $\geq 10$  (15 aislados). Se obtuvo que 14 aislados fueron sensibles a la RIF y sólo en uno se detectó resistencia. No se calcularon los indicadores de desempeño del ensayo debido al escaso número de aislados, lo cual fue una limitante de este estudio.

4.2.2. Segundo estudio de evaluación de la precisión del Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares.

Se incluyeron 847 muestras, de ellas 784 (92,6%) pulmonares y 63 (7,4%) extrapulmonares.

Para las muestras pulmonares la mayor positividad para todas las técnicas de diagnóstico utilizadas se obtuvo con muestras de esputo: por BK 78/754 (10,3%), por cultivo positivo al *CMTB* 118/754 (15,6%) y 153/754 (20,3%) por la prueba molecular. Es importante señalar que para los lavados bronquiales la BK fue positiva en un solo caso de los 20 estudiados (5%); sin embargo, por el cultivo y Xpert® MTB/RIF se diagnosticaron cuatro pacientes (20%), incrementándose el diagnóstico en 15 %. Tabla 8.

Los porcentos de positividad general entre los casos diagnosticados con TB, para muestras pulmonares, por BK fueron de 81 (10,3%) y por Xpert® MTB/RIF de 159 (20,3%), estas diferencias fueron significativas ( $p=0,0000$ ). También hubo significación estadística ( $p=0,0214$ ) al comparar con el cultivo que fue de 123

(15,7%) casos. Tabla 8.

Se analizaron los resultados de los métodos de diagnósticos utilizados en los casos con sospecha de TB extrapulmonar (63 pacientes). De forma general, se constató que la BK fue positiva en un solo caso, correspondiente a una muestra de líquido pleural (LP), por cultivo tres pacientes (una biopsia de tejido y dos líquidos pleurales) y siete por Xpert® MTB/RIF (cuatro biopsias, dos líquidos pleurales y una secreción), para 1,6%; 4,8% y 11%, en ese orden, observándose un aumento del aporte al diagnóstico de la TB del ensayo molecular.

Es válido resaltar que en las muestras extrapulmonares donde no se recomienda realizar la BK, el Xpert detectó el *CMTB* en 4/21 casos estudiados por biopsias de tejidos, para 19% contra un solo paciente identificado (4,8%) por cultivo. Por otro lado, de los 4 pacientes, donde se investigó como muestra las secreciones, solo se pudo detectar la enfermedad en un caso, y fue por la prueba molecular. Tabla 8.

No se compararon los porcentajes de positividad en las muestras extrapulmonares en relación a la BK, debido a que esta técnica no se realiza en todas las extrapulmonares. En este estudio sólo se aplicó a los líquidos corporales (pleurales, ascíticos y pericárdicos) y solo fue positivo en un LP. Sin embargo, por el Xpert® MTB/RIF se pudo identificar al *CMTB* en dos casos, y se pudo comenzar el tratamiento de forma oportuna. En cuanto al cultivo, en 3/63 (4,8%) muestras extrapulmonares estudiadas se identificó la enfermedad, contra 7/63 (11%) por la prueba molecular, estas diferencias no fueron significativas ( $p=0,3228$ ). Tabla 8.

De forma general, la BK fue positiva en 82/847 (9,7%) pacientes, 126/847 (14,9%) y el Xpert® MTB/RIF en 166/847 (19,6%). Tabla 8. Hubo significación estadística al comparar los porcentajes de detección del Xpert® MTB/RIF con la a BK ( $p=0,0000$ ) y el cultivo ( $p= 0,0121$ ). El aporte de la prueba molecular al diagnóstico de casos de TB, fue superior a la BK en 10% y en 5% con relación al cultivo.

Tabla 8. Resultados de la positividad de la baciloscopía, cultivo y Xpert® MTB/RIF por tipo de muestra, julio 2014 a septiembre 2017. LNRI-TB-IPK.

Tipos de muestras	Pacientes positivos por						
	Baciloscopía		Cultivo		Xpert® MTB RIF		
Pulmonar	Esputos (754)	78	10,3%	118	15,6%	153	20,3%
	Lavados Bronquiales (20)	1	5%	4	20%	4	20%
	Aspirados Bronquiales (6)	2	33,3%	1	16,6%	2	33,3%
	Cepillados Bronquiales (1)	0	0%	0	0%	0	0%
	Contenido s Gástricos (3)	0	0%	0	0%	0	0%
	Subtotal (784)	81	10,3%	123	15,7%	159	20,3%
Extrapulmonar	Biopsias de Tejidos (21)	NA	NA	1	4,8%	4	19%
	LCR (20)	0	0%	0	0%	0	0%
	Líquidos Pleurales (14)	1	7,1%	2	14,3%	2	14,3%
	Secreciones (4)	NA	NA	0	0%	1	25%
	Líquidos Ascíticos (3)	0	0%	0	0%	0	0%
	Líquidos Pericárdicos (1)	0	0%	0	0%	0	0%
	Subtotal (63)	1	1,6%	3	4,8%	7	11%
Total (847)	82	9,7%	126	14,9%	166	19,6%	

También se confrontaron los resultados de los métodos de diagnóstico utilizados, de acuerdo a la presencia o no del VIH, de los pacientes a los cuales se les analizaron muestras en esta investigación. Se apreció que en PVV la BK solo diagnosticó BAAR en 28 (5,5%) pacientes y por el cultivo se confirmó la TB en 56 (10,9%); sin embargo, por el Xpert® MTB/RIF en 76 (14,8%) muestras se identificó el *CMTB*, por lo que se incrementó el diagnóstico con la prueba molecular en casi 10 % el diagnóstico con relación a la BK y en 5 % con el cultivo. En las muestras de los pacientes VIH negativos se detectaron por el Xpert® MTB/RIF 90 (30,3%) casos de TB, aportando al diagnóstico el 12% en relación a la BK y 7% al cultivo. En los pacientes donde se desconocía el status VIH no se detectó la enfermedad (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de la positividad de la baciloscopía, cultivo y Xpert® MTB/RIF de acuerdo a la presencia o no de VIH, julio 2014 a septiembre 2017. LNRI-TB-IPK.

Clasificación	Pacientes positivos por					
	Baciloscopía		Cultivo		Xpert® MTB RIF	
Personas viviendo con VIH (512)	28	5,5%	56	10,9%	76	14,8%
Personas sin VIH (297)	54	18,2%	70	23,6%	90	30,3%
Personas con <i>status</i> VIH desconocido (38)	0	0%	0	0%	0	0%

En la tabla 10 se muestra la comparación de los resultados del Xpert® MTB/RIF de las muestras estudiadas con la positividad de la BK y cultivo. La prueba molecular fue negativa en 680 muestras, de las cuales en cinco la BK dio positiva a BAAR; sin embargo, el resultado del cultivo también fue negativo. De los casos que el Xpert detectó TB y no resistencia a RIF (150), la BK fue positiva en 70 y se confirmaron por cultivo 112. Para los 12 diagnosticados con TB RR, la BK de diagnóstico solo aportó siete casos y el cultivo 11. Solo en cuatro pacientes se detectó el *CMTB* y no se pudo determinar el patrón de resistencia a la RIF (indeterminada), de los cuales en tres se confirmó la TB por cultivo y no se identificó ninguno por BK.

Tabla 10. Comparación de los resultados del Xpert® MTB/RIF en relación con la BK y cultivo, julio 2014 a septiembre 2017. LNRI-TB-IPK.

Resultados del Xpert® MTB/RIF	Muestras	Positivos	
		BK	Cultivo
<i>CMTB</i> no detectado	680	5	0
<i>CMTB</i> detectado/ resistencia a RIF no detectada	150	70	112
<i>CMTB</i> detectado/ resistencia a RIF detectada	12	7	11
<i>CMTB</i> detectado/ resistencia a RIF indeterminada	4	0	3
Error/ resultados invalidados/ sin resultados	1	0	0
Total	847	82	126

Leyenda: *CMTB*: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*/ BK: baciloscopia/ RIF: Rifampicina



También se realizó el análisis de la S y E del ensayo molecular de acuerdo al tipo de muestra estudiada (pulmonar o extrapulmonar) y la presencia o no del VIH (512 muestras de PVV, 297 personas sin VIH). La S fue de 100% para las muestras pulmonares de personas con y sin VIH, y para las extrapulmonares pertenecientes a los casos VIH negativa. En cambio, para las muestras extrapulmonares de las PVV la sensibilidad no se pudo calcular, ya que solo se identificaron tres casos que fueron positivos por Xpert, pero negativos al cultivo y no se identificaron resultados falsos negativos ni verdaderos positivos. La E de la prueba para las muestras pulmonares y extrapulmonares de los PVV fue de 96,9% y 90,6%, en ese orden, y para los VIH negativos de 92,8% y 96,30%, en ese orden. En las muestras de los casos con VIH desconocido (38 muestras) no se detectó el *CMTB*.

La Habana, es la capital de Cuba e históricamente es la provincia de mayor incidencia de TB en el país, por lo que se hizo una estimación del aporte de la prueba molecular al diagnóstico de la TB en esta provincia, en cuanto a la positividad de la BK y el cultivo. De forma general, el Xpert® MTB/RIF incrementó el diagnóstico de TB en esta provincia en 66 casos más que la BK y 34 más en relación al cultivo. Tabla 11.

Tabla 11. Estimación del aporte al diagnóstico de TB del Xpert® MTB/RIF en La Habana con relación a la BK y cultivo, julio 2014 a septiembre 2017. LNRI-TB-IPK.

Años	Casos positivos de La Habana por técnica				
	Baciloscopía Positivos BAAR	Cultivo Positivos CMTB	Xpert Positivos CMTB	Incremento del Diagnóstico con Xpert® MTB/RIF	
				En relación a BK	En relación a Cultivo
2014	9	16	19	(+10)	(+3)
2015	13	28	32	(+19)	(+4)
2016	21	25	31	(+10)	(+6)
2017	28	34	55	(+27)	(+21)
Total	71	103	137	(+66)	(+34)

Leyenda: BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes/ CMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

4.3. Evaluación del rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras de esputo para el diagnóstico de la tuberculosis.

En este estudio se incluyeron 208 muestras de esputo. En la tabla 13 se muestran los resultados de la comparación de las dos técnicas de microscopía que se utilizaron en esta investigación. Por la MF LED se identificaron 28 (13,5%) frotis positivos a BAAR, diez más que los identificados por la coloración de ZN (18 para un 8,6 %), además se pudo identificar con la técnica fluorescente un mayor número de frotis paucibacilares (diez), seis más, comparado con los detectados por la microscopía convencional de ZN (cuatro). Tabla 12.

Tabla 12. Comparación de los resultados de la microscopia de fluorescencia LED y la microscopia con la Tinción de Zielh Neelsen, febrero a julio 2018. LNRI-TB-IPK.

Tipo de Microscopías	Frotis Negativos	Frotis positivos a BAAR				Total positivos	Total
		Paucibacilares	+	++	+++		
Tinción de Ziehl Neelsen	190 (91,4%)	4	3	2	9	18 (8,6%)	208
MF LED	180 (86,5%)	10	4	2	12	28 (13,5%)	208

Legenda: BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes/ MF LED: microscopia de fluorescencia LED/ Paucibacilares: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces

Por la MF LED, dentro de los casos positivos a BAAR, en la categoría de paucibacilares, de los diez frotis detectados por la coloración fluorescente, seis (cuatro pertenecientes a PVV) no se identificaron por la coloración de ZN.

La concordancia estimada entre los dos tipos de microscopía utilizada en el estudio (según el índice de kappa) fue de 0,7570. Basado en la clasificación de Landis y Koch, que considera seis categorías: muy buena, buena, moderada, aceptable, baja y sin acuerdo, esta se consideró buena porque estuvo entre los valores de 0,61-0,80.

La proporción de verdaderos positivos a BAAR por MF LED fue de 13,043 % y por la coloración de ZN de 8,696 %, pero al comparar estas proporciones no existieron diferencias significativas ( $p=0,2065$ ) entre la proporción de láminas positivas

observadas con la MF LED y las observadas con la tinción de ZN.

En la tabla 13 se muestran los resultados de ID de las dos técnicas de microscopía. La S de la MF LED fue 81,82 %, superior a la calculada para la coloración de ZN (54,55%). Los valores de los parámetros de la E, el VPP+, VPN y el índice de validez de la MF LED y la microscopía con la coloración de ZN, tuvieron valores similares. Sin embargo, al calcular el IY para la MF LED el valor que se obtuvo fue cercano a uno (0,81), por encima del obtenido con la coloración de ZN (0,55).

Tabla 13. Comparación de los Indicadores de desempeño de la microscopía de fluorescencia LED y la microscopía con la coloración de Ziehl Neelsen, febrero a julio 2018. LNRI-TB-IPK.

Indicadores de desempeño	MF LED	Microscopía con tinción de ZN
Sensibilidad (%)	81,82	54,55
Especificidad (%)	99,43	100
Valor Predictivo Positivo (%)	96,43	100
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

Al analizar la curva de ROC, el área bajo la curva (ABC) para ambas técnicas de microscopía estuvo entre 0,5 y 1. El valor de ABC fue de 0,8966, con un intervalo de confianza (IC) de 0,8250-0,9681 para la MF LED, mayor que el de la coloración de ZN (0,7903 con IC: 0,7020-0,8786). Pero esta diferencia no resultó significativa ( $p = 0,0669$ ).

De los 28 pacientes identificados como positivos a BAAR por la MF LED, 27 fueron confirmados por cultivo, de ellos 24 del *CMTB* y tres MNT, para una tasa de positividad del 13,5%. Uno fue negativo al cultivo y se trató de un paciente en seguimiento de tratamiento. Por la tinción de ZN de los 18 casos positivos, todos crecieron en el medio de cultivo, 17 pertenecieron al *CMTB* y uno resultó una MNT, para una positividad del 8,6%. Sin embargo, al comparar el % de positividad de las 2 técnicas, las diferencias no fueron significativas al obtenerse un valor de  $p > 0,05$ , como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Comparación de los resultados de la MF LED y la microscopía con tinción de Ziehl Neelsen, de acuerdo a la tasa de positividad, febrero a julio 2018. LNRI-TB-IPK.

Microscopía	% Positividad	Aislados	Valor de p
Fluorescencia LED (28)	13,5%	24 <i>CMTB</i> 3 MNT	0,1593
Tinción de Ziehl Neelsen (18)	8,6%	17 <i>CMTB</i> 1 MNT	

Leyenda: *CMTB*: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*; MNT: micobacteria no tuberculosa

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Comprobación del valor diagnóstico y evaluación de la prueba molecular Xpert® MTB/RIF para el diagnóstico de la tuberculosis

Una de las prioridades de los Programas Nacionales de Control de la TB a nivel mundial es la detección oportuna de los casos de TB y TB MDR. El diagnóstico rápido y preciso de esta enfermedad es un paso importante para disminución de la transmisión de la enfermedad, comenzar el tratamiento adecuado, implementar medidas y lograr un control epidemiológico efectivo, elemento primordial para lograr la mayor curación de los pacientes, disminuir mortalidad, prevenir la resistencia a los medicamentos, así como evitar el fracaso y las recaídas. (8) (44) (45)

Para poder alcanzar la eliminación de la TB, es indispensable intensificar y unir los esfuerzos, adaptar estrategias y establecer prioridades de acuerdo a la epidemiología y los sistemas de salud locales (42).

La Organización Panamericana de la Salud asume el compromiso de apoyar a los países de la región para acelerar la implementación de la Estrategia Fin de la TB y convertirse en el primer territorio en alcanzar la eliminación de esta temible enfermedad como problema de salud pública. Para eliminar la TB hay que pasar de una baja incidencia ( $\leq 10$  casos por cada 100 000 habitantes) a la pre-eliminación. Cuba está entre los 14 países de la región de Las Américas que tienen la oportunidad de avanzar hacia la eliminación de esta temible enfermedad. (18) Para ello es prioritario la introducción de técnicas rápidas para aumentar la detección de casos, con prioridad para los GV, que tienen de 30-50 veces más probabilidad de

enfermar de TB que la población general. (36) (46)

Para lograr este propósito es necesario introducir herramientas que permitan el diagnóstico rápido de la TB, y en consecuencia lograr un control de la transmisión, la administración oportuna del tratamiento y de esta manera disminuir la morbilidad-mortalidad por esta enfermedad.

El Xpert® MTB/RIF es una prueba molecular que detecta la presencia del *CMTB* y resistencia a la RIF, directamente de muestras de pacientes con sospecha de TB, en un tiempo aproximado de 2 h. Es una PCR en tiempo real, que permite un diagnóstico rápido y además 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 y semicuantitativo, que utiliza cartuchos desechables de un solo uso e independientes. Con ello, se reduce al mínimo el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras y permite realizar el procesamiento de las muestras con bajos requerimientos de bioseguridad e infraestructura. (47) (48) (49) Sin embargo, para su implementación se debe verificar y evaluar en las condiciones de cada país.

En esta investigación se demuestra el valor diagnóstico del Xpert® MTB/RIF para la identificación del *CMTB* en muestras de esputo. El porcentaje de detección del Xpert® MTB/RIF (29,5%), en este estudio, fue mayor en comparación con la tinción de ZN (11,5%), con un incremento en más de un 18%. Estos resultados son superiores a lo que informa Ortiz Jiménez y colaboradores (cols.) en 2019, es un

estudio de validación del GeneXpert en Ecuador (en esputos mucopurulentos) que obtuvo un 20,4% de positividad para el Xpert y 6,9% para ZN. En cuanto a la S y E del método molecular, los resultados de esta investigación son 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, al comparar los resultados relacionados con el examen directo con tinción de ZN, la S que se obtuvo en este estudio (46,67%) fue menor al comparar a la que obtiene el autor en su investigación (88,1%). (47) Estas diferencias pudieran estar dadas al número y calidad de muestras investigadas, también pueden influir otros aspectos como 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, además, se requiere un adecuado manejo de la técnica de coloración. (48)

La calidad de las muestras, es un aspecto importante a tener en cuenta para obtener un resultado óptimo por cualesquiera de las herramientas diagnósticas utilizadas en la TB, por lo que la adecuada instrucción al paciente para la obtención de esputo, es importante para lograr una muestra de calidad y así optimizar el rendimiento diagnóstico, dado que las muestras de mala calidad pueden proporcionar resultados falsos negativos. (48)

En la presente investigación no se pudo calcular los ID en relación a la detección de resistencia a RIF, debido al poco número de aislados a los cuáles se pudo realizar la prueba de susceptibilidad en la sección de resistencia, lo que fue una limitación del estudio. Las principales causas que influyeron fueron: el número



---

escasos de colonias en el medio LJ (menos de 10) y aislados que se contaminaron o no crecieron después de preparar el inóculo necesario para montar la prueba. Sin embargo, de las cepas donde se realizó las pruebas de susceptibilidad, de forma general hubo buena correlación con los resultados del Xpert® MTB/RIF.

Estudios de validación del Xpert® MTB/RIF, en relación a la detección de resistencia, demuestran la buena correlación entre la prueba molecular y los métodos fenotípicos, como Ortiz Jiménez y cols. (47) en 2019 (S: 91,4% y E: 95,5%). Otros estudios conducidos por Weyer y cols (50) en el 2013 y Boheme y cols. (51) en 2011, informan una S elevada (94,1% y 96,8%, en ese orden).

Para la evaluación de la precisión diagnóstica del ensayo molecular Xpert® MTB/RIF en muestras pulmonares y extrapulmonares se realizaron 2 estudios.

El primero, sólo en muestras pulmonares en los principales grupos de riesgo de mayor probabilidad de enfermar por TB. Del total de pacientes, el GV más estudiado fueron las PVV (62,2%), lo que concuerda con otros autores como Khanal y colbs. (52) que en un estudio en Nepal detecta que el 77% de los casos investigados pertenecen a este tipo de pacientes, y a lo que informa Scott y cols (53) en Sudáfrica, que de 311 personas el 70% corresponden a PVV. Esto pudiera estar en correspondencia a que estos países son de alta carga de TB y VIH, lo que sugiere que el mayor número de muestras pudo pertenecer a este grupo de riesgo. Además, en el momento que se llevó a cabo la investigación el diagnóstico molecular de TB en Cuba solo estaba disponible en el LNRI-TB-IPK, por lo que el

---

mayor número de pacientes, dentro de los GV estudiados, fueron procedentes del Centro Hospitalario del IPK, centro de referencia nacional de atención al paciente VIH, que está en la misma institución, y de alguna manera estaban beneficiados por la cercanía al centro de diagnóstico.

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, sin embargo, en PVV, el riesgo varía de 5-15% en un año a 50% durante toda su vida (54).

La coinfección de TB - VIH es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, amenazando los programas de control de ambas enfermedades. (55) (56) Cerca de la mitad de las personas estimadas con coinfección TB/VIH, no se diagnostican o se reportan. La temprana identificación de los signos y síntomas de la TB, seguida del inicio rápido del tratamiento en PVV, reduce la mortalidad por esta enfermedad infecciosa, mejora la calidad vida y reduce la transmisión de la enfermedad en la comunidad. (55)

La TB muchas veces es difícil de detectar en las PVV, lo que trae como consecuencia un retraso en el diagnóstico. La TB y el VIH poseen un sinergismo mortal. La infección viral conduce a la declinación de los linfocitos T CD<sub>4</sub> que son de crucial importancia en iniciar y mantener la respuesta inmune, por lo que promueve la progresión de una infección por TB reciente o latente. 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 (SIDA). Al incrementar el número de casos con coinfección TB/VIH, aumenta el riesgo de transmisión y la mortalidad por TB en la comunidad e incrementa la demanda al sistema de salud, favoreciendo el desarrollo de las formas extrapulmonares y de los pacientes con manifestaciones respiratorias BK negativa. (56) (57)

En muchos países (de baja, mediana y alta carga de TB), la BK continúa como la prueba primaria en personas con signos y síntomas de la TB. Sin embargo, la BK tiene una baja sensibilidad, en particular en PVV, los cuales tienen dificultad para producir esputos o los producen con escasos bacilos (paucibacilares). Además, esta técnica no distingue entre las especies, ni cepas sensibles de las resistentes. La OMS recomienda la transición para el reemplazo de la BK, como prueba inicial, con pruebas moleculares rápidas, como el Xpert® MTB/RIF. (57) (58)

De las PVV en 9/21 se identificó el *CMTB* por el Xpert® MTB/RIF (17,6%), resultados inferiores a los de Pinyopornpanish y cols (59) en Tailandia, donde 29/109 pacientes estudiados la positividad fue de del 26,3% y a los que notifica Mavnyengwa y cols (60) en Namibia, que 341/ 594 muestras investigadas, pertenecieron a PVV, de ellos el 57,4% presento coinfección VIH/TB. Estos resultados pudieran estar relacionados a que Namibia y Tailandia son países de alta carga de TB y este último se encuentra entre las 14 regiones de más elevada tasa de incidencia de TB y coinfección TB / VIH. (1)

---

En este estudio sólo se detectó un caso con resistencia a la RIF que correspondió a una PVV. El VIH y la TB farmacorresistente pueden estar vinculadas, la infección por el VIH o su tratamiento, producen una menor absorción de los fármacos antituberculosos o una resistencia adquirida a dichos medicamentos. Además, tanto PVV como los portadores de TB farmacorresistente, pueden tener factores de riesgo similares. También los pacientes infectados por el virus son más susceptibles a la infección por TB una vez expuestos. (58)

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

Sobre este grupo en particular existen escasos reportes. En cualquier país las personas privadas de libertad viven con frecuencia hacinadas en instalaciones con insuficiente ventilación e higiene. Estas condiciones son propicias para el desarrollo de enfermedades infecciosas crónicas, incluyendo la TB y el VIH. (61) En este particular se deben llevar intervenciones para disminuir el hacinamiento, aumentar la pesquisa activa en los sintomáticos respiratorios y utilizar métodos rápidos de diagnóstico para evitar la transmisión y comenzar el tratamiento de forma rápida y oportuna.

Tecnologías, como el sistema Xpert® MTB/RIF, es una oportunidad para diagnosticar de forma rápida la TB. De forma adicional, el método molecular puede

reducir potencialmente los costos asociados con visitas a clínicas, medicamentos, radiografías de tórax, así como del tratamiento de las infecciones asociadas, con la reducción subsecuente de la morbilidad y la mortalidad, por lo que sería muy apropiado su uso en países de ingresos bajos y medios. Es importante señalar que los métodos convencionales no deben ser reemplazados totalmente pues provee el perfil de resistencia no solo a RIF, sino también a otras drogas antituberculosas. (62) (63)

En esta investigación de los 21 casos de TB identificados por el Xpert® MTB/RIF Ultra, en 15 (71,4%) se confirmó por el cultivo bacteriológico. Resultados inferiores a lo que informa Agrawal y cols (49) en el 2016, que 11/21 (52,4%) muestras pulmonares se confirman por el cultivo y lo que notifica Boehme y cols (51) en un estudio multicéntrico que abarca varios países con alta prevalencia de de la enfermedad en el 2011, que informa 933/1033 (90,3%) de los casos positivos por el ensayo molecular.

Otro estudio conducido por Loannidis y cols (64) en Atenas, Grecia en el 2010, país de baja tasa de incidencia de TB (1), como Cuba, de 80 muestras pulmonares estudiadas 31 fueron positivas al *CMTB* por el GeneXpert, y se confirmaron por cultivo 29 (93,5%).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) recomienda el uso combinado de los medios sólidos y líquidos como prueba de oro para el aislamiento primario de micobacterias. (36) (46) En el presente

---

estudio no existieron diferencias significativas entre los métodos de cultivos utilizados, lo que avala el uso combinado para asegurar la recuperación del total de aislados del complejo *M. tuberculosis*.

Con los resultados de este trabajo, en cuanto al porcentaje de detección, se demuestra que el Xpert® MTB/RIF, es una herramienta superior para la detección del *CMTB* en comparación con la BK como prueba inicial, similar a lo que informan varios autores, en diferentes estudios donde se evalúa esta técnica, tanto en muestras pulmonares como extrapulmonares. La prueba molecular tiene el valor agregado de la detección simultánea de los resultados de susceptibilidad a la RIF, lo cual es una ventaja ya que se oferta los resultados en el mismo día, esto permite disminuir los tiempos de respuesta y en consecuencia mejorar la atención y manejo de los pacientes. (65)

En el primer estudio de evaluación, la S del Xpert® MTB/RIF, en los pacientes BK negativos, fue del 100%. Estos resultados son superiores a los que obtienen algunos autores en 2011, que informan un rango de 72 - 77% de S. (66) (67) Para los casos BK positivos la S también fue del 100%, similar a los que obtuvo Zeka y cols. (68), en una investigación en Turquía que se realiza en 253 muestras pulmonares. Boehme y cols (51), en un estudio multicéntrico en el 2011 declara valores de S que oscilan entre 96-100%, cifra que varió según los países participantes (Sudáfrica, India, Perú, Azerbaijan, Uganda, y Filipinas).

La detección rápida de la TB y la TB resistencia a RIF, es esencial para el manejo

de la enfermedad debido al alto riesgo de transmisión de persona a persona, sobre todo en países de alta carga de TB y TB resistente. El estándar de oro para el diagnóstico definitivo de la TB es el cultivo bacteriológico, pero tiene el inconveniente que es muy lento y demora de 2 a 3 semanas para obtener un resultado. Para que sea positivo en medio sólido LJ se requieren de 10-100 bacilos/ml de muestra. El rendimiento del medio de cultivo líquido es 10% más que los medios sólidos, agregado a ello que es un proceso laborioso. Por su parte la BK, es rápida, sencilla y barata, pero su S es moderada; solo permite detectar BAAR y no diferencia al *CMTB* de las MNT. (68) (69)

A pesar de la buena S y E para detectar resistencia a RIF descrita en varios estudios de evaluación de esta tecnología, 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*. (48) Cuando la prevalencia de la resistencia a la RIF es menor al dos por ciento en una población, una prueba positiva por el Xpert® MTB/RIF, 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, sobre todo, 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. (48)

En la segunda investigación, se realizó un estudio retrospectivo en muestras pulmonares y extrapulmonares en pacientes cubanos. La TB pulmonar es de gran importancia por su frecuencia y constituye la principal fuente de contagio. Aunque la forma extrapulmonar es menos frecuente, puede alcanzar 15% del total de casos, siendo mayor en países de alta incidencia y en población infectada con VIH, en la que puede llegar hasta 40%. (70) (71)

En este estudio, el Xpert® MTB/RIF, como sucedió en la investigación anterior, se incrementó la detección de casos en relación a los resultados de la BK, tanto para las muestras pulmonares como extrapulmonares, en 10 y 9,4%, en ese orden. En relación al cultivo, que es el método de referencia, la detección de casos con TB se incrementó en aproximadamente 5% para los especímenes de origen respiratorio; sin embargo, el aporte fue ligeramente mayor para las no respiratorias (6,2%).

Los resultados de este trabajo, en relación al porcentaje de detección para muestras pulmonares (20,3%) y extrapulmonares (11%), difiere de lo que notifican algunos autores como Priyanka Y y cols (65) en 2024 en un estudio similar en la India, que informa un porcentaje de positividad para muestras procedentes o no del árbol respiratorio de 47,7% y 49,1% en ese orden. Estas 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 encontrar casos se incrementa. Otro estudio que se realiza en Gurugram, por Sharma M y cols (72), encuentra que el 15,5% donde se detecta el CMTB en



muestras de esputo se realiza con el ensayo molecular.

El Xpert® MTB/RIF es una de las técnicas moleculares recomendada por la OMS para el diagnóstico de la TB como prueba inicial debido a que detecta de forma simultánea el *CMTB* y la resistencia a RIF, en menos de dos horas, en diferentes muestras basándose en su S, E, así como simplicidad y rapidez de la técnica. (73)  
(74)

En un meta-análisis que realiza Gong X y cols sobre la eficacia del Xpert® MTB/RIF para diagnosticar la TB, informa una S, para la TB pulmonar en muestras de esputo del 95%, y del 94% en el caso de los contenidos gástricos, con una elevada E. Para las muestras extrapulmonares demuestra también ser eficiente, y varía de acuerdo al tipo de muestra, por lo que efectividad en gran medida depende del tipo de espécimen que se analiza, por lo que una selección apropiada es esencial para obtener un buen resultado. (75)

En PVV el ensayo molecular detectó 14,8% de los casos diagnosticados, y se incrementó la detección del *CMTB* en 10% comparado con la BK. Diversos estudios demuestran que la TB incrementa la multiplicación del VIH y acelera la supresión inmunológica (76). En estadíos avanzados del VIH, la BK es generalmente negativa lo que conduce a una demora en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, incluso la muerte de los pacientes. Por otro lado, el examen microscópico es menos sensible para el diagnóstico de TB, sobre todo en los pacientes con inmunosupresión grave. La baja sensibilidad del examen directo

o BK, la presentación atípica de la TB en estos pacientes, hacen necesaria la búsqueda de exámenes más sensibles de TB, como es el ensayo Xpert® MTB/RIF (67).

A pesar de las ventajas de esta herramienta, solo detecta la resistencia a RIF y no provee el perfil de resistencia a otras drogas antituberculosas, por lo que el cultivo no puede ser reemplazado totalmente. (77) El Xpert® MTB/RIF permite detectar ADN del *CMTB*, pero tiene la limitante que no diferencia bacilos vivos de muertos. (78) En los casos con tratamiento previo y un resultado positivo de la prueba molecular, puede suceder que la micobacteria estuviera no viable. Además, si la concentración bacilar es baja o muy baja, puede quedar por debajo del límite de detección del cultivo, en cualquiera de las dos situaciones la micobacteria no crece en el medio, y en consecuencia el resultado es negativo. (36)

El Xpert® MTB/RIF excepcionalmente se indica en pacientes AT, o durante el curso del tratamiento, cuando no hay mejoría clínica o radiológica y el médico de asistencia tiene sospecha de resistencia a los medicamentos. Por lo que es importante identificar si la muestra es de diagnóstico o es un caso en seguimiento del tratamiento para poder interpretar adecuadamente el resultado.

La S y E del Xpert® MTB/RIF para la detección de TB en muestras pulmonares en este estudio fue de 100% y 96,9%, en ese orden. Estos resultados son superiores a lo que notifica Atehortúa y cols. (79) en 2015, en un estudio realizado en Medellín, Colombia, donde obtuvieron una S de 91% y una E en 92%. Otros estudios

encuentran sensibilidades inferiores (82,3%) como Bajrami y cols (80) en Kosovo, pero con una E similar a la encontrada en este trabajo (97,6%).

En este trabajo no se pudo calcular los ID para muestras extrapulmonares. Para este tipo de espécimen la S y E del Xpert® MTB/RIF varía en dependencia del tipo de muestra testada. Habous M y cols, en un estudio que realiza en Emiratos Árabes Unidos en 2019, informa una S general para la prueba molecular de 82,69% y una E del 100%. Por tipo de muestra estudiada, según la localización anatómica, notifica para ganglios linfáticos y aspirados una S de 76,92%, 66,67% en líquidos cefalorraquídeos, 100% en lavados gástricos y secreciones de pus, en orina 85,71% y 66,67% para otras muestras de tejidos. (81) Otros autores como Li Y y cols, en 2017 informan una S de general 70,6 % con una E del 91,96 %. (82)

En el presente estudio, se logró un diagnóstico rápido de TB extrapulmonar en siete pacientes con el Xpert® MTB/RIF. El único caso donde se detecta resistencia a RIF es un líquido pleural.

El diagnóstico de laboratorio en las localizaciones extrapulmonares constituye un reto debido al hecho de que la obtención de las muestras necesarias para su estudio muchas veces requiere de métodos invasivos y es difícil obtener muestras adicionales. Por otro lado, son muestras paucibacilares y en aquellas que se realiza el examen directo, con frecuencia el resultado es negativo. (83) Hay muestras donde no se recomienda realizar el examen directo, como biopsias de tejido y secreciones, y estas dependen de los resultados cultivo para poder realizar el

diagnóstico de la enfermedad, en este particular esta novedosa herramienta sería de gran utilidad, lo que conlleva a una mejor atención al paciente, evitar complicaciones graves y comenzar con el tratamiento de forma rápida.

Varios estudios informan una precisión diagnóstica del Xpert® MTB/RIF variable, dependiendo de varias circunstancias. En muestras pulmonares informan una S del 88% (IC: 84-92%; 22 estudios), como prueba de diagnóstico inicial como reemplazo a la BK, con una E del 99% (IC: 98-99%). Como prueba complementaria después de un resultado negativo de la BK (23 estudios con 7151 participantes) se plantea una S de 68% (IC: 61-74%) con una E del 99% (IC: 98-99%). Para los casos de TB con BK y cultivo positivo (23 estudios con 1952 participantes): la S de este método molecular es del 98 % (IC: 97-99 %). (84)

En PVV la S de esta prueba molecular disminuye a 79 % (IC: 70-86%; 7 estudios con 1789 participantes), para personas sin infección por este virus la S es superior, con un 86% (IC: 76-92%; siete estudios con 1470 participantes). Para la detección de resistencia a RIF, la S se incrementa a un 95% (IC: 90-97%; en 17 estudios, 555/2624 en total de especímenes) con una E del 98% (IC: 97-99%; en 24 estudios con 2414 muestras estudiadas). (84)

Para las muestras extrapulmonares, comparado con el cultivo, la S del Xpert® MTB/RIF varía en dependencia de la muestra utilizada para el estudio molecular. Para muestras de tejidos se anuncia una S entre 81–85%, para líquidos cefalorraquídeos disminuye al 79,5% y para los líquidos pleurales es mucho menor

con 43,7%. (84)

En este estudio, se detectaron por el ensayo molecular 166 casos de TB, que si se compara con la BK como herramienta inicial para el diagnóstico (que solo diagnosticó 77), se hubieran dejado de diagnosticar 89 casos. Por cultivo se identificaron 126 pacientes, que se traduce en 40 casos menos que no se hubieran dejado de diagnosticar por los métodos convencionales y podían mantener la transmisibilidad de la enfermedad en la comunidad, añadido a esto la demora de 3-4 semanas del mismo para emitir un resultado. Es importante señalar que el Xpert® MTB/RIF aportó 12 casos resistentes a la RIF, una de las drogas que se utilizan en la fase intensiva del tratamiento.

Para un mejor control, es de vital importancia la detección rápida de la TB, en el caso particular de la TB resistente orienta hacia el diagnóstico de TB-MDR, pre XDR o XDR (aislados resistentes a drogas de segunda línea), las que requieren de tratamientos muy diferentes: que son caros, demorados y poco tolerados por algunos pacientes. (85)

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. Aunque este fenómeno de la resistencia es poco frecuente en Cuba, en el contexto actual, dado por el fuerte intercambio de personal con países con alta carga de TB resistente, mantener la vigilancia de la resistencia, es de vital importancia para el PNCET y el sistema nacional de salud. 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 régimen de tratamiento a drogas de segunda línea, y de esta manera prever la aparición de aislados XDR.

Se estimó lo que aportó la prueba molecular al diagnóstico de los casos de La Habana estudiados en el IPK en el período de estudio. Esta provincia históricamente ha tenido la mayor incidencia de TB, comparado con el promedio nacional y contribuye con 20-30% de la carga de TB del país y notifica alrededor de 25% del total de los casos nuevos. En su condición de capital, es la provincia de mayor densidad poblacional e importancia económica, donde se concentran los principales focos generadores de la enfermedad y su comportamiento determina, en buena medida, los resultados de la nación. (86) La prueba molecular detectó 66 casos más que la BK y 34 más que el cultivo bacteriológico.

5.2. Comprobación del valor diagnóstico y rendimiento de la técnica de microscopía de fluorescencia LED en esputos.

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. Luego de la introducción del GeneXpert en el LNRI–TBLM–IPK en 2014, tecnología recomendada por la OMS como prueba inicial para el diagnóstico, y pese a las ventajas reconocidas de esta metodología, como se ha descrito en este documento, no hay acceso a la mayoría de los sintomáticos respiratorios con sospecha de TB. Debido a dificultades con los recursos financieros sostenibles para adquirir cartuchos y mantenimiento de los equipos, solo está indicada en los principales GV en la mayoría de los países de la

---

región, incluyendo Cuba. De los casos notificados en Las Américas en 2020 (197 364), solo el 27% tuvo acceso al GeneXpert (18) y en Cuba de los 580 notificados en el mismo año, solo el 22% (87). Por lo que se hace necesario incorporar otras técnicas, recomendadas OMS, para mejorar la detección de casos, como la MF LED.

En 2011, la OMS recomienda a la MF LED para el diagnóstico de la TB, así como la sustitución de la MFC por esta técnica, en todos los centros de salud donde se utiliza la fluorescencia convencional y a su vez indica que esta se introdujera de forma gradual como una alternativa para la microscopía con tinción de ZN en todos los laboratorios. (6) (88)

La MF LED tiene como potencial que mejora algunas de las desventajas de MFC y la técnica convencional por tinción de ZN; utiliza adaptadores, como el ParaLens QBC, pero su uso se limita en países de bajos recursos por la falta de infraestructura adecuada, capacitación del personal del laboratorio, así como la falta de fondos. Sin embargo, esta técnica es potencialmente más sensible y menos laboriosa que la BK de ZN u 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 y microscopía de campo oscuro, no tendrían dificultades para leer láminas con los ParaLens. Por otro lado, se evitaría la compra de un segundo microscopio debido a que el adaptador convierte un microscopio de luz brillante en uno de fluorescencia LED,

---

disminuyendo los costos. (7) (89)

Los beneficios operativos de los microscopios 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, además de los beneficios observados en los climas tropicales relacionados con a la ausencia de climatización en espacios cerrados. Por otro lado, el bajo precio de compra y costos por mantenimiento del equipo, mayor vida útil del diodo y ausencia de componentes tóxicos, son todos factores que influyen para el posterior uso de esta herramienta en los laboratorios para mejorar calidad del diagnóstico por BK. (42)

Al realizar la comprobación de la MF LED, de forma general se incrementó la tasa de detección de BAAR, lo que coincide con lo que plantea Goel S y cols. (7) en un estudio que se realiza en la India. Estos hallazgos acreditan a esta técnica, como una herramienta para aumentar la S y tasa de detección de casos con BK positiva. Sin embargo, es importante tener en cuenta otros factores como: la formación del personal, una mejor capacidad de trabajo y una buena infraestructura del laboratorio. (7)

En el caso particular de los frotis con escasos BAAR (paucibacilares), hubo un aumento del porcentaje de detección con la MF LED, similar a lo que obtienen otros autores. (7) (42) El ácido micólico presente en la pared de las micobacterias tiene la capacidad de absorber mejor la auramina O (colorante utilizado en MF LED) que



---

el carbol fucsina (utilizado en la coloración de ZN); lo cual facilita la coloración de un mayor número de bacilos y facilita su rápida identificación en la lámina; estos atributos influyen en que la MF LED sea más sensible que la BK convencional. (90) (91)

La concordancia entre la MF LED y MFC (método de referencia para el diagnóstico microscópico) fue menor a lo que informa Kuhn y cols (90) en un estudio multicéntrico, que utiliza el mismo adaptador ParaLens QBC, donde participan tres países (Bangladesh, Trinidad y Etiopía) y se compara estas dos técnicas. En ese estudio se obtiene un 100% de concordancia, pero en esa investigación se utiliza el adaptador con el objetivo de 60x y se investigan 25 láminas, menor cantidad a la de esta investigación, con resultados conocidos del cultivo (5 láminas negativas y 20 frotis positivos con diferentes grados de positividad).

En cuanto a los ID, la S de la MF LED y MFC que se obtiene fue menor a lo que notifica Marzouk y cols (88) en el 2013 que utiliza una metodología similar y analiza 180 muestras positivas por el cultivo y el mismo número de muestras negativas. En ese estudio se obtiene una S de 82,2% y 79,4% para MF LED y MFC, en ese orden. Sin embargo, la E para las microscopías fluorescentes en la presente investigación fue similar al que obtuvo el mismo autor (97,2% para ambas técnicas). También la S es inferior a lo notifica Imaz M y cols (6) en Argentina en 2017 que obtiene una S de 87,7%.

En el estudio donde se evalúa el rendimiento de la MF LED, el porcentaje de positividad con la técnica fluorescente (13,5%) y por la tinción de ZN (8,6%) fueron

inferiores al que notifica N'Guessan y cols. en el Instituto Pasteur de Francia en el 2013, utilizando el adaptador ParaLens QBC. En esa investigación dicho autor informa una positividad para la MF LED y tinción de ZN de 42% y 40%, en ese orden. (92) 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. También los resultados son inferiores a lo que informa Van Deun y cols en el 2008 (93), en un estudio donde determina el rendimiento de la MF LED en comparación con la tinción de ZN en centros hospitalarios de países con medianos/bajos recursos, donde notifica un porcentaje de positividad de 36,0 % para ZN y 38,6% para la tinción fluorescente, en ese orden. Esto pudiera obedecer que se estudiaron un mayor número de muestras clínicas e incluyen países con mediana carga de TB, por lo que inferimos pudo estar relacionada con la mayor positividad encontrada en ese estudio.

Es importante destacar que se identificaron diez casos por la MF LED que resultaron negativos por la BK convencional (cinco de ellos en PVV) y seis casos más con frotis paucibacilares (cuatro de ellos en PVV). Esto resulta de gran utilidad debido a que en estos casos hay que esperar los de los resultados del cultivo, que demora entre 30 y 60 días (94), para poder comenzar con el tratamiento. De estos pacientes, en uno no hubo confirmación bacteriológica por el cultivo, pero se trató de un paciente en seguimiento del tratamiento, por lo que se infiere que la micobacteria fue no viable y en consecuencia el cultivo fue negativo.

La S de la MF LED que se obtuvo en este estudio (81,82 %) fue superior a la de

Gelalcha y cols en 2017, en un estudio conducido en un hospital de Etiopía (77,8 %). (95) Esto puede obedecer a que Etiopía es un país de alta carga de TB/VIH, en este grupo de riesgo la BK, suele ser negativa sobre todo en estadíos avanzados de la enfermedad. También pudo haber influido la metodología utilizada, diferencias en el procedimiento o tipo de adaptador utilizado. (96)

Varias investigaciones muestran que la MF LED tiene un 10 % más de S que la coloración de ZN. (97) Sin embargo, Chang y cols, en un meta análisis en 2014 obtiene para la MF LED una S agrupada del 66,9 %. Los autores muestran que la S para esta herramienta varía de 40 a 83 %, mientras que la E tiene valores entre 82 y 100 %, lo que muestra un alto nivel de heterogeneidad entre los estudios analizados. (98)

En este estudio, el área bajo la curva fue mayor para MF LED (con valores cercanos a 1), comparada con la coloración de ZN; lo que significa que existe un 89 % de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo de TB sea el más correcto que el de una persona sana escogida al azar, lo que sugiere que esta técnica tiene mayor capacidad discriminativa para la detección de BAAR que la coloración de ZN convencional. (99) En la bibliografía consultada no se encontraron estudios similares donde se analice la curva de ROC.

Esta técnica fluorescente, aunque no fue objetivo de este estudio, algunos autores investigan su rendimiento en muestras extrapulmonares. Abdissa y cols (100) en el 2015 evalúa la efectividad de esta técnica en 144 biopsias con aspiración con aguja fina, con sospecha de infección por micobacterias, y la comparó con la tinción de

---

ZN (con el cultivo como método de referencia). Con la tecnología LED se incrementó el diagnóstico en 33,3% de los casos y se obtuvo un porcentaje de positividad de 34% comparado con la tinción de ZN (18,8%). Dado los limitados estudios a nivel mundial sobre la utilidad de esta técnica en muestras extrapulmonares, sería interesante evaluar en estudios posteriores la utilidad de esta técnica en este tipo de muestras.

La MF LED tiene múltiples ventajas sobre la tinción de ZN y MFC (que utiliza lámpara de vapor de mercurio). Los sistemas LED son relativamente económicos, pueden funcionar con corriente o baterías y tienen una vida útil efectiva de miles de horas. Los menores costos de capital y mantenimiento de los sistemas basados en LED, la observación más rápida de los frotis y una mayor S que con la tinción de ZN, hace que sean potencialmente más adecuados para los laboratorios con bajos recursos económicos (101).

## VI. CONCLUSIONES

- Se comprueba que el sistema molecular Xpert® MTB/RIF, así como la técnica de microscopía de fluorescencia LED, resultan confiables para el diagnóstico rápido de la tuberculosis, lo que impacta y fortalece el Programa Nacional de Control y Eliminación de la enfermedad en Cuba.
- Con la introducción del sistema molecular Xpert® MTB/RIF se incrementa el diagnóstico rápido y oportuno de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, lo que posibilita el manejo adecuado, inicio del tratamiento específico, disminuye la transmisión y diseminación de bacilos en la comunidad.
- La microscopía de fluorescencia LED tiene mayor rendimiento y es más eficiente para identificar frotis con escasos bacilos, lo que la avala como alternativa a la tinción Zielh Neelsen, lo que permite optimizar el diagnóstico baciloscópico de la tuberculosis pulmonar en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.

## VII. RECOMENDACIONES

- Determinar el rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha de TB.
- 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.
- Realizar nuevas investigaciones para evaluar la detección de la resistencia a rifampicina mediante el Xpert® MTB/RIF utilizando un mayor un mayor número de aislados del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el contexto cubano.

## VIII. 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. 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>
3. 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>
4. 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](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502021000300259&lng=es)
5. 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>

6. 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>
7. 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](https://doi.org/10.4103%2Flungindia.lungindia_475_17)
8. 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 Torax*. 2019; 78 (3): 284-9. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0028-37462019000300284](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462019000300284)
9. 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>



10. 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>
11. 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&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300014&lng=es). Epub 08-Feb-2021
12. Cartes Parra JC. Breve historia de la Tuberculosis. *Rev Medica Costa Rica y Centroamerica* 2013; LXX (605): 145-50. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=40692>
13. 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>
14. 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>

15. 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>
16. 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>
17. 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>
18. 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>.
19. 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](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/programa_2015.pdf)

- 
20. González Ochoa E, González Díaz A, Armas Pérez L, Llanes Cordero MJ, Marrero Figueroa A, Suárez Alvarez L et al. Tendencia de la incidencia de Tuberculosis en Cuba: lecciones aprendidas en 1991-1994 y su transcendencia 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](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602015000100012)
21. 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/>
22. 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/>
23. 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/>

24. 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>
25. 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?srsId=AfmBOorGCUJqcQDoJZpGHhE6P-fabhwXWhwEHQ7Ps\\_aQXrqm-6OHO3U2](https://www.routledge.com/Practical-Handbook-of-Microbiology/Green-Goldman/p/book/9780367567644?srsId=AfmBOorGCUJqcQDoJZpGHhE6P-fabhwXWhwEHQ7Ps_aQXrqm-6OHO3U2)
26. 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\\_Microbiologia%3%ADa\\_m%3%A9dica\\_25a\\_edici%C3%B3n](https://www.academia.edu/51148273/Jawetz_Melnick_y_Adelberg_Microbiologia%3%ADa_m%3%A9dica_25a_edici%C3%B3n)
27. 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>

28. Organización Panamericana de la Salud. Manual operativo de la OMS sobre la tuberculosis. Módulo 2: Tamizaje. Tamizaje sistemático de la tuberculosis. Washington, DC: OPS; 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275326220>.
29. 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>
30. 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/>
31. 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>
32. 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-NCSA 3.0 IGO.

---

<https://doi.org/10.37774/9789275325391>.

33. 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>
34. Manual for selection of molecular WHO recommended rapid diagnostic tests for detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240042575>
35. Arévalo AR, Alarcón H, Arévalo DE et al. Métodos Diagnósticos en Tuberculosis; lo convencional y los avances tecnológicos en el siglo XXI. Rev Med La Paz. 2015; 21(1):78-9. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-89582015000100011](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582015000100011)
36. 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>
37. 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>

38. Teran R, Waard J. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. JIFCC 2015; 26(4):310-25. Disponible en: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Recientes+avances+en+el+diagn%C3%B3stico+de+tuberculosis+en+el+laboratorio+cl%C3%ADnico>
39. Fernández de Vega FA, Moreno JE, González Martín J, Palacios Gutiérrez JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R editores. Procedimientos en Microbiología Clínica España: SEIMC; 2005. p: 2-3. Disponible en: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Procedimientos+en+Microbiolog%C3%ADa+Cl%C3%ADnica+Espa%C3%B1a+SEIMC%3B+2005>
40. Inserto BacT/ALERT® MP 43-03064. Biomeriux [Citado junio 2023]. Disponible en: <http://tbevidence.org/documents/rescentre/sop/BacTALERT%20MP.pdf>.
41. 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>
42. 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>

43. 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/>
44. 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>
45. 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/>
46. Martínez Romero MR, Sardiña Aragón M, García León G, Mederos Cuervo L, Vega Riverón R, Díaz Rodríguez R. Evaluación del sistema automatizado BacT ALERT 3D para el aislamiento de micobacterias en el LNRTB-IPK. *Neumol Cir Torax* 2012; 71(4):333-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=39491>
47. Ortiz Jiménez J, Franco Sotomayor G, Ramos Ramírez M. Validación e implementación de GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico de tuberculosis en Ecuador. *Kasmera* 2019; 47(1):29-37. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/3730/373061540006/html/>



- 
48. 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>
49. 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/>
50. Weyer K1, Mirzayev F, Migliori GB, Van Gemert W, D'Ambrosio L, Zignol M, Floyd K, et al. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. Eur Respir J 2013; 42(2):252–71. Disponible en: <https://erj.ersjournals.com/content/42/1/252>
51. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised 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/>
52. 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/>

53. 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>
54. Lozano Salazar JL, Plasencia Asorey C, Montanél DM, Puente Sanil. 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](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1029-30192012000900015)
55. 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](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432015000300005)
56. 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>
57. 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>

58. 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>.
59. 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>
60. 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/>
61. 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](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832005000200009)
62. Nakiyingi L, Nankabirwa H, Lamorde M. Tuberculosis diagnosis in resource-limited settings: Clinical use of GeneXpert in the diagnosis of smear-negative PTB: a case report. *African Health Sciences* 2013; 13(2):522 – 4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3824516/pdf/AFHS1302-0522.pdf>

63. 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/>
64. 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/>
65. 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)
66. 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/>

67. 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/>
68. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Rifampin Resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. J Clin Microbiol 2011; 49(12):4138–41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232962/>
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. 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)
73. 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)
74. Nguyen TQN, Auewskerk D, Dang AT, Tran THCh, Nguyen TMM, Ho OTN et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2013; 52 (1): 220-232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24197880>
75. 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).
76. Mayer K. "Synergistic Pandemics: Confronting the Global HIV and Tuberculosis Epidemics". *Clin Infect Dis* 2010. 50 (3). Disponible en: [http://cid.oxfordjournals.org/content/50/Supplement\\_3/](http://cid.oxfordjournals.org/content/50/Supplement_3/)

77. Peñata A, Salazar R, Castaño T, Bustamante J, Ospina S. Diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a rifampicina con un método automatizado en tiempo real. *Biomédica* 2016; 36(1):78-89. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3088>
78. Muñoz L, Moure R, Porta N, Gonzalez L, Guerra R, Alcaide F. GeneXpert® for smear-negative pulmonary tuberculosis: does it play a role in low-burden countries?. *Diag Microbiology and Infect Dis* 2013; 75: 325-6. DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.011](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.011).
79. 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)
80. 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)
81. 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)

82. 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)
83. 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)  
[84 11](#)
84. 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>
85. Gupta B K, Lawn S D, Booth H, Morris-Jones S. What is the role of Xpert MTB/RIF in high resource settings? Experience from a Central London Hospital. Int J Tuberc Lung Dis 2014; 18: 1323-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25299865/>
86. González Díaz A, Sánchez Valdés L, Armas Pérez L et al. Tendencias y pronósticos de la tuberculosis, desafíos en etapa de eliminación en La Habana. Rev Cuba Med Trop. 2012; 64:163-75. Disponible en:
87. OMS. Perfil de tuberculosis: Cuba, 2020. Disponible en: [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb\\_profiles/?inputs=&entity\\_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22CU%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?inputs=&entity_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22CU%22)



- 
88. 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>
89. 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](https://doi.org/10.4103%2Flungindia.lungindia_475_17)
90. 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/>
91. 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>

- 
92. 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>
93. 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
94. Vallego 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>
95. 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>
96. Ngabonziza SCJ, Ssengooba 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>

- 
97. Shenai S, Minion J, Vadwai V, Tipnis T, Shetty S, Salvi A, et al. Evaluation of light emitting diode-based fluorescence microscopy for the detection of mycobacteria in a tuberculosis-endemic region. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(4):483-8. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.10.0229>
98. 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>
99. 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>
100. Abdissa K, Tadesse M, Abdella K, Bekele A, Mesele Bezabih M, Abebe G. Diagnostic performance of fluorescent light-emitting diode microscopy for tuberculous lymphadenitis in a high-burden setting. *Trop Med Int Health* 2015; 20(11):1543–8. DOI: [10.1111/tmi.12585](https://doi.org/10.1111/tmi.12585)
101. Cuevas LE, Al-Sonboli A, Lawson L, Yassin MA, Arbide I, Al-Aghbari N et al. LED Fluorescence Microscopy for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Multi-Country Cross-Sectional Evaluation. *PLoS Med* 2011; 8(7). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001057>

## ANEXOS.

### Anexo 1. Elaboración de medio de cultivo Löwenstein Jensen.

Fundamento: Existen variedad de medios para cultivar a las micobacterias. 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 de esputo el medio más adecuado es el preparado en base de huevo ya que cumple con todos los requisitos señalados.

Reactivos: Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 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:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	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 2.** 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 csp..... 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 recientemente preparada 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 reparación 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.....

### Preparación 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.....	.....	.....



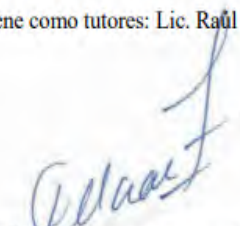
### Anexo 3. Aval de la Comisión Científica Especializada de Microbiología



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURI (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

**Anexo 4. Aval de la Comisión de Ética del IPK**



**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 of the president of the CEI-IPK.



**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:

<b>Nombre y Apellidos</b>	<b>Profesión</b>	<b>Cargo actual/ institución</b>
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. Tiular/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

## **Anexo 5. Avaless**

### a) 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 Torax. 2019; 78 (3): 284-9. dx.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.

b) Presentada en varios eventos nacionales (12) e internacionales (8)

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 microscopía 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.

### c) 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. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

d) Salidas de tesis de:

1. Tesis para optar por el título de Especialista de 1er Grado en Microbiología:

- "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:

- "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. Tunyth 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.

e) 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
  
- “Fortalecimiento de las capacidades investigativas, los conocimientos y las acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en Cuba “. Financiación: Minsap. Objetivo 4: Mejorar y acelerar el diagnóstico de la TB en La Habana mediante la microscopía de fluorescencia LED y Xpert MTB/RIF. Sectorial