



**Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**

**Rendimiento de la microscopia de fluorescencia LED
para el diagnóstico de Tuberculosis en personas viviendo con VIH/sida.**

IPK. Abril 2019-Febrero 2020.



Trabajo de tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología- Micología

Autor: Dra. Nancy Pedrera Pozo

La Habana, 2022



**Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**

**Rendimiento de la microscopia de fluorescencia LED
para el diagnóstico de Tuberculosis en personas viviendo con VIH/sida.**

IPK. Abril 2019-Febrero 2020.



Trabajo de tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología- Micología

Autor: Dra. Nancy Pedrera Pozo

Tutores: Dra. María R. Martínez Romero, MSc
Lic. Daniel Salazar Rodríguez, MSc

Asesor: Lic. Raúl Díaz Rodríguez, DrC

La Habana, 2022

DEDICATORIA ☞

La presente tesis la dedico a toda mi familia, a mis padres que han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarme la confianza, consejos, oportunidad y recursos para lograrlo y principalmente a mi esposo, por estar siempre en esos momentos difíciles brindándome su amor, paciencia y comprensión.

AGRADECIMIENTOS ☞

A mí querido esposo motor impulsor de este sueño hecho realidad.

A mi tutora *María Rosarys* por esa gran dosis de paciencia durante el desarrollo de la tesis y a sus profundos conocimientos, sin los cuales no sería posible este logro.

A mi tutor Lic. Daniel Rodríguez Salazar, MsC y a mi asesor Lic. Raúl Díaz Rodríguez, DrC incansables ambos en la transmisión de consejos útiles.

Agradezco también a la Lic. Luanda Sánchez Cámara, jefa y amiga que incondicionalmente me tendió su mano apoyando mi sacrificio profesional.

En fin, a todos aquellos que de una forma u otra aportaron un granito de arena para la culminación del presente estudio.

RESUMEN

La microscopía de fluorescencia LED (MF-LED) fue recomendada por la Organización Mundial de la Salud en 2011. El objetivo fue evaluar el desempeño de la MF-LED para el diagnóstico de tuberculosis (TB) en personas viviendo con VIH/sida (PVVS). Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI-TBLM) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, desde abril 2019 a febrero del 2020. Se incluyeron 220 de muestras de esputo de PVVS con sintomatología respiratoria y sospecha de TB. Se compararon los resultados de la MF-LED con los de la microscopía convencional ZN (MC-ZN) y se utilizó el cultivo bacteriológico como prueba de referencia. Se relacionó la positividad de la MF-LED con el resultado del conteo de linfocitos T CD4+ de las PVVS. De las muestras donde se confirmó *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo, en 25 se identificaron bacilos ácido alcohol resistente por MF-LED contra 13 por la MC-ZN. La proporción de láminas positivas por MF-LED (92,6%) fue significativamente mayor que la que se observó por MC-ZN (48,1%) ($p=0,0094$). Por la MF-LED se identificaron 13 frotis positivos que fueron observados como negativos por la MC-ZN y se identificaron 12 láminas con escasos bacilos, 10 más que por MC-ZN (2). La sensibilidad (92,59%) e Índice de Youden (0,92) de la MF-LED fueron superiores a los de MC-ZN (48,15% y 0,48, respectivamente). La MF-LED resultó útil para la detección de TB en PVVS con conteo de linfocitos T CD4+ menor de 500 células/mL. El mayor rendimiento de la MF-LED sugiere que puede ser utilizada como alternativa MC-ZN en el diagnóstico de TB en PVVS y permitirá incrementar el diagnóstico de casos con TB pulmonar BK (+) en PVVS.

ABREVIATURAS

LED, siglas en inglés: Diodo emisor de luz

SARS-CoV-2: coronavirus tipo 2 causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo

COVID-19: Enfermedad causada desde 2019 por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2.

TB: Tuberculosis

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC: complejo *Mycobacterium tuberculosis*

ZN: Ziehl Neelsen

BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente

BK: Baciloscopía

MF-LED: Microscopía de fluorescencia LED

MC-ZN: Microscopía convencional ZN

MNT: Micobacterias no tuberculosas

ID: Indicadores de desempeño

E: Especificidad

S: Sensibilidad

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

IV: Índice de validez

LJ: Löwenstein Jensen

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

OMS: Organización Mundial de la Salud

PNCETB: Programa Nacional de Control y Eliminación de la Tuberculosis

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

PVVS: pacientes que viven con VIH/sida

ÍNDICE

	Páginas
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. MARCO TEÓRICO.....	5
III.1. Breve historia de la tuberculosis.....	5
III.2. Epidemiología de la tuberculosis.....	6
III.2.1. Situación epidemiológica en las Américas.....	6
III.2.2. Evolución de la tuberculosis en Cuba.....	7
III.3. Coinfección TB/VIH/sida.....	7
III.4. Taxonomía y clasificación de las micobacterias.....	8
III.5. Morfología y características de las micobacterias.....	9
III.6. Diagnóstico de las micobacterias.....	10
III.6.1 Técnicas de BK.....	11
III.6.2 Técnicas de cultivo.....	12
III.6.3 Pruebas aprobadas por la OMS para el diagnóstico de la TB.....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
IV.1. Contexto, tipo de estudio y universo.....	16
IV.2 Criterios de selección.....	16
IV.3 Recolección de la información.....	16
IV.4 Procesamiento de los datos y análisis estadístico.....	16
IV.5 Aspectos ético.....	18
IV.6 Limitaciones del estudio.....	18
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
VI. CONCLUSIONES.....	30
VII. RECOMENDACIONES.....	31
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
IX. ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TB) es la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, hasta la aparición de la pandemia del coronavirus (SARS-CoV-2)¹. Se estima que la cuarta parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)². Es la infección oportunista más común entre las personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y es la causa de muerte más frecuente en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) que representan una de cada cuatro muertes relacionadas con el VIH³.

En 2020, se estima a nivel mundial 1,3 millones de muertes entre personas VIH negativas, frente a 1,2 millones en 2019 y 214 000 muertes entre personas viviendo con VIH/sida (PVVS), un pequeño aumento de 209 000 en relación con 2019. La pandemia de la COVID-19 ha revertido años de progreso mundial en la reducción del número de personas que mueren por TB, con el primer aumento interanual (de 5,6%) desde 2005 y el número total de muertes en 2020 volviendo al nivel de 2017. La misma tendencia se evidencia en la tasa mundial de mortalidad por TB (muertes por 100 000 habitantes por año). El número mundial de muertes oficialmente clasificadas como causadas por TB es casi el doble del número causado por el VIH/sida (0,68 millones), y la mortalidad por TB se ha visto más afectada por la pandemia de COVID-19 en 2020 que el VIH/sida¹.

En el diagnóstico temprano de la TB y las micobacteriosis, la baciloscopía (BK) juega un papel importante pues permite identificar los casos altamente infecciosos en la comunidad y es útil en la búsqueda de casos. Sin embargo, su sensibilidad (S) oscila entre 22 y 43% para un solo frotis y se documenta que puede alcanzar hasta 60% en condiciones óptimas en comparación con el cultivo. El umbral de detección de los bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) en muestras de esputo se encuentra entre 10^4 y 10^5 bacilos por mililitro (mL). El cultivo bacteriológico es más sensible que la BK, pero requiere de técnicas más complejas, que demoran entre 30 y 60 días en demostrar el desarrollo micobacteriano⁴.

Desde el 2011, aparece en el mercado una nueva generación de lámparas: diodos que emiten luz (*Light-Emitting Diodes*: LED, por sus siglas en inglés). Estas lámparas son baratas de producir, emiten luz en casi cualquier tipo de longitud de onda y tienen una vida media de alrededor de 20 000 – 30 000 horas. Por otro lado, la calidad de la tinción por la microscopía de fluorescencia puede ser más fácil de controlar, ya que la calidad del polvo de auramina comercial es menos variable que el de la fucsina básica⁵.

I. INTRODUCCIÓN

Estudios realizados a nivel mundial han documentado un nivel similar o superior de S y especificidad (E) para la microscopía de fluorescencia LED (MF-LED) en comparación con la microscopía convencional basada en tinción ZN (MC-ZN) para la detección de casos de TB con BK positiva. Además, se ha reportado que la MF-LED consume menos tiempo de lectura por portaobjetos porque se examinan con menos aumento que la tinción de ZN cubriendo un área mucho mayor^{6, 7}. El buen desempeño de esta tecnología, ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a recomendar su uso como una alternativa de la MC-ZN y que esta debe sustituirse de manera escalonada^{8,9}.

Para poder alcanzar la eliminación de la TB, tanto en países de altas como en los de bajas tasas de incidencias, es indispensable intensificar y unir los esfuerzos en la lucha contra la TB, adaptando estrategias y estableciendo prioridades de acuerdo a la epidemiología y los sistemas de salud locales¹⁰. 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 se conviertan en la primera región del mundo en alcanzar la eliminación de la TB como problema de Salud Pública. El camino hacia la eliminación implica pasar de una baja incidencia a la pre-eliminación. Cuba ocupa el tercer lugar entre los 14 países de la región de Las Américas de baja incidencia de TB (≤ 10 casos por cada 100 000 habitantes) que tienen la oportunidad de ser los primeros en avanzar hacia la eliminación de esta temible enfermedad¹¹.

El Programa Nacional de Control y Eliminación de la TB (PNCET) en conjunto con el Ministerio de Salud Pública, ha preparado 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 casos¹².

Para lograr este propósito es imprescindible mejorar la calidad del diagnóstico, así como la rapidez en la detección de casos mediante la introducción de técnicas más sensibles de BK, como es la MF-LED. El Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI-TBLM) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), dispone de la técnica de MF-LED (con el adaptador ParaLens™ de la empresa QBC Diagnostics, EE.UU.) desde el año 2018. Pedrera N, en el mismo año,

I. INTRODUCCIÓN ☞

realiza la validación y evaluación de este método, en población general, en dicho laboratorio; sin embargo, no es posible evaluar la precisión de esta técnica en PVVS con sospecha de TB pulmonar debido al pequeño tamaño de la muestra estudiada, lo que constituye una limitante de la investigación, resultando una recomendación para realizar estudios posteriores¹³. En el 2013 Albert y cols¹⁴ realizan un estudio en Uganda y reportan una detección limitada de casos de TB en PVVS debido a la baja sensibilidad que se obtuvo con la MF-LED particularmente en pacientes con recuentos bajos de células de linfocitos T CD4+. Estas razones nos motivaron para realizar la presente investigación en especímenes de PVVS ingresados en el Hospital de Referencia Nacional de atención al paciente VIH y de los procedentes de la consulta médica con sospecha de TB pulmonar.

Preguntas de investigación.

¿Habrá concordancia entre los resultados de la lectura con la microscopía de fluorescencia LED y los de la lectura utilizando la microscopía convencional de ZN con los del cultivo Löwenstein Jensen?

¿Existirán diferencias entre la lectura de los frotis observados por la microscopía de fluorescencia LED y los de la lectura con la microscopía convencional de ZN?

¿Existirá relación entre la positividad de los frotis utilizando la microscopía de fluorescencia LED con el estado inmunológico (linfocitos T CD4+) de los pacientes incluidos en el estudio?

II. OBJETIVOS ☞

Específicos

1. Evaluar el rendimiento diagnóstico de dos técnicas de microscopías utilizadas en el LNRI-TBLM para el diagnóstico de tuberculosis.
2. Relacionar la positividad de la microscopía de fluorescencia LED con el resultado del conteo de linfocitos T CD4+ de PVVS con cultivo positivo a *Mycobacterium tuberculosis*.

III. MARCO TEÓRICO

III.1. Breve historia de la tuberculosis

La TB es una infección bacteriana crónica causada por *Mtb*. Su historia es un tema apasionante, en pocas enfermedades es posible documentar su estrecha relación con la historia de la propia humanidad como en dicha enfermedad¹⁵.

Fuertes evidencias demuestran que este complejo evoluciona como patógeno humano en el este del continente africano y su dispersión a otras regiones puede ocurrir 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 Neolítico¹⁶.

Sin embargo, esta enfermedad no se convierte en un problema importante hasta la Revolución Industrial cuando la vida hacinada y las condiciones socioeconómicas favorecen su difusión. En los siglos XVII y XVIII, la TB causa la cuarta parte de todas las muertes de adultos en Europa. Antes de que los agentes antimicrobianos estuvieran disponibles, la piedra angular del tratamiento era descansar al aire libre en sanatorios especializados¹⁷.

Un impacto científico importante constituye el descubrimiento del agente causal de la TB. El 24 de marzo de 1882, en Alemania, el científico Roberto Koch describe el agente patógeno de esta enfermedad infecciosa. Su descubrimiento lo hace público en un discurso pronunciado en el Instituto de Higiene, en Berlín, por este motivo recibe en 1905 el Premio Nobel. Otro eslabón en el desarrollo de la ciencia y en el conocimiento de la enfermedad, es el descubrimiento de los Rayos X por Wilhelm Conrad Roentgen, el cual constituye un elemento de trascendental importancia para el diagnóstico no sólo de la TB, sino de muchos de los procesos que afectan a diferentes regiones del organismo¹⁸.

La era moderna de la TB comienza en 1946 con la demostración de la eficacia de la estreptomicina. En 1952, la disponibilidad de Isoniacida (INH) hace curable la TB en la mayoría de los pacientes, y la adición de la Rifampicina (RIF) en 1970 permite una terapia de combinación aún más efectiva. La duración de la quimioterapia disminuye progresivamente desde alrededor de 2 años antes la disponibilidad de RIF, hasta los 9 meses con INH más RIF, y 6 meses con el uso de terapia multimedicamentos que incluye la INH, la RIF y la Pirazinamida (PZA). Con INH también se vuelve práctico tratar a las

III. MARCO TEÓRICO

personas asintomáticas que se cree albergan bacilos tuberculosos basadas en pruebas positivas de la tuberculina¹⁷.

III.2. Epidemiología de la tuberculosis

La TB es la principal causa de mortalidad dentro de las enfermedades infecciosas. Poner fin a la epidemia de esta enfermedad es uno de los pilares de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, que requieren una acción intensiva por parte de todos países, especialmente aquellos con una alta carga de TB¹⁹.

En el año 2020 se estima a nivel mundial una incidencia de TB de 10,4 millones de casos: 56% son hombres, 32% mujeres, 12% niños y 8,2 % pertenecen a PVVS. Un total de 1,5 millones de personas mueren de TB, entre ellas 214 000 personas con VIH. A nivel mundial, la incidencia de la TB está disminuyendo en un aproximado del 2% anual, y entre 2015 y 2020 la reducción acumulada es del 11%¹.

La OMS da otro paso más y establece la meta de reducir las tasas de mortalidad e incidencia en el 95% y el 90 % para el 2035, respectivamente, y situarlas en niveles similares a los actuales en los países con baja incidencia de la enfermedad²⁰.

III.2.1. Situación Epidemiológica en Las Américas

La TB representa todavía un importante problema de salud en la Región de las Américas. La región ha avanzado en la prevención y el control de la enfermedad, sin embargo, al ritmo actual de descenso del número de muertes y de la incidencia no se alcanzarán las metas ni los hitos propuestos para poner fin a la epidemia. Por ello, es necesario acelerar los esfuerzos de los países para cumplirlas²¹.

En el año 2020, se estima cerca de 290 0000 casos de TB con una brecha de 52 000 casos no detectados y una disminución del 19,2% de casos con relación al año 2019. Se ha estimado una tasa de incidencia de 28 casos por cada 100 000 habitantes, no obstante, la tasa de incidencia más alta se encuentra en los países del Caribe con 61,2 por cada 100 000 habitantes y en América del Sur con 46,2 casos por cada 100 000 habitantes ²².

III. MARCO TEÓRICO

También se estima 22 000 fallecimientos por TB, 29 000 casos de TB y VIH, y 11 000 casos de TB resistente; los países que concentran el 63,4% de los casos de TB sensible en la región son en su orden Brasil con un 33,1%, Perú 13,4%, México 10,3%, y Colombia 6,6%. El éxito en el tratamiento de casos de TB entre nuevos y recaídas se registra en la región en 75,6%, mientras hay un 56,4% de éxito terapéutico en casos de TB y VIH, un 44% en previamente tratados y 56% en TB tipo multidrogorresistente y TB resistente a la RIF con 46,2 casos por cada 100 000 habitantes²³.

Aunque persisten brechas amplias, los países de baja incidencia han logrado avances significativos en las acciones dirigidas a poblaciones vulnerables, tamizado de TB activa y latente, diagnóstico y tratamiento de TB resistente, sistemas de vigilancia e información y programas de monitoreo y evaluación. Las áreas en que menos pasos se han dado y que requieren acciones rápidas son la atención a los inmigrantes, la inversión en investigación y el crecimiento del compromiso político con recursos financieros²⁴.

III.2.2. Evolución de la tuberculosis en Cuba

En nuestro país, la evolución de la TB desde 1971 hasta 1991 muestra una tendencia descendente como expresión del resultado de la lucha contra esta enfermedad y al fortalecimiento del Sistema Nacional de Salud, así como las transformaciones socioeconómicas operadas en el país. Para mejorar algunas 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 salud²⁵.

La mortalidad por TB no constituye un problema ya que en los últimos 10 años las tasas se han mantenido por debajo de uno por 100 000 habitantes. Es importante señalar que entre los años 2019 y 2020 la incidencia de TB en niños menores de 15 años se incrementa de 0,3 a 0,5 por 100 mil habitantes. El comportamiento actual indica un detenimiento del incremento de la enfermedad, al cierre de 2020 se registraron 532 casos nuevos, para una tasa de notificación 4,7 por 100 mil habitantes, cifra similar a los años precedentes²⁶.

III. MARCO TEÓRICO

III.3. Coinfección TB/VIH/sida

La coinfección TB/VIH/sida es uno de los problemas de salud más importantes que afronta la humanidad, ésta ha cobrado millones de víctimas sobre todo en los países pobres con mínimos recursos para su diagnóstico, tratamiento y control; a pesar de algunos logros, esta representa el principal fracaso de la Salud Pública por su persistente crecimiento en todo el orbe. La combinación de estas dos infecciones tiene consecuencias mucho más graves que cualquiera de ellas por separado²⁷.

El impacto del VIH/sida en el control de la TB se debe a que afecta los linfocitos T CD4+ y macrófagos, primera línea de defensa del organismo. El VIH induce una inmunodepresión progresiva que favorece la reactivación de la TB en personas con infección tuberculosa latente y la progresión hacia la enfermedad en aquéllas con primoinfección o reinfección tuberculosa²⁸. Este impacto es bidireccional. Al aumentar la carga viral, la TB acelera la progresión de la infección por VIH a sida, en muchas ocasiones conllevan a la muerte. Por su parte, la infección por VIH causa una disminución de la población de linfocitos T CD4+ (de crucial importancia en iniciar y mantener la respuesta inmunitaria) y afecta la presentación clínica y evolución de la TB²⁹.

El agotamiento de las células T CD4+ es la principal característica del sida, este deterioro inmune conduce al aumento del riesgo de reactivación de la TB latente y la susceptibilidad a la nueva infección por el bacilo, a su vez se ha visto que las células T CD8+ desempeñan un papel en el control de la TB latente. Otros mecanismos empleados para facilitar la infección por *Mtb*, son la regulación de los receptores de entrada en macrófagos, la quimiotaxis desregulada, y un desbalance entre las respuestas Th₁/Th₂. Asimismo, se ha demostrado que el VIH deteriora el factor de necrosis tumoral (TNF) de macrófagos mediada por respuesta apoptótica a *Mtb* y por lo tanto facilita la supervivencia bacteriana³⁰.

En el 2020 se estima 1,3 millones de muertes en personas VIH negativos, adicionando el estimado de 214 000 fallecimientos en PVVS ¹. En personas inmunodeficientes se observa incremento de las formas extrapulmonares, sobre todo en las últimas décadas, probablemente relacionado a la epidemia VIH/sida³¹.

III. MARCO TEÓRICO

III.4. Taxonomía y clasificación de las micobacterias

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*. Las especies de este género se caracterizan por poseer un elevado contenido de guanina y citosina en su ADN (61-71%). Esta característica es compartida con otros géneros relacionados, que poseen ácidos micólicos en su pared celular, como *Gordona*, *Tsukamurella*, *Nocardia* y *Rhodococcus*³².

Del género *Mycobacterium* hay 189 especies reconocidas oficialmente, las que han sido agrupadas según su patogenicidad³²⁻³⁴.

- Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC): comprende *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii* (causa extremadamente rara de TB humana), *M. caprae* (otro patógeno bovino), *M. microti* (patógeno para roedores), *M. mungi* (mangostas), *M. pinnipedii* (patógeno para focas), *M. orygis* (patógeno para animales y humanos en África y Asia) y *M. surricatae* (suricatas). Mientras *M. tuberculosis* y *M. africanum* son especies adaptadas a humanos, las otras especies prefieren anfitriones animales (específicos) con un posible contagio zoonótico a los humanos, principalmente de *M. bovis* a través del ganado. Las dos especies adaptadas a humanos comprenden ocho linajes filogenéticos (L1–L8), siendo L1–L4 y L7–L8 *M. tuberculosis sensu stricto*, 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.
- Complejo *Mycobacterium leprae*, incluye: *M. leprae* y *M. leprae-murinum*, productores de lepra humana y en roedores respectivamente.
- Micobacterias ambientales: son más de 180 las especies reconocidas, dentro de las cuales las más importantes son las siguientes, en nivel de patogenicidad descendente de 1 a 3:
 1. *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. shimoidei*, *M. abscessus*.
 2. MAC, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. celatum*.
 3. *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*.

III. MARCO TEÓRICO

III.5. Morfología y características de las micobacterias

Las micobacterias son morfológicamente bacilos o cocobacilos ligeramente curvos o rectos, no forman esporas, no presentan flagelos ni cápsula. Son resistentes a la decoloración de ácido clorhídrico al 3%, por lo cual, se les identifica como BAAR. Las especies pertenecientes al género *Mycobacterium* se consideran aerobios estrictos y su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la mayoría de las bacterias (aproximadamente de 18 horas), por lo que necesita de 3-4 semanas de incubación a 37°C, para formar colonias visibles macroscópicamente. Las formas saprófitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan bien a 22°C, producen más pigmento y son menos ácido resistente que las formas patógenas³⁵.

Las características más importantes del género *Mycobacterium* están determinadas por la complejidad de su pared celular (fig. III.1) rica en lípidos (50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática. Esta pared celular es la responsable de muchas de las propiedades características del género: acidorresistencia, crecimiento lento, resistencia a detergentes, resistencia a los antibacilares. En la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM). El LAM presenta una relación funcional con los liposacáridos O antígenicos presentes en otras bacterias³⁶.

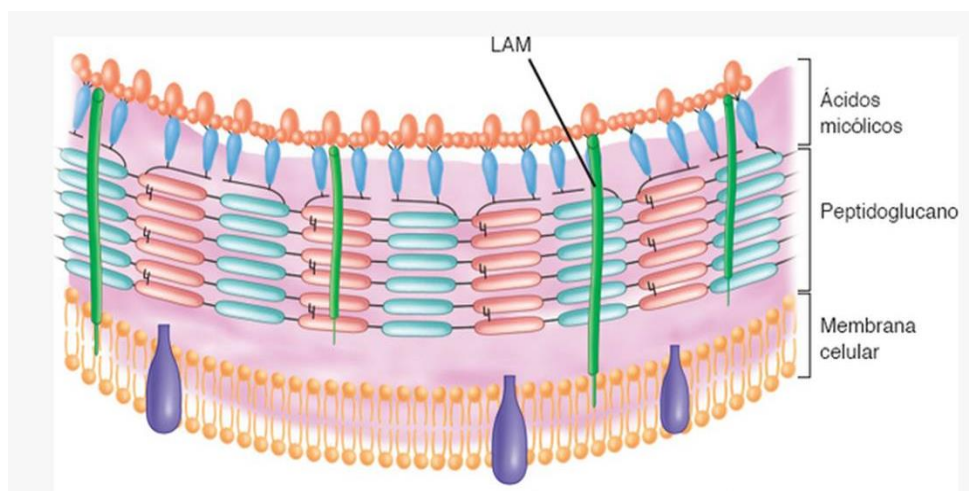


Figura III.1. Composición de la pared celular de las micobacterias

III. MARCO TEÓRICO

Las diferentes especies varían en su pigmento y morfología, sus colonias pueden ser rugosas, de color hueso crema, elevadas convexas y de bordes irregulares (*Mtb*); lisas y transparentes (complejo *M. avium-intracellulare*), o de aspereza intermedia. Microscópicamente pueden ser cocoides o largos filamentos, ocasionalmente forman ramificaciones, estas se observan en cultivos enriquecidos (*M. kansasii*). La temperatura ideal para el crecimiento es de 32-37°C, y el 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 cromógenas³⁵.

En el caso de la lepra, por los requerimientos especiales de *Mycobacterium leprae* no es posible el cultivo *in vitro*. El diagnóstico de la enfermedad se hace por sospecha clínica, antecedentes epidemiológicos y los métodos de laboratorio convencionales (BK e histología) sólo se utilizan como exámenes de apoyo³².

III.6. Diagnóstico de las micobacterias

Entre las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la TB latente se encuentran la prueba intradérmica de tuberculina (PPD) y las pruebas de interferón gamma liberado (siglas en inglés IGRAs). La PPD se basa en una respuesta inmune de hipersensibilidad retardada a una mezcla compleja de antígenos proteicos llamada derivado de proteína purificada. Contiene muchos componentes que se comparten tanto con las micobacterias del complejo *Mtb* (incluida la BCG) como con otras micobacterias no tuberculosas, lo que reduce su E y S^{32, 37}.

Las IGRAs son pruebas basadas en la producción de interferón gamma por las células T sensibilizadas frente a antígenos de *Mtb*, en la actualidad el más usado es el Quantiferon TB Gold, con S similar a la tuberculina, pero con mayor E, que no reacciona frente a micobacterias atípicas e inducidas por BCG. Ambas pruebas ayudan a identificar si el paciente se ha expuesto al bacilo, pero no establecen diferencia entre infección y enfermedad³⁸.

III. MARCO TEÓRICO

III.6.1. Técnicas de BK

Las técnicas de coloración se han mantenido sin modificaciones en el tiempo. Son utilizadas de rutina por su facilidad, rapidez y alta E; 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, actitud y perseverancia del microscopista ante una muestra sospechosa de TB³⁹.

Se basan en la ácido-alcohol resistencia, propiedad que tienen las micobacterias de unir en su pared fucsina fenicada o auramina y retenerlas frente a la acción de decolorantes como la mezcla de ácido y alcohol. Así, utilizando 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 visualización⁴.

Las dos tinciones más utilizadas son la clásica de ZN y la tinción con fluorocromos (auramina O). La microscopía de fluorescencia convencional de frotis teñidos con auramina se ha estudiado como una alternativa a la microscopía convencional con tinción de ZN. Estudios realizados han demostrado una E similar y una S media del 10% más alta que la tinción de ZN. Sin embargo, no se ha podido implementar ampliamente en muchos entornos endémicos de TB, una de las razones es el alto costo del microscopio. Esto ha cambiado con el advenimiento de microscopios fluorescentes más baratos con diodos emisores de luz. Investigaciones sobre el rendimiento de esta técnica han demostrado que tienen mayor S, además de ventajas cualitativas, operacionales y de costos⁴⁰.

Permite una lectura más rápida (2-3 min) que la microscopía ZN y se recomienda cuando el número de muestras a examinar es superior a diez 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 micobacterias⁴.

III. MARCO TEÓRICO

En muchos entornos de alta carga de TB, la BK sigue siendo la principal técnica de diagnóstico para evaluar a las personas que presentan signos y síntomas de TB. Es una prueba con un límite de detección de 5 000 a 10 000 bacilos por mL de esputo; además, no puede distinguir bacilos viables de no viables. La OMS recomienda que los programas de TB pasen a reemplazar la microscopía como prueba de diagnóstico inicial con técnicas moleculares que permitan la detección de complejo *Mtb*⁴¹.

III.6.2. Técnicas de cultivo

El cultivo es un método muy sensible (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, permite la identificación de *Mtb*, realizar las pruebas de susceptibilidad a los fármacos antituberculosos y detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos⁴². Su rol es vital en escenarios con mediana o baja incidencia de TB, así como en contextos de alta coinfección de la enfermedad y VIH. Los medios de cultivo sólidos basados en huevo, tales como LJ u Ogawa, son los más utilizados para cultivo de micobacterias, con un promedio de 3 a 4 semanas de incubación para recuperar las micobacterias de muestras clínicas. La introducción de los medios líquidos (Middlebrook 7H9, entre otros) significa una mejora en la recuperación, con una disminución del tiempo de detección, así como en la rápida obtención de los resultados de pruebas de susceptibilidad a fármacos⁴³.

Se han desarrollado sistemas automatizados para la detección de crecimiento en diferentes microorganismos en medio líquido. La mayoría se basan en diferentes tecnologías: métodos de detección radiométrica como Radiometric BACTEC 460 System, métodos colorimétricos que detectan producción bacteriana de CO₂ como el sistema BacT / ALERT 3D y otros usan sensores de presión o métodos fluorométricos para detectar el consumo de oxígeno bacteriano como el ESP Culture System II y el BACTEC MGIT 960 System, respectivamente. Estos métodos proporcionan tiempos similares a la detección y son instrumentos totalmente automatizados⁴⁴.

El método de referencia actual para la confirmación bacteriológica de la TB es el cultivo utilizando medios líquidos disponibles comercialmente. Sin embargo, no se utiliza como prueba diagnóstica primaria en muchos países con alta carga debido al costo, los requisitos de infraestructura (nivel de bioseguridad 3 [BSL-3] o laboratorio de contención

III. MARCO TEÓRICO

de TB) y el largo tiempo requerido para generar resultados (1 a 3 semanas para un resultado positivo y hasta 6 semanas para un resultado negativo). No obstante, la microscopía convencional y el cultivo siguen siendo necesarios para monitorear la respuesta de un paciente al tratamiento⁴¹.

III.6.3. Pruebas aprobadas por la OMS para el diagnóstico de la TB

En los últimos años, se han puesto a disposición pruebas moleculares rápidas y sensibles para reemplazar o complementar las técnicas convencionales existentes para detectar *MTBC* y resistencia a los medicamentos⁴¹. Estas pruebas incluyen: Xpert® MTB/RIF y Xpert MTB/RIF Ultra [Cepheid, Sunnyvale, Estados Unidos de América (EE. UU)]. El ensayo Xpert MTB/RIF es una prueba automatizada basada en cartuchos que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en la plataforma GeneXpert® para identificar *MTBC* y mutaciones asociadas con la resistencia a RIF directamente a partir de muestras de esputo en menos de 2 horas⁴⁵. Sin embargo, la S de Xpert MTB/RIF es subóptima, especialmente en pacientes con BK negativa y con TB asociada al VIH.

El Xpert MTB/RIF Ultra, en lo sucesivo denominado Xpert Ultra, es desarrollado como el ensayo de próxima generación para superar estas limitaciones. Utiliza la misma plataforma GeneXpert® que el Xpert MTB/RIF pero incorpora dos objetivos de amplificación multicopia diferentes y tiene una cámara de reacción de ADN más grande que Xpert MTB/RIF. También incorpora amplificación de ácido nucleico totalmente anidada, ciclos térmicos más rápidos y fluidos y enzimas mejorados. Esto ha dado como resultado que tenga un límite de detección de 16 unidades formadoras de colonias bacterianas (ufc) por mL en comparación con 114 ufc/mL para Xpert MTB/RIF^{41, 45}.

Pruebas Truenat™ MTB, MTB Plus y MTBRIF Dx (Molbio Diagnostics, Goa, India): utilizan micro PCR en tiempo real basado en chip para la detección semicuantitativa de *MTBC* directamente a partir de muestras de esputo y pueden informar los resultados en menos de una hora. Los ensayos utilizan dispositivos automatizados que funcionan con baterías para extraer, amplificar y detectar loci de ADN genómico específico. Los ensayos están diseñados para ser operados en laboratorios periféricos con infraestructura mínima y técnicos mínimamente capacitados. Si el resultado del ensayo MTB o MTB *Plus* es

III. MARCO TEÓRICO

positivo, se procesa una alícuota del ADN extraído en el ensayo Truenat MTBRIF Dx para detectar mutaciones asociadas con la resistencia a RIF⁴¹.

Ensayos de sonda de línea (LPA, Line probe assay por sus siglas en inglés); GenoType® MTBDR*plus* y GenoType® MTBDR*sl*, HAIN Lifescience, Nehren, Alemania; NTM+MDRTB Detection Kit, NIPRO Corporation, Osaka, Japón): es un ensayo de hibridación que se basa en un PCR para detectar la presencia de ciertos loci de ADN en tiras de nitrocelulosa marcadas con sondas específicas para las diferentes especies de micobacterias. Tiene la ventaja de que este formato de tiras es de fácil lectura e interpretación⁴⁶. Detectan mutaciones asociadas con la resistencia a los medicamentos, directamente, a través de la unión de productos de amplificación de ADN (amplicones) a sondas dirigidas a las mutaciones más comunes o indirectamente, inferido por la falta de unión de los amplicones a las correspondientes sondas de tipo salvaje. Los de primera línea, como GenoType MTBDR*plus* y NTM+MDRTB Detection Kit, permiten la detección de resistencia a RIF, INH y Etambutol. Los LPA de segunda línea, como la prueba GenoType MTBDR*sl*, permiten la detección de resistencia a Fluoroquinolonas y Amikacina⁴⁷.

Amplificación isotérmica mediada por bucle (TB-LAMP; Eiken Chemical, Tokio, Japón): está diseñado para detectar *MTBC* directamente a partir de muestras de esputo. Este es un ensayo manual que requiere menos de 1 hora para realizarse, no requiere instrumentación sofisticada y puede usarse a nivel de centro de salud periférico, dado requisitos de bioseguridad similares a la microscopía de frotis de esputo. TB-LAMP no detecta la resistencia a los medicamentos antituberculosos⁴¹.

El ensayo de lipoarabinomano de flujo lateral (LF-LAM) en orina: es un ensayo de inmunocaptura basado en la detección del antígeno LAM micobacteriano en la orina. Aunque el ensayo carece de S, se puede usar como una prueba rápida, de cabecera y reglamentaria para PVVS, especialmente en casos urgentes donde un diagnóstico rápido de TB es fundamental para la supervivencia del paciente. Alere Determine TB LAM Ag es actualmente la única prueba de LAM en orina disponible comercialmente respaldada por la OMS. Además, se recomienda la prueba de ensayo de LF-LAM basada en biomarcadores (Alere Determine™ TB LAM Ag, EE. UU.) para ayudar a diagnosticar la TB en grupos seleccionados de presuntos pacientes con TB infectados por el VIH; un resultado positivo de LF-LAM se considera confirmación bacteriológica de TB en estos pacientes⁴¹.

III. MARCO TEÓRICO

III.6.3. Otras técnicas de identificación

Identificación basada en inmunocromatografía: se han desarrollado tres ensayos rápidos para diferenciar entre aislados del complejo *Mtb* y micobacterias no tuberculosas (MNT): el BD's MGIT TBc ID, el Tauns' Capilia TB (Japón) y el SD Bioline TB Ag MPT₆₄ Rapid Test (Corea). Los tres son de flujo lateral. El BD y el SD Bioline detectan el antígeno MPT₆₄, mientras que el Capilia detecta el antígeno MPB₆₄; ambas proteínas secretoras son específicas del complejo *Mtb*⁴⁸.

Patho-tb test: desarrollada recientemente, se basa en la filtración de las muestras tratadas seguido de la visualización de los bacilos atrapados en el filtro por un método inmunocromatográfico, usando conjugado de oro coloidal. El sistema consta de tres elementos principales: filtración, descontaminación y realización de la prueba rápida⁴⁸.

Pruebas serológicas: Las pruebas que usan suero como muestra para determinar el estado de salud, son adecuadas para países con recursos limitados porque a menudo requieren equipos fácilmente disponibles, aunque estos no son 100% satisfactorios para la detección de TB. La detección de anticuerpos contra *Mtb* en suero, podría ofrecer resultados rápidos a bajo costo, pero desafortunadamente, los que se disponen actualmente tienen aplicación limitada, debido a la reacción cruzada y baja S. La OMS actualmente no aprueba su uso para el diagnóstico de TB pulmonar ni extra-pulmonar, por lo que se requieren más investigaciones para desarrollar ensayos basados en la respuesta inmune o en el serodiagnóstico y que tengan un desempeño adecuado⁴⁹.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Contexto, tipo de estudio y universo

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo en el período comprendido entre abril 2019-febrero 2020 en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). El universo de estudio estuvo constituido por 233 muestras de esputo procedentes de los PVVS con sintomatología respiratoria y sospecha de TB, los cuales estuvieron ingresados o fueron atendidos en la consulta externa del Hospital de Referencia Nacional de atención al paciente VIH.

IV.2. Criterios de selección

Criterios de inclusión: todas las muestras de esputo a las que se les realizó simultáneamente la BK (utilizando la MF-LED y la MC-ZN) y el cultivo bacteriológico. Además, las muestras que resultaron cultivo positivo a *Mtb* y que fueron cultivos negativos a micobacterias.

Criterios de exclusión: todas las muestras de esputo que se analizaron por una de las dos técnicas de microscopia solamente, las que el cultivo bacteriológico resultó contaminado y las que el resultado del cultivo fue una MNT.

La muestra estuvo constituida por los especímenes que cumplieron los criterios de inclusión (220).

IV.3. Recolección de la información

La información necesaria (nombre y apellidos, número de historia clínica, procedencia, lectura de los frotis por ambas microscopias, resultados del cultivo), se recogió de la revisión de los libros de registros de entrada de muestras y del sistema automatizado BacT/ALERT 3D, del LNRI-TBLM y de la revisión de las historias clínicas (resultados del conteo de linfocitos T CD4+) pertenecientes a las PVVS con muestras de esputo confirmadas bacteriológicamente a *Mtb*, archivadas en el Departamento de Registros médicos del Hospital de Referencia Nacional de atención al paciente VIH, con previa autorización del personal a cargo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.4. Procesamiento de los datos y análisis estadístico

Se recogió la información y se confeccionó una base de datos (ver anexo 1) en el programa Microsoft EXCEL (versión 14.0.4760.1000). Se realizaron las tablas utilizando el mismo programa estadístico. Los resultados se presentaron en tablas de frecuencia y se elaboraron tablas de contingencia entre las variables.

La determinación de la S, E, índice de validez (IV), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y el Índice de Youden (IY) se realizó con el uso del programa estadístico para datos tabulados EPIDAT (EpiData Association, Dinamarca), versión 3.1, con un intervalo de confianza del 95%, se utilizó el cultivo como prueba de referencia. Además se compararon los resultados de MF-LED con los de la MC ZN estratificando por grados de codificación. Para estimar la concordancia (C) entre las técnicas de microscopías se utilizó el índice de kappa (k), según lo que recomiendan Landis y Koch⁵⁰, como se muestra en la tabla:

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

Para relacionar la positividad de la MF-LED con los resultados del conteo de linfocitos T CD4+ se utilizó el programa estadístico Minitab 14.0.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.5. Aspectos éticos

El protocolo de investigación se evaluó y aprobó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de Investigación-IPK (Código de aprobación: CEI-IPK 02-22). Por el tipo de estudio que se realizó no se requirió del consentimiento informado de los pacientes que intervinieron en el estudio. Los nombres de los pacientes involucrados se mantuvieron de manera confidencial. Este estudio formó parte de 2 proyectos de investigación:

- **Proyecto internacional:** Fortalecimiento de las capacidades investigativas, los conocimientos y las acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en Cuba”. Financiación: Instituto de Medicina Tropical, Bélgica. Fecha: 2017-21. Tarea: Mejorar y acelerar el diagnóstico de la TB en La Habana mediante la microscopía de fluorescencia LED (MF-LED) y Xpert MTB/Rif.
- **Proyecto territorial:** Fortalecimiento de las capacidades investigativas, los conocimientos y las acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en Cuba”. Fecha: Enero 2018 – Diciembre 2021 (No. 304). Objetivo 4: Mejorar y acelerar el diagnóstico de la TB en La Habana mediante la microscopía de fluorescencia LED y Xpert MTB/Rif.

IV.6. Limitaciones del estudio

Se encontraron muy pocos estudios que evalúan el rendimiento diagnóstico de la MF-LED y la MC-ZN en PVVS, sobre todo en países de baja carga de TB. Además, no se hallaron estudios en la Región de las Américas que relacionen la positividad de la MF-LED con el recuento de linfocitos T CD4+ en dicha población, lo que conllevó a dificultades en la comparación de los resultados que se obtuvieron en la investigación.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

La MF-LED se desarrolló principalmente para brindar a los países con recursos limitados acceso a los beneficios de microscopía de fluorescencia. El buen desempeño de esta tecnología, llevó a la OMS a recomendar su uso como una alternativa para la MC ZN en laboratorios de alto y bajo volumen de procesamiento de muestras y que esta debe sustituirse de manera escalonada^{8, 51}.

Durante el período de estudio, se analizaron los resultados de 220 muestras de esputo de PVVS con las técnicas de MF-LED y MC-ZN utilizadas para el diagnóstico de TB. Un total de 27 fueron confirmadas bacteriológicamente a *Mtb* y 25 de ellas fueron positivas por la microscopía fluorescente. Es importante señalar que la MF-LED identificó 13 frotis positivos que fueron negativos por la MC-ZN, corroborando la mayor S de las técnicas microscópicas que utilizan tinción con auramina O. Por ambas microscopías se identificaron dos frotis negativos, cuyas muestras tuvieron una codificación 6 en el cultivo, considerada relativamente baja según la categoría descrita en el capítulo de normas y procedimientos del PNCET²⁵, por lo que se puede inferir que quedaron por debajo del límite de detección de ambas técnicas microscópicas. Por otro lado, se identificó un frotis positivo a BAAR por la MF-LED que al cultivar la muestra fue negativa. Este esputo perteneció a un paciente en seguimiento del tratamiento por lo que se infiere que pudo deberse a que los bacilos estaban no viables, teniendo en cuenta que la BK no es capaz de discernir entre bacilos muertos o vivos. (Tabla V.1).

Tabla V.1. Distribución de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED y los de la microscopía convencional ZN en relación con los resultados del cultivo en el medio Löwenstein Jensen. LNRI-TBLM-IPK; abril 2019-febrero 2020.

n= 220		Cultivos Positivos a MTBC			Cultivos Negativos a MTBC			Total
		MC-ZN positivo	MC-ZN negativo	Subtotal	MC-ZN positivo	MC-ZN negativo	Subtotal	
MF-LED	Positivo	13	12	25	0	1	1	26
	Negativo	0	2	2	0	192	192	194
	Total	13	14	27	0	193	193	220

Leyenda: MF – LED: microscopía de fluorescencia LED / MC-ZN: microscopía convencional Ziehl Neelsen / MTBC: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

V. RESULTADOS Y DISCUSION

La identificación de frotis positivos por MF-LED que resultaron negativos por la tinción de ZN se consideró de gran utilidad debido a que estos pacientes dependían de los resultados del cultivo, que demora entre 30 y 60 días para emitir un resultado⁵², y poder entonces comenzar con el tratamiento.

A pesar de la baja S de la BK en comparación con el cultivo, las decisiones diagnósticas y el tratamiento de la TB en países de bajos ingresos se basan en el examen directo de muestras clínicas teñidos con ZN. La estrategia actual en la lucha contra la TB se centra en la detección temprana de individuos infectados y requiere métodos de detección más sensibles y específicos en comparación con la MC-ZN para identificar un mayor número de pacientes positivos que presentan síntomas de TB⁵³.

La tabla V.2 muestra la comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas de microscopía en la lectura de las láminas, según grados de codificación. Por la MF-LED se identificaron 26 (11,8%) láminas positivas a BAAR, 13 más que por la MC-ZN, incrementando el porcentaje de positividad en un 5,9% por esta técnica. Además, por la tinción fluorescente se identificó un mayor número de frotis paucibacilares (12) que por la tinción de ZN (2), 3 frotis positivos a 2++ y 7 positivos a 3+++ contra uno y seis por la tinción ZN, respectivamente. Kelamane cols en 2016⁵⁴, notifican que la MF-LED es más efectiva en muestras paucibacilares que la MC-ZN.

Tabla V.2. Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED con los de la microscopía convencional de ZN según grados de codificación. LNRI-TBLM-IPK; abril 2019- febrero 2020.

n= 220 Microscopía	Láminas negativas	Láminas positivas				
		Paucibacilares	1+	2++	3+++	Total Láminas Positivas
MC-ZN	207	2	4	1	6	13 (5,9%)
MF- LED	194	12	4	3	7	26 (11,8%)

Leyenda: MF-LED microscopía de fluorescencia LED/ MC-ZN: microscopía convencional Ziehl Neelsen

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Las PVVS se consideran una población en la que la microscopía con tinción de ZN en general tiende a producir un bajo rendimiento, las intervenciones que podrían aumentar la S de la microscopía son necesarias⁶. El uso de la MF-LED mejora en gran medida el valor diagnóstico del frotis de esputo, especialmente en pacientes con una baja densidad de bacilos que es probable que no se detecten en los frotis teñidos con ZN⁵⁵.

Al comparar el porcentaje de láminas positivas detectadas por MF-LED (11,8%) en comparación con las identificadas por MC-ZN (5,9%) las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0441$). Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de positividad por la MF-LED (11,8%) y por la MC-ZN (5,9%) fueron inferiores a los reportados por N'Guessan y cols⁵³ en un estudio que se llevó a cabo en el Instituto Pasteur de Francia en el 2013, que utilizó el adaptador ParaLens QBC e informó una positividad para la MF-LED (42%) y para la MC-ZN (40%). Estas diferencias pudieran deberse a que en la presente investigación se estudió un mayor número de pacientes con sospecha de TB (220) que las investigadas por N'Guessan y cols (50 muestras) quienes no sólo incluyeron muestras pulmonares sino también extrapulmonares (contenidos gástricos, aspirados bronquiales, líquidos pleurales) lo que pudo haber influido en los resultados.

La concordancia entre ambas técnicas se consideró buena al obtenerse un índice de k de 0,6382 (intervalo de confianza 0,4603-0,8160). Estos resultados son inferiores a lo que reportaron Martínez Romero y cols⁵⁶ en el LNRI-TBLM del IPK, Cuba, en 2018, en un estudio de validación parcial de esta herramienta que utilizó el mismo adaptador (ParaLens QBC) y obtuvo un índice de k de 0,9174. Las diferencias pudieran estar en correspondencia a que en el estudio de validación se incluyó un menor número de frotis (98), 49 con cultivos positivos a *Mtb* e igual número de láminas con cultivos negativos. Además, en este último estudio se incluyeron muestras de esputo de PVVS y pacientes no VIH.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla V.3 muestra la comparación de los indicadores de desempeño de la MF-LED con los de la MC-ZN, utilizando el cultivo como técnica de referencia. La S que se obtuvo por la MF-LED (92,59%) fue muy superior a la de la MC-ZN (48,15%), con una diferencia de 44,4%. El IY de la técnica fluorescente fue de 0.92, superior a la microscopía convencional (0,48) que se comportó menor que 0,75 que es el límite inferior para que una prueba diagnóstica se considere adecuada. Los parámetros de E, VPP, VPN e IV de las dos técnicas microscópicas tuvieron valores similares.

Tabla V.3. Comparación de los indicadores de desempeño de la microscopía de fluorescencia LED con los de la microscopía convencional de ZN. LNRI-TBLM-IPK; abril 2019- febrero 2020.

Indicadores de desempeño	MF-LED	MC-ZN	Diferencia MF-LED & MC-ZN
Sensibilidad	92,59%	48,15%	+44,4
Especificidad	99,48%	100%	+0,52
VPP	96,15%	100%	+3,85
VPN	98,97%	93,24%	+5,73
Índice de validez	98,64%	93,64%	+5,0
Índice youden	0,92	0,48	

Leyenda: MF-LED: microscopía de fluorescencia LED/ MC-ZN: microscopía convencional Ziehl Neelsen

Los valores de S que se obtuvieron en esta investigación por la MF-LED (92,59%) y por la MC-ZN (48,15%), fueron superiores a la que reportaron Getachew y cols⁵⁷ en el año 2015 en Addis Abeba, Etiopía, quienes incluyeron 178 muestras procedentes de individuos VIH positivos y obtuvieron una S de 62,5% y 29,2%, respectivamente. Estas diferencias pudieran estar dadas a que estos investigadores utilizaron un adaptador diferente (FluoLED), aplicaron una metodología diferente (analizaron muestras directas y concentradas) además de que Etiopía es un país de alta carga de coinfección por VIH y TB que conduce a la naturaleza paucibacilar de las muestras con un impacto directo en el rendimiento de la microscopía.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

La E (99,48%) y VPP (96,15%) de la MF-LED obtenidos en la presente investigación fueron ligeramente inferiores a los de Getachew y cols⁵⁷, que informaron un 100% en ambos indicadores, pero difiere en el VPN (98,97%) que fue superior a lo que reportaron los autores (90,1%) en el estudio ya mencionado en Etiopía. La especificidad de la MF-LED puede estar influida por varios factores subjetivos, entre ellos la experiencia y el entrenamiento del microscopista, así como la naturaleza paucibacilar de las muestras clínicas dentro de determinados grupos poblacionales, como las PVVS⁵⁸.

La diferencia de S entre MF-LED y MC-ZN que arrojó la presente investigación (44,4%) fue superior a lo que reportada por Imaz y cols (20,6%) en una investigación que se realizó en Argentina en el 2017⁹, quienes estudiaron el rendimiento de ambas técnicas en frotis de muestras de rutina provenientes de siete laboratorios de la red, donde 160 pertenecieron a PVVS. Diferencias éstas que pudieran estar en correspondencia, en primer lugar, a que en dicha investigación se utilizaron dos adaptadores (TK-LED y Primostari-LED) diferentes al utilizado en este estudio, además incluyó muestras de pacientes en seguimiento de tratamiento que generalmente son paucibacilares. Por otro lado, tanto en pacientes en seguimiento como en PVVS (en casos avanzados) en muchas ocasiones hay dificultades para obtener especímenes de esputo con buena calidad lo cual pudo influir en la S de la técnica⁵⁹.

La evaluación de la utilidad de MF-LED para el diagnóstico de TB en PVVS ha arrojado resultados dudosos. Albert y cols en 2013¹⁴, en un estudio realizado en Uganda utilizaron tres adaptadores diferentes, y obtuvieron una S para MF-LED, que osciló entre 7,3% y 11,0, ligeramente superior a la MC-ZN (5,5% a 9,2). Sin embargo, en otra investigación realizada en Indonesia por Chaidir y cols⁵⁹ informaron una S mayor por la MC-ZN (90,4% vs 96,3%) versus MF-LED (65,2% vs 58%).

Los valores de S (92,59%) y E (99,48%) que se obtuvieron por la MF-LED en este estudio fueron superiores a lo que reportaron Chang y cols⁵⁸, en Francia 2016, en un meta-análisis en donde se informó una S combinada del 53,0% y una especificidad combinada del 96,1% en PVVS. Las diferencias pudieran estar en relación a que en ese trabajo se incluyeron 12 estudios que procedían de centros de atención de salud periféricos donde pudo haber influido la metodología de estudio, las diferencias en cuanto al procedimiento realizado, así como el dispositivo LED utilizado.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

El mejor rendimiento de la MF-LED en comparación con la MC-ZN, en PVVS que se obtuvo en esta investigación coincide con lo informado por Getachew y cols⁵⁷ en el 2015 en un estudio conducido en Addis Ababa, Etiopía. En este trabajo, se obtuvo un mejor rendimiento de la MF-LED en pacientes coinfectados con VIH en relación a la MC-ZN y también coincide con lo reportado por Bhadade y cols en un estudio similar en la India en el 2015⁶⁰.

La mayor S de la MF-LED en comparación con la microscopía convencional ZN puede deberse a la mayor capacidad de absorción de la auramina O por los ácidos micólicos presentes en la pared de las micobacterias en comparación con el carbol fucsina, lo cual da como resultado la tinción de un mayor número de bacilos. También permite una identificación fácil con un contraste más nítido entre el fondo y los bacilos⁸. El fondo de la lámina, teñido con auramina en la MF-LED, es más brillante, facilitando un mejor enfoque y examen de las láminas con pocos bacilos^{8, 61}. Además de la detección mejorada de casos de TB en muestras con escasos bacilos, estudios previos informan que la microscopía de fluorescencia requiere menos del 25% del tiempo necesario para leer los frotis usando la técnica convencional ZN, lo que se traduce en que un microscopista puede examinar cuatro veces el número de láminas por día con la técnica de fluorescencia. Por otro lado, las tinciones fluorescentes aumentan la sensibilidad hasta en un 10% sobre los frotis teñidos con ZN^{61, 62}.

Los beneficios operativos de los microscopios LED son de gran interés para los laboratorios de países con escasos recursos económicos. Su uso podría mejorar de forma significativa el flujo de trabajo y maximizar la utilización del espacio en el laboratorio, además de los beneficios observados en los climas tropicales relacionados con la ausencia de climatización en espacios cerrados. Por otro lado, el menor costo en relación al microscopio convencional de fluorescencia y los costos por mantenimiento del equipo, la mayor vida útil del diodo y la ausencia de componentes tóxicos, son factores que influirían para el posterior uso de esta herramienta en los laboratorios mejorando así la calidad del diagnóstico por BK¹¹.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla V.4 muestra los resultados del conteo de linfocitos T CD4+ en relación con la positividad de la MF-LED y la MC-ZN de los casos confirmados bacteriológicamente. Para relacionar los resultados positivos por la MF-LED y el conteo de linfocitos T CD4+, se tuvieron en cuenta solo los que tuvieron cultivo positivo a *Mtb*. Se pudo apreciar que la MF-LED identificó BAAR en 16 (59,3%) de los pacientes con menos de 200 células/mL contra 10 (37,0%) por MC-ZN; similar sucedió para los pacientes con linfocitos T CD4+ entre 200 y 500 células/mL con 9 (33,3%) y 3 (11,1%), respectivamente, pero al comparar las proporciones estas no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, al comparar la proporción del número total de láminas positivas que se identificaron por MF-LED (92,6%) con las que se observaron por la tinción de ZN (48,1%), las diferencias si fueron significativas al obtenerse valor de $p=0,0010$. La media de linfocitos T CD4+ para MF-LED y tinción de MC-ZN fueron de 68,1% y 67,3%, respectivamente con una desviación estándar de 132,05 para la tinción fluorescente y 134,02 para la tinción convencional.

Tabla V.4. Distribución de los resultados del conteo de linfocitos T CD4+ en relación con la positividad de la microscopía de fluorescencia LED y tinción de Ziehl Neelsen. LNRI-TBLM-IPK; abril 2019- febrero 2020.

Conteo de linfocitos T CD4+. (Cel/mL)	MF-LED (N=27)		MC-ZN (N=27)		Valor p
	No.	%	No.	%	
Menos 200	16	59,3	10	37,0	0,1733
200 - 500	9	33,3	3	11,1	0,1017
Mas 500	0	0	0	0	-
Total	25	92,6	13	48,1	0,0010
Media	68,1		67,3		
Desviación estándar	132,05		134,02		

El conteo normal de linfocitos T CD4+ en un adulto se encuentra en un rango de 800 a 1050 células por mL (cél/mL), con un espectro de variación (2 desviaciones estándares) de 500 a 1 500 cél/mL. Con menos de 500 células significa que el sistema inmunitario está debilitado como sucede en PVVS. Las PVVS con un conteo absoluto de células CD4+ < 200 cél/mL son clasificados como sida por los Centros para el Control de Enfermedades

V. RESULTADOS Y DISCUSION

de Estados Unidos de América y por la Organización Mundial de la Salud y están en riesgo de adquirir infecciones oportunistas como la TB⁶³.

La figura V.2 muestra la relación de los resultados del conteo de linfocitos T CD4+ con la positividad de la MF-LED según grados de codificación. Es importante señalar que la MF-LED detectó bacilos en los frotis de las PVVS con recuento linfocitos T CD4+ por debajo de 50 cél/mL (con un mínimo de 23,0 cél/mL en frotis paucibacilares, de 25,0 cél/mL en frotis positivos a 1+ y de 24,0 cél/mL en frotis positivos a 3+++). Sin embargo, en dos de los casos confirmados con TB por cultivo la MF-LED no detectó BAAR. Se trató de pacientes con conteo de linfocitos T CD4+ con un mínimo de 35,0 cél/mL, lo cual al analizar los resultados del cultivo de estos pacientes ambos presentaron codificación 6 (6 – 24 BAAR en 4 líneas recorridas), considerada relativamente baja según el capítulo de normas y procedimientos del PNCETB²⁴ de Cuba, esto pudiera deberse a que el número de bacilos en la muestra estuvo por debajo del límite de detección de la técnica fluorescente. Existen otros factores subjetivos que pudieran estar relacionados, entre ellos, que la muestra no estuviera homogéneamente distribuida en la lámina y el observador no coincidiera al observar la lámina con la línea donde estuvieran los bacilos, por otro lado, cuando la muestra es muy paucibacilar es difícil identificar bacilos en el frotis, lo cual depende de la experiencia del observador.

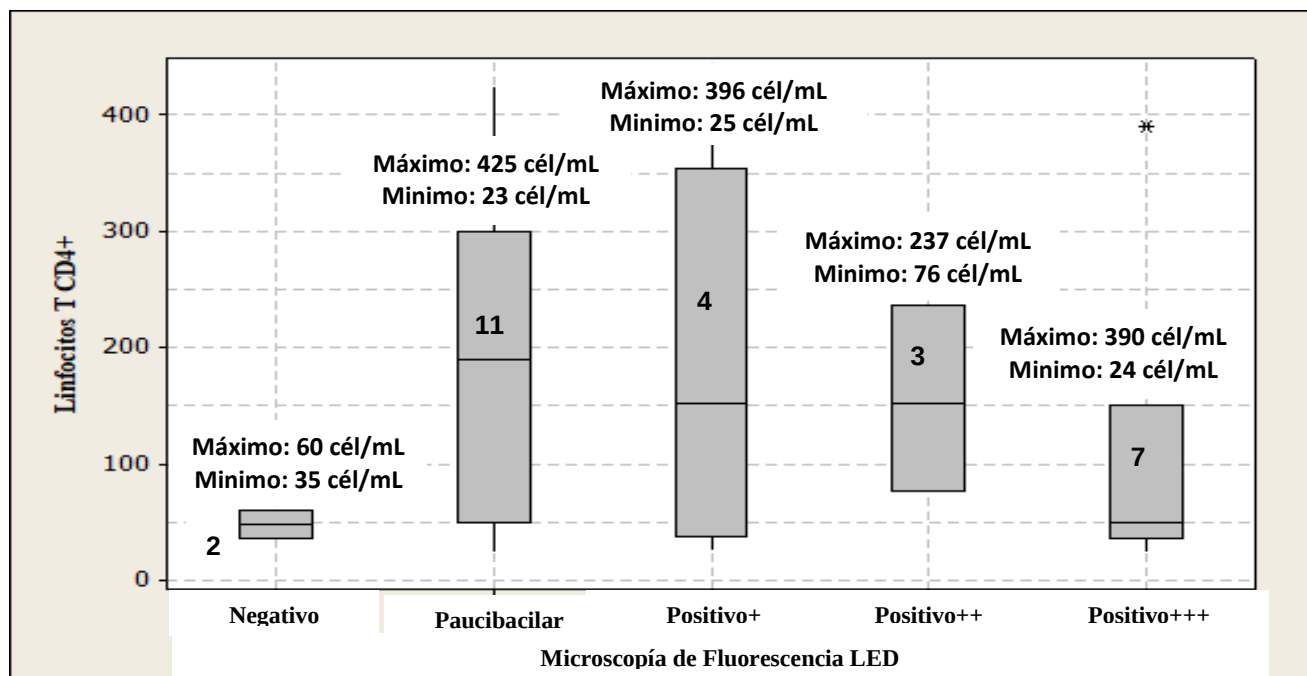


Figura V.2. Relación de los resultados del conteo de linfocitos T CD4+ con la positividad de la MF-LED según grados de codificación. LNRI- TB- IPK; abril 2019- febrero 2020

En la literatura consultada sólo se encontró un estudio donde se relacionaron los resultados de la lectura de la MF-LED con los del conteo de linfocitos T CD4+. Este trabajo se realizó por Albert y cols¹⁴ en Uganda 2013, incluyó 627 pacientes y utilizaron tres adaptadores diferentes (Fraen, AFTER™, Lumin™). Sin embargo, los autores no tuvieron en cuenta los grados de codificación (como en este estudio), solo lo relacionaron con la S, la cual fue más baja en pacientes con recuentos de linfocitos T CD4+ con menos de 100 células/mL.

El mayor número de casos de TB se observaron en los pacientes con un recuento de linfocitos T CD4+ con menos de 200 células/mL, lo que coincide con lo expresado por otros autores. En general, la TB puede ocurrir en cualquier etapa de la enfermedad del VIH y con cualquier recuento de CD4+. Sin embargo, así como el recuento de células CD4+ disminuye, aumenta la incidencia de la TB⁶⁴.

Dados los resultados obtenidos en este trabajo utilizando el adaptador ParaLens QBC, la MF-LED puede constituir una alternativa de la MC-ZN para la detección de micobacterias, siendo de gran utilidad en los grupos de riesgo, tales como las PVVS, que por su estado inmunológico con frecuencia son BK negativa utilizando la MC-ZN.

VI. CONCLUSIONES ☞

- ❖ El mayor rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED sugiere que puede ser utilizada como alternativa de la microscopia convencional de ZN en el LNRI-TBLM del IPK.
- ❖ Contar con una técnica de microscopía más sensible permite incrementar detección de casos con TB pulmonar BK (+) en PVVS, sobre todo en los pacientes con linfocitos T CD4+ bajos, y evitar las complicaciones graves o el desarrollo de las formas diseminadas de la enfermedad, que ensombrecen su pronóstico y calidad de vida.

VII. RECOMENDACIONES

- ❖ Evaluar el desempeño de la microscopía de fluorescencia LED en muestras extrapulmonares.
- ❖ La divulgación de estos resultados permitirá la introducción de esta técnica en laboratorios regionales del país y contribuirá al avance hacia la eliminación de la enfermedad, en el marco de la Estrategia Mundial de la Eliminación de la TB para el año 2035.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva: WHO; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [citado 25 Jun 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publication/i/item/9789240037021>.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva: WHO; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [citado 25 Jun 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publication/i/item/9789240013131>.
3. World Health Organization. Global Tuberculosis report. France: WHO; 2019. WHO/CDS/TB/2019.15. Disponible en: <https://www.who.int/publication/i/item/9789241565714>.
4. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: Manual de actualización de la baciloscopía[Internet]. Lima: ORAS - CONHU; 2018[citado Feb 27 2020]. Disponible en: <http://www.orasconhu.org>.
5. Vallego VP, Rodríguez JC, Searle MA, Farga CV. Ensayo Xpert/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir[Internet]. 2015[citado 27 Feb 2020]; 31: 127-31. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482015000200010&lng=es.
6. World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis[Internet]. Geneva: WHO; 2011[citado 25 Abr 2021]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44602/9789241501613_eng.pdf;jsessionid=CA91CDE3FB1A687F361976DF23C07DEC?sequence=1
7. Imaz M, Allassia S, Aranibar M, Gunia A, Susana Poggi S, Togneri A. Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina. Bioméd[Internet].2017[citado 25 Abr 2021]; 37(2):164-74 doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3276>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Goel S, Pandey R, Kumar M, Kankaria A, Khaneja R. Impact of introducing light-emitting diode fluorescence microscopy services for diagnosis of pulmonary tuberculosis under Revised National Tuberculosis Control Program India. Lung India: Official Organ of Indian. Chest Society. 2018 [acceso: 23 Feb 2021]; 35(4): 307–311. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6034383/pdf/LI-35-307.pdf>.
9. Imaz MS, Allassia S, Aranibar M, Gunia AM, Poggi S, Togneri AM et al. Training tuberculosis laboratory workers in LED-fluorescence microscopy: experience learned in Argentina. Rev Salud Pública[Internet]. 2018[citado 2 Abr 2021]; 20 (1): 110-16. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642018000100110&lng=en.
10. 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[Internet]. 2011[citado 2 Abr 2021]; 6(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811622>.
11. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275324479>.
12. Díaz Rodríguez R, Lemus Molina D, Martínez Romero MR. La tuberculosis en Cuba en tiempos de COVID-19: ¿retroceso en su plan de eliminación? Rev cubana Med Trop[Internet]. 2020 Dic [citado 2022 Feb 27]; 72(3): e585. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300014&lng=es. Epub 08-Feb-2021.
13. Pedrera Pozo N. (2018): Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de Micobacterias en Cuba. Febrero - Julio 2018. [Tesis de terminación de especialidad]. La Habana: Instituto Pedro Kourí.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

14. Albert H, Nakiyingi L, Sempa J, Mbabazi O, Mukkada S, Nyesiga B, et al. Operational implementation of LED fluorescence microscopy in screening tuberculosis suspects in an urban HIV clinic in Uganda. PLoS One[Internet]. 2013[citado Feb 21 2021]; 8:e72556. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3765165/pdf/pone.0072556.pdf>.
15. González Tapia M. La tuberculosis pulmonar, enfermedad reemergente en Cuba. Rev electrón Dr. Zoilo E. Marinelo E[Internet]. 2014 [citado: 24 Ene 2020]; 39(1). Disponible en: <http://revzoilomarinello.sld.cu/index.php/zmv/article/view/305>.
16. Cartes Parra JC. Breve historia de la Tuberculosis. Rev Medica Costa Rica y Centroamérica. 2013 [acceso: 24 Ene 2020]; 70(605):145-50. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc131z.pdf>.
17. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2015. [acceso: 24 Ene 2021]. p: 2787-818. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/mandell-douglas-and-bennetts-principles-and-practice-of-infectious-diseases/oclc/889211235>.
18. Paneque Ramos E, Rojas Rodriguez LY, Pérez Loyola M. La Tuberculosis a través de la historia: un enemigo de la humanidad. Rev haban méd[Internet]. 2018[citado: 24 Ene 2020];17(3). Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2058>.
19. 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. [acceso: 24 Ene 2018]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272644/9789241514101-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
20. Agredo F, Osorio L. Cobertura y fidelidad de la prueba Xpert MTB/RIF™ en un área de alta carga de tuberculosis pulmonar en Colombia. Biomédica[Internet]. 2020 [citado: 29 Jul 2020]; 40:626-40. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5272>.
21. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2019. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2020. [acceso: 24 Ene 2020]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52815>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

22. Organización Panamericana de la Salud. Datos claves de la tuberculosis[Internet]. Octubre 2021[citado 16 Ene 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis>.
23. Organización Panamericana de la Salud. Informe de reporte de tuberculosis en las Américas[Internet]. 2020[citado 23 Oct 2021]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55047>.
24. Torres Duque CA, Fuentes Alcalá ZM, Rendón A, Batista G et al. Hoja de ruta para la eliminación de la tuberculosis en Latinoamérica y el Caribe. Rev Soc Españ de Neum y Cirug torácica[Internet]. 2018[citado 25 Sep 2021]; 54(1):7-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/j.arbres.2017.07.004>.
25. 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[Internet]. 2014 [citado 27 may 2020]. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/programa_2015.
26. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana: MINSAP; 2021. [acceso: 27 Ene 2022]. Disponible en: <https://files.sld.cu/bvscuba/files/2021/08/Anuario-Estadistico-Espa%C3%B1ol-2020-Definitivo.pdf>.
27. Mederos Cuervo LM, Reyes Pérez A, Valdés Alonso L, Rodríguez Delgado F, Sardiñas Aragón M, Martínez Romero MR. Coinfección por *Mycobacterium malmoeense* y *Mycobacterium tuberculosis* en paciente con el síndrome de inmunodeficiencia humana. Rev Peru Med Exp Salud Pública[Internet]. 2014[citado 26 Sep 2021];31(4):788-92. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000400027.
28. Peralta I, Cabrera MC, Gutiérrez MJ. Coinfección TB/VIH: una amenaza para los programas de control de ambas enfermedades. Medicent Electrón[Internet]. 2015[citado 26 Sep 2021];19(3):160-2. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432015000300005&lng=es.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

29. Organización Panamericana de la Salud. Coinfección TB/VIH. Guía Clínica Regional. Washington, D.C: OPS[Internet]. 2017[citado 11 Oct 2021]. Disponible en: <http://iris.paho.org>.
30. Ríos González CM, Verón Mellid FG. La Tuberculosis e infección por VIH/sida: una visión panorámica. Rev Científ [Internet]. 2017[citado 11 Oct 2021]; 15(2):32-4. ISSN-E 2313-7843. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/324731497>.
31. Ramírez M, Menéndez A, Noguerado A. Tuberculosis extrapulmonar. Rev Esp Sanid Penit[Internet]. 2015[citado 25 Oct 2021]; 17: 3-11. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1575-06202015000100002.
32. Arias F, Gutiérrez R, Gallardo M, et al. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Chile: Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia; 2019. [acceso: 19 Mar 2022]. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/Manual%20de%20procedimientos%20t%C3%A9cnicos%20para%20el%20diagn%C3%B3stico%20bacteriol%C3%B3gico%20de%20la%20TBC.pdf>.
33. Practical Handbook of Microbiology. 4th ed. Lorrence H, Green and Emanuel Goldman editors. 2021. [acceso: 19 Mar 2021]. p. 443-4. Disponible en: <https://www.routledge.com/Fermentation-Microbiology-and-Biotechnology-Fourth-Edition/El-Mansi-Nielsen-Mousdale-Carlson/p/book/9781138581029>.
34. Viale MN, Zumárraga MJ, Araújo FR, Zarraga AM, Cataldi AA, Romano MI et al. La genómica de las micobacterias. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2016, 35 (1): 215-27.
35. 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>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

36. Jaramillo Grajales M, Torres Villa R, Pabón Gálvez E, Marín Muñoz P, Barrientos K, Montaguét Y et al. Diagnóstico de tuberculosis: desde lo tradicional hasta el desarrollo actual. Med lab[Internet]. 2015[citado 28 Nov 2021]; 21(7/8): 311-32. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-907779?lang=es>.
37. Fajardo Dubón GE, Reyes Galo OM, Varela Valladares DE, Medina Ramírez KF et al. Tuberculosis pulmonar y métodos diagnósticos laboratoriales actuales. Rev. Fac Cienc Méd Honduras 2018: 35-44. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-994514>.
38. Camacho Badilla K, Camilo de Amarante E, Martínez de Cuellar C, Castillo Bejarano J, Mascareñas De Los Santos, López- López A, et al. Tuberculosis en América Latina y su impacto en pediatría. Rev Latin Infect Pediatr. 2020 [acceso: 19/03/2021]; 33 (2): 69-70. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2020/lip202b.pdf>.
39. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana, Cuba: Anuario Estadístico de Salud; 2017. ISSN: 1561-4433.
40. Pérez del Molino ML. Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. Elsevier[Internet]. 2018[citado 22 Nov 2021]. Disponible en: <http://www.elsevier.es>.
41. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: Diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
42. López Jácome LE, Hernández Durán M, Colín Castro CA, Ortega Peña S, Cerón González G, Franco Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad. 2014 [acceso: 20 Agos 2021]; 3(1):10-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48632>.
43. 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[Internet]. 2015[citado 22 Dic 2021]; 21(1):78-9. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582015000100011.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

44. Martinez MR, Sardiñas M, Garcia G, Mederos LM, Díaz R. Evaluation of BacT/ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. JTR[Internet]. 2014[citado 22 Dic 2021]; 2:59-64. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/317516892_Nuevas_herramientas_para_el_diagnostico_de_la_tuberculosis.
45. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTF/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva: World Health Organization; 2017 (WHO/HTM/TB/2017.04). Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO.
46. Arias F, Herrera T. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir[Internet]. 2016[citado 22 Dic 2021]; 32: 254-9. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482016000400007.
47. World Health Organization. Planning and budgeting tool for TB and drug resistant TB testing: user guide. Geneva: WHO; 2021. [acceso: 22 Ene 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/349949>.
48. Nour Neamatollahi A, Davar Siadat S, Yari S, Hadizadeh Tasbiti A, Ebrahimzadeh N, Vaziri F et al. A new diagnostic tool for rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Saudi J Biol Sciences[Internet]. 2018[citado 22 Dic 2021]; 25(3):418-25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29686505/>.
49. López Romero W, Flores Valdez M, Camacho Villegas T. Métodos actuales empleados para el diagnóstico de tuberculosis y su eficacia en diversos entornos clínicos. Rev Sal Jal[Internet]. 2019[citado 22 Dic 2021]; 6(3): 173- 4. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2019/sj193e>.
50. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33 (1): 159-74.
51. Whitelaw A, Peter J, Sohn H, Viljoen D, Theron G, Badri M et al. Comparative cost and performance of LED-microscopy in HIV-TB co-infected patients. ERJ Express[Internet]. 2011[citado 22 Dic 2021]; 38(6):1393-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5454486/>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

52. Vallego VP, Rodríguez JC, Searle MA, Farga CV. Ensayo Xpert/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir. 2015 [acceso: 19 Ene 2022] 31:127-31. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482015000200010&lng=es.
53. 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[Internet]. 2013[citado 22 Dic 2021]; 1 (3): 40-3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4236/jtr.2013.13008>.
54. Kelamane S, Mispah P, SandhyaS, Rao S. Comparative study of ZN Microscopy and LED Fluorescent microscopy along with solid culture for the diagnosis of pulmonary Tuberculosis. J Cont Med A Dent[Internet]. 2016 [acceso: 19 Ene 2022]; 4 (3):14-9. Disponible en: <http://www.jcmad.com/admin/abstract/a433.pdf>.
55. Gizaw N, Abera A, Sisayd S, Destab K, Kreibiche S, Gerwing-Adimaf L et al. The yield of Auramine O staining using led microscopy with bleach treated sputum samples for detection of pulmonary tuberculosis at St. Peter tuberculosis specialized hospital, Addis Ababa, Ethiopia. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis[Internet]. 2020[citado 14 Dic 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6939099/>.
56. Martínez Romero MR, Pedrera Pozo N, García León G, 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 Ciencias Biol[Internet]. 2021 [acceso: 14 Dic 2021]; 52(3):259-66. Disponible en: <https://revista.cnice.cu/index.php/RevBiol/article/view/962>.
57. Getachew K, Abebe T, Kebede A, Mihret A, Melkamu G. Performance of LED Fluorescence Microscopy for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in HIV Positive Individuals in Addis Ababa, Ethiopia. Hindawi Publishing Corporation Tuberculosis Research and Treatment[Internet]. 2015[citado 24 Dic 2021]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/794064>.
58. Chang EW, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. Eur Respir J [Internet]. 2016[citado 24 Nov 2021]; 47: 929–37. Disponible en: <https://erj.ersjournals.com/content/47/3/929>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

59. 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[Internet]. 2013[citado 24 Feb 2022];8(4):e61727. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23620787/>.
60. Bhadade A, Mehta P, Kanade S, Nataraj G. Utility of light-emitting diode microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV infected patients. Int J Mycobacteriol 2015; 4(1):31-5. doi: 10.1016/j.ijmyco.2015.01.002.
61. Thapa B, Reza LW, Kumar AMV, Pandey A, Satyanarayana S, Chadha S et al. Light Emitting Diode Fluorescence Microscopy increased the detection of smear-positives during follow-up of Tuberculosis patients in india: program implications. Bio Med Central Res Notes[Internet]. 2015[citado 14 Mar 2022]; 8: 596. Disponible en: <https://bmcrsnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-015-1584-z>.
62. Nwofor A, Lawson L, Gambo A, Obasanya O, Meshak P, Jilang T et al. Optimising *Mycobacterium tuberculosis* detection in resource limited settings. BMJ Open[Internet]. 2014[citado 22 Ene 2022]; 4(3):e0040934. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24589822/>.
63. Noda Albelo AL, Tallet LA, Pérez Lastre JE, Cañete Villafranca R. Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. Rev Cuban Medic[Internet]. 2013 [acceso: 19 Feb 2022]; 52(2):118-27. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232013000200005
64. Vásquez Y, Ilarraza J, Ruiz N, Benitez M, Moy F. Coinfección tuberculosis y VIH/sida, en el Hospital Militar “Dr. Carlos Arvelo”. Bol Venez Infectol[Internet]. 2017[citado 5 Mar 2022]; 28(1):66-74. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/878234/08-vasquez-y-66-74>.

IX. ANEXOS ☞

Anexo 1. Base de datos de los casos con sospecha de TB que participaron en el estudio

No. muestra	Nombre y apellidos	Conteo Linfocitos T CD4+	Lectura BK en cruces		Resultados del cultivo
			Ziehl Neelsen	MF- LED	

IX. ANEXOS

Procedimiento que se utilizó en el LNRI-TBLM-IPK para realizar la BK

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

Preparación del extendido:

- Muestras de esputo se utilizó la partícula más purulenta de la muestra para el extendido, usando un asa desechable de 5 mm de diámetro. Se realizaron tres extendidos: dos en ovalo (de 2 cm de largo por 1 cm de ancho) y el tercero que ocupó las 2/3 partes de la lámina.

Secado del extendido: se dejó secar al aire y luego se fijó mediante el pasaje del mismo a través de una llama de 3 a 5 veces durante 3 a 4 segundos cada una.

❖ A. Tinción fluorescente

Procedimiento:

1. Se cubrió el frotis con el colorante de auramina O al 0,1% filtrada y se dejará reposar durante 20 minutos como mínimo.
2. Se aclaró el frotis con agua del grifo y se escurrirá la lámina.
3. Se cubrió el frotis con el decolorante (alcohol- ácido 5%) y se dejará reposar durante 1 o 2 minutos.
4. Se aclaró el frotis con agua del grifo y se escurrirá.
5. Se cubrió el extendido con la solución de permanganato de potasio (tinción de contraste) y se dejará actuar durante 1 minuto.
6. Se aclaró el frotis con agua del grifo y se escurrirá la lámina.
7. Se dejó secar al aire libre y al abrigo de la luz.
8. Se examinó el frotis utilizando el adaptador ParaLens de QBC.

IX. ANEXOS

- **Lectura de los extendidos por microscopia LED y por microscopia de fluorescencia convencional:** se realizó en cruces (100 campos ópticos), como se describe ^{4, 41}.

Informe	Lectura con lente 40 X
No se observan BAAR	0 BAAR/1 línea
Paucibacilar	1 – 19 BAAR/1 línea (Nº exacto de BAAR)
Positivo +	20 – 199 BAAR/ 1 línea
Positivo ++	20 – 50 BAAR/ campo óptico promedio
Positivo +++	Más de 50 BAAR / campo óptico promedio

❖ B. Tinción de ZN

Procedimiento:

- Se adicionó fucsina básica de ZN, se aplicó calor hasta la emisión de vapores, se dejó actuar por 5 minutos y luego se enjuagó con agua.
- Se decoloró con alcohol ácido al 3% por 2 minutos y luego se enjuagó con agua.
- Se adicionó el azul de metileno al 0,1% por 45 segundos a 1 minuto y luego se enjuagó con agua del grifo.
- Se dejó secar al aire libre.
- Se examinó el frotis utilizando el microscopio Axiostar plus (Carl Zeiss, Alemania).

IX. ANEXOS

- **Lectura de los extendidos por microscopía de campo brillante en cruces** (100 campos ópticos), según como se describe.

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

Procesamiento de las muestras para el cultivo

A las muestras no estériles se le realizó de descontaminación con el Método de Petroff modificado con solución salina²⁵.

Por cada 2 mL de muestra, se adicionarán 2 mL de NaOH al 4%.

- Se homogenizó (vórtex).
- Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agitó en ocasiones.
- Posteriormente se centrifugó a 3000 gravedades durante 15 minutos (min.) y luego se decantó el sobrenadante.
- Se agregó 15 mL de solución salina fisiológica y se centrifugó de nuevo a 3 000 gravedades durante 15 min y se decantó el sobrenadante.
- Se resuspendió el sedimento en 2 mL de solución salina fisiológica.

Inoculación en el cultivo sólido Löwenstein Jensen (LJ)

1. Se inoculó 0,2 mL en dos tubos de LJ y se incubó a 37°C.
2. Se realizó la lectura semanal por ocho semanas. En los tubos donde se observó algún crecimiento se le realizó la tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.
3. En el caso que la tinción resultó positiva a BAAR se realizó la codificación del cultivo, según el número de colonias presentes en el cultivo, como se muestra en la tabla.

IX. ANEXOS

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

Procedimiento para realizar la tira SD BIOLINE ¹⁵.

Procedimiento de la prueba: se adicionarán 100 µL de la suspensión bacteriana o fluido de condensación en la ventana de la tira para inocular la muestra y se esperarán 15 minutos para dar el resultado final.

Interpretación de la prueba

- ✓ Resultado negativo: la presencia de una sola banda (banda control).
- ✓ Resultado positivo: la presencia de las dos bandas (banda control y la banda en la sección derecha de la ventana).
- ✓ Invalidación de la prueba: cuando no aparece ninguna banda o cuando no aparece la banda control, en este caso se repitió la prueba.