



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Departamento de Bacteriología - Micología

**Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de
Micobacterias en Cuba. Febrero - Julio 2018**



**Trabajo de Tesis para optar por el título de Médico Especialista de Primer
Grado en Microbiología.**

AUTOR: Dra. Nancy Pedrera Pozo

La Habana

2018



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Departamento de Bacteriología - Micología

**Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de
Micobacterias en Cuba. Febrero - Julio 2018**

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Médico Especialista de Primer
Grado en Microbiología**

AUTOR: Dra. Nancy Pedrera Pozo

TUTORES: Dra. María Rosarys Martínez Romero, MsC

Lic. Raúl Díaz Rodríguez, DrC

La Habana

2018

A mis padres y esposo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero darles las gracias a todas las personas que de una manera u otra han contribuido en mi formación como residente de Microbiología y en la realización de esta investigación, en especial:

A mis padres, mis hermanos por ser lo más grande y quererme todos incondicionalmente.

A mi familia de casa, mi esposo por su apoyo y estar siempre presente, por todo su amor, cariño y comprensión. A mi hija Isbeidis para quien siempre he querido ser un ejemplo a seguir.

A mi suegra por incentivar me a llevar a cabo los estudios que recién concluyo.

A mi tutora María Rosarys por haberme brindado sus conocimientos, su apoyo incondicional, tantas horas de trabajo y desvelo. Realmente creo que sin ella no hubiese sido posible esta investigación.

A mi tutor Raúl por tanto empeño, profesionalidad y por las horas dedicadas de su precioso tiempo.

A Misle y Grechen por brindarme su amistad y gran ayuda durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

A mi cuñado Manso por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A mis amigos de siempre, mi familia de estos 3 años de residencia, en especial a Mercy, Yeny y Yuly por haber estado siempre conmigo.

A todos los especialistas y profesionales del sector que amablemente me brindaron sus opiniones.

Muchas Gracias...

La microscopía de fluorescencia LED (MFL) fue recomendada por la Organización Mundial de la Salud en 2010. El objetivo fue evaluar la MFL para el diagnóstico de micobacterias. Se realizó un estudio descriptivo, transversal en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI-TBLM) del Instituto “Pedro Kouri”, desde febrero a julio del 2018. Para la comparación se analizaron 98 frotis (se incluyeron 49 láminas con cultivo positivo a micobacterias y 49 con cultivo negativo) y para la evaluación de la técnica se analizaron 208 frotis de muestras pulmonares de casos sintomáticos respiratorios. Se compararon los resultados de la MFL con la microscopía de campo brillante (MCB) y la microscopía de fluorescencia convencional (MFC). Por ambos métodos fluorescentes aumentó la positividad en 13,3% en relación con la MCB. La concordancia entre MFL y MFC fue muy buena ($k=0,8711$) y entre MFL- MCB buena ($k= 0,6773$). De los 208 frotis analizados, la MFL y MFC identificaron 28 (13,5%) casos positivos a micobacterias, 10 más que la MCB (18; 8,6%). Las sensibilidades de MFL, MFC y MCB fueron de 81,82%; 75,76% y 54,55%, respectivamente. El índice de Youden mayor se obtuvo por la MFL (0,81). La MFL tuvo la mayor sensibilidad entre todas las técnicas utilizadas para la identificación de micobacterias en pacientes con sintomatología respiratoria. La MFL puede ser una alternativa diagnóstica a la tinción de ZN en el LNRI-TBLM, para el diagnóstico en pacientes con sospecha de infección por micobacterias, sobre todo en personas que viven con VIH.

TB: Tuberculosis

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

ZN: Ziehl Neelsen

BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente

BK: Baciloscopía

MFL: Microscopía de fluorescencia LED

MFC: Microscopía de fluorescencia convencional

MCB: Microscopía de campo brillante

MNT: Micobacterias no tuberculosas

ID: Indicadores de desempeño

C: Concordancia

S: Sensibilidad

E: Especificidad

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

LJ: Löwenstein Jensen

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

LED, siglas en inglés: Diodo emisor de luz

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR, siglas en inglés: Reacción en cadena de la polimerasa

PNCTB: Programa Nacional de Control de la Tuberculosis

RIF: Rifampicina

INH: Isoniazida

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

	Páginas
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	5
III. MARCO TEÓRICO	6
III.1 Breve historia de la tuberculosis.....	6
III.2 Taxonomía y clasificación de las micobacterias.....	7
III.3 Morfología y características de las micobacterias.....	7
III.4 Coinfección de tuberculosis con VIH/sida.....	9
III.5 Epidemiología de la tuberculosis.....	10
III.5.1 Situación epidemiológica en las Américas.....	10
III.5.2 Evolución de la tuberculosis en Cuba.....	11
III.6 Diagnóstico de las micobacterias.....	12
III.6.1 Diagnóstico convencional.....	12
III.6.2 Diagnóstico no convencional.....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20
IV.1 Definición de Universo y muestra.....	20
IV.2 Procesamiento de las muestras.....	20
IV.3 Procesamiento de las muestras para el cultivo.....	22
IV.3.1 Método de Petroff modificado con solución salina.....	22
IV.3.2 Elaboración del medio de cultivo Lowestein Jensen.....	23
IV.3.3 Cultivo en medio líquido (Sistema automatizado BacT/ALERT 3D).....	24
IV.3.4 Procedimiento para realizar la tira SD Bioline.....	24
IV.4 Procesamiento de los datos.....	25
IV.5 Análisis de la información.....	25
IV.6 Aspectos éticos.....	26

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. RECOMENDACIONES.....	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
IX. ANEXOS.....	54

La tuberculosis (TB) a través de la historia se ha denominado como consunción, tisis, mal del rey, peste blanca o plaga blanca (1). Constituye una de las principales enfermedades infecciosas en el mundo y es responsable de más de 2 millones de muertes y 8 millones de nuevos casos cada año (1). El agente causal de la TB es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Este patógeno casi siempre ataca los pulmones, pero puede infectar cualquier parte del organismo como los riñones, el intestino, la pleura, la columna vertebral y el cerebro, por lo que si no se diagnostica y trata de forma adecuada, puede ser mortal (2).

La TB es la infección oportunista más común en los pacientes infectados por el VIH y la causa de muerte más frecuente en los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), que representan una de cada cuatro muertes relacionadas con el VIH (3).

La estrategia de control más importante para la TB, es la detección temprana y el apropiado tratamiento de los casos infecciosos (1) (2). Los objetivos específicos establecidos en la estrategia Fin a la TB incluyen una reducción en las muertes por esta enfermedad en un 90% y la reducción del 80% de la incidencia para 2030, en comparación con 2015. Para lograr estos objetivos se requiere la provisión del cuidado y prevención de la TB dentro del contexto más amplio de cobertura universal de salud, acciones multisectoriales para abordar las cuestiones de determinantes tanto sociales como económicas, consecuencias de la TB, así como los avances tecnológicos en 2025, para que la incidencia pueda disminuir más rápido que las tasas alcanzadas históricamente. En 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) notifica 6,3 millones de casos nuevos, 1,3 millones de personas no infectadas por el VIH fallecen por esta enfermedad y cerca 374 000 muertes entre los VIH positivos (4).

El laboratorio es un componente esencial en el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control de la TB. En las últimas décadas se desarrollan múltiples

métodos de diagnósticos más rápidos y sensibles, no obstante el cultivo, es aún la prueba de oro para el diagnóstico de la TB activa, especialmente en países de escasos recursos (5).

La baciloscopía (BK) juega un papel importante en el diagnóstico temprano de las infecciones por micobacterias pues permite identificar la fuente de infección en la comunidad y es útil en la búsqueda de casos de TB (6). Sin embargo su sensibilidad (S) oscila entre el 22 y el 43% para un solo frotis y se documenta que puede alcanzar hasta el 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). La sensibilidad es aún menor en la población pediátrica y en los pacientes VIH/sida que generalmente presentan una menor cantidad de bacilos en la muestra (7).

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 micobacteriano. Por ello en los últimos decenios se desarrollan nuevos métodos de diagnóstico que intentan superar las limitaciones de los métodos convencionales de diagnóstico (8).

La MFC con auramina O es una prueba más rápida y sensible que la tinción de ZN, además, la calidad de la tinción puede ser más fácil de controlar, ya que la calidad del polvo de auramina comercial es menos variable que la de la fucsina básica. Como no se necesita un objetivo de inmersión para observar los bacilos, no es necesario utilizar el aceite de inmersión ni el xileno requerido con el ZN, que son costosos y pueden causar daños a los objetivos por mala gestión o deficiente calidad (9).

Los microscopios fluorescentes tienen como desventaja que utilizan lámparas de vapor de mercurio las cuales son relativamente más caras, tienen una vida útil corta, requieren un suministro de electricidad confiable y las bombillas de reemplazo pueden ser difíciles de obtener (3). Su aplicación mejora la S entre

un 5 y un 10% para la detección de micobacterias en la muestra y reduce el tiempo de lectura, lo que disminuye la carga de trabajo en el laboratorio (10), sin embargo es muy costosa, por lo que no se recomienda su uso en los países con escasos recursos, además la fuente de luz es casi siempre de mercurio, con un costo elevado y una vida útil de 200-300 horas (11).

En la última década aparece en el mercado una nueva generación de lámparas conocidas como diodo emisor de luz (*Light Emitting Diodes*: LED, por sus siglas en inglés), las cuales tienen un bajo costo de producción, emiten luz en casi cualquier tipo de longitud de onda y tienen una vida media de alrededor de 20 000-30 000 horas. La MFL es más sensible y rápida que la MCB (11). Se recomienda en el año 2010 por la OMS como reemplazo de la MFC en todos los laboratorios donde todavía se utiliza la misma y que la MFL se introduzca por etapas como una alternativa a la microscopía de luz convencional en todos los países (12) (13).

Para poder alcanzar la eliminación de la TB, tanto en los países de alta como en los de baja tasa de notificación de TB, es indispensable intensificar y unir los esfuerzos en la lucha contra esta enfermedad, con la adopción de estrategias y el establecimiento de prioridades de acuerdo con la epidemiología y los sistemas de salud locales (14).

Justificación: Cuba es uno de los países con más baja tasa de TB en la región de las Américas, esto unido al Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (PNCTB) y al sistema de salud fortalecido, está en condiciones de poder alcanzar la eliminación de la enfermedad como un problema de salud. Con el fin de alcanzar un progreso sostenido hacia la eliminación de la TB, es necesario adaptar las estrategias actuales de control de la TB. Uno de los pilares para lograr este propósito sería mejorar la calidad del diagnóstico de la TB, utilizando métodos para aumentar la sensibilidad y rapidez en la detección de casos, sobre todo en los pacientes con algún deterioro del sistema inmunológico,

donde generalmente la BK es negativa, como la microscopía de fluorescencia LED lo que motivó la realización de este estudio en el LNRI-TBLM del Instituto “Pedro Kouri”.

PREGUNTA DE LA INVESTIGACIÓN:

¿La implementación de la microscopía de fluorescencia LED permitirá mejorar la sensibilidad y calidad del diagnóstico por BK en el LNRI-TBLM?

II. OBJETIVOS

- ❖ Comparar la microscopia de fluorescencia LED con las técnicas microscópicas convencionales utilizadas en el diagnóstico de las micobacterias.
- ❖ Evaluar la microscopia de fluorescencia LED como prueba diagnóstica de las micobacterias en muestras de pacientes con sintomatología respiratoria.

III.1 Breve historia de la tuberculosis

Durante varios años, se considera que *Mtb* evoluciona a partir del *M. bovis* (agente causante de la TB bovina) mediante la adaptación del patógeno animal al hospedero humano. No obstante, nuevas teorías establecen que los miembros del complejo *Mtb* evolucionan a partir de un ancestro común (15).

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 Neolítico (16).

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 especializados (17).

La era moderna de la TB comienza en 1946 con la demostración de la eficacia de la estreptomina. 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 multimedamentos que incluye la INH, la RIF y la pirazinamida (PZA). Con INH también se vuelve práctico tratar a las personas asintomáticas que se cree albergan bacilos tuberculosos basadas en pruebas positivas de la tuberculina (17).

III.2 Taxonomía y clasificación de las micobacterias

Las micobacterias pertenecen a la familia Mycobacteriaceae, orden Actinomycetales. Posee un solo género: *Mycobacterium*, donde se describen más de 100 especies, divididos en tres grupos (18):

- Complejo *tuberculosis*, incluye: *Mtb*, que causa la gran mayoría de la TB humana en todo el mundo, *M. africanum*, causa la TB en África Occidental, donde representa hasta el 50% de los casos, *M. canettii* que es una causa rara de TB humana y *M. bovis* causantes de enfermedad en el ganado y que se propaga a los seres humanos a través del contacto animal y del consumo de leche no pasteurizada, aunque algunas investigaciones en el Reino Unido demuestran que *M. bovis* rara vez puede transmitirse de humanos a humanos. *M. caprae* (otro patógeno bovino), *M. microti* (patógeno para roedores) y *M. pinnipedii* (patógeno para focas), se informa que son causas de la TB zoonótica en los seres humanos (18).
- Complejo lepra, incluye *M. leprae* y *M. leprae – murinum*, especies causantes de la lepra humana y en roedores, respectivamente.
- Micobacterias no tuberculosas (MNT): incluyen las especies que no están incluidas en los dos grupos anteriores. Pueden ser patógenas, patógenas oportunistas o saprofitas y producen las llamadas micobacteriosis.

III.3. Morfología y características de las micobacterias

Morfología

Las micobacterias son bacilos rectos y delgados, miden aproximadamente 0,2 - 0,6 x 1-10 μm , en el caso particular de los bacilos tuberculosos son finas estructuras rectas, cilíndricas que miden 0,4 x 3 μm . En medios artificiales pueden observarse en formas cocoides y filamentosas, cuya morfología varía con la especie. Son bacterias no encapsuladas, inmóviles y no producen

esporas. Son consideradas aerobios estrictos y obtienen la energía de la oxidación de compuestos sencillos del carbono (18).

Características de las micobacterias

Los medios para el cultivo primario de las micobacterias deben incluir un medio de tipo no selectivo y otro selectivo. Los selectivos contienen antibióticos para evitar la proliferación de bacterias y hongos contaminantes. Se conocen tres fórmulas generales: medio de agar semisintético (como el Middlebrook 7H10 y 7H11), medios de huevo espesado (Lowestein Jensen) y los caldos (Middlebrook 7H9 y 7H12) (18).

Las micobacterias tienen una velocidad de crecimiento más lenta que la mayoría de las bacterias. *Mtb* tiene un tiempo de generación aproximada de 18 horas, por lo que necesita entre 3-4 semanas de incubación a 37 °C, para formar colonias macroscópicas. Las formas saprofitas 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 (18).

Las micobacterias poseen una elevada resistencia a los desinfectantes, pero se destruyen por la pasteurización y la esterilización al calor. Son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir durante largos períodos en los esputos secos u otros líquidos corporales (18).

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, en ocasiones 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 cromógenas (19).

Las micobacterias son difíciles de teñir con la tinción de Gram, aunque se consideran débiles 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 (18). El método Kinyoun es una tinción en frío y se describe desde 1915 (20).

Estructura celular de las micobacterias

Las características más importantes del género *Mycobacterium* están determinadas por la complejidad de su pared celular 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 los detergentes y a los antibacilares. En la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomano (LAM). El LAM presenta una relación funcional con los liposacáridos O antigénicos presentes en otras bacterias (20).

III.4. Coinfección de la TB con el VIH/sida

Es uno de los problemas de salud más importantes que afronta la humanidad, esta coinfección ocasiona 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 más graves que cualquiera de ellas por separado (21) (22).

El impacto del VIH/sida en el control de la TB se debe a que afecta los linfocitos 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 tuberculosa (23) (24).

Se estima que en 2016 se notifican 1,3 millones de muertes en personas VIH negativos, adicionando el estimado de 374 000 fallecimientos en personas VIH positivas (4). En personas inmunodeficientes se observa un incremento de las formas extrapulmonares, sobre todo en las últimas décadas, tal vez relacionado con la epidemia del VIH/sida (23) (25).

III.5. Epidemiología de la tuberculosis

La TB constituye en estos momentos una enfermedad con una alta morbimortalidad. La OMS ha desarrollado un programa específico y ambicioso que pretende su erradicación para el año 2050. Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada por *Mtb* y que antes de finalizar el presente siglo surgirán 90 millones de casos nuevos, con 30 millones de defunciones. La coinfección con el VIH, representa del 3 - 5 % de los casos (26).

La epidemia de TB alcanza su punto más alto a finales del siglo XVIII en Inglaterra, a principios del siglo XIX en Europa occidental y a finales del siglo XIX en Europa Oriental y América del Norte y del Sur, mientras que en muchas zonas de Asia y África todavía no se alcanza el pico de incidencia, aunque datos recientes de la OMS sugieren que esta comienza a remitir también en estas regiones (27).

En el año 2016 se estima en el mundo una incidencia de TB de 10,4 millones de casos: 90% en adultos, 65% en mujeres y 10% se detecta en personas con virus de inmunodeficiencia humana (HIV). El 56% del total de casos estimados son a expensas de cinco países: India, Indonesia, China, las Filipinas y Pakistán (4). Dentro de las estrategias de la OMS para la eliminación de la TB post 2015, se encuentra: reducir las muertes en un 75% para 2025 y en un 95% para 2035, así como lograr la reducción de la tasa de incidencia de esta enfermedad en un 50% y 90% para 2025 y 2035, respectivamente (28).

III.5.1. Situación epidemiológica en las Américas

En general, la región de las Américas progresa de manera satisfactoria hacia las metas mundiales de su control. En los últimos decenios se realizan avances importantes en el control de la TB, se inició con la estrategia del tratamiento acortado estrictamente supervisado (*DOTS*, por sus siglas en inglés) y más reciente, con la estrategia Alto a la TB, que permiten a la región alcanzar el objetivo de reducción del 50% de la prevalencia, además del objetivo de reducción del 50% de la mortalidad por TB, mientras que la cobertura de tratamiento alcanza niveles por encima del 75%. A pesar de este logro, la TB persiste, sobre todo en poblaciones vulnerables debido a los factores subyacentes de pobreza, inequidad, urbanización acelerada y alcoholismo, así como a los nexos con otras enfermedades, como la infección por el VIH/sida, diabetes, la presencia de resistencia a los medicamentos, entre otros (29) (30). En el año 2016, el total de casos notificados en la región de las Américas es de 222 746, que representa un 81% del total de casos estimados (273 574). Para los casos coinfectados con VIH-TB solo se notifica el 68% (20 625) de los 30 483 de casos estimados y el 46% (3 731) de los casos TB - multidrogoresistente/ resistente a la RIF. Además, se estima que 17 033 personas fallecen por TB (todas las formas), de ellas 6 267 con coinfección VIH/TB (3).

III.5.2. Evolución de la tuberculosis en Cuba

En este 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 Cuba. Para mejorar algunas deficiencias, el PNCTB actualiza el manejo de los casos de TB en función de las nuevas pautas internacionales y se fortalece el trabajo interprogramático en todos los niveles del sistema de salud (27).

La mortalidad por TB no constituye un problema ya que en los últimos 10 años las tasas se mantienen por debajo de uno x 100 000 habitantes, no obstante se nota un ligero incremento de la mortalidad asociada al VIH (27). Es importante señalar que entre los años 2004 y 2012 la incidencia de TB en niños menores de 15 años se incrementa de 0,3 a 0,9 x 100 mil habitantes (31). El comportamiento actual indica un detenimiento del incremento de la enfermedad, al cierre de 2017 se registran 659 casos nuevos y 54 recaídas, para una tasa de notificación de 6,3 x 100 mil habitantes, cifra similar a la de los años precedentes (32).

III.6. Diagnóstico de las micobacterias

III.6.1. Diagnóstico convencional

BK: sigue siendo el pilar principal del diagnóstico de TB en los países en desarrollo. Es una técnica sencilla, fácil de realizar y constituye el método de elección para el diagnóstico rápido y el control del tratamiento de la TB pulmonar, sobre todo en los países con una alta incidencia. Sin embargo, su S es baja, solo cuando el número de bacilos alcanza más de 100 000 por mL, se puede esperar que las BK sean positivas, siendo baja en los pacientes con VIH y en los niños, poblaciones que constituyen la mayoría de casos de la enfermedad en gran parte de los países del África subsahariana (33) (34).

Las técnicas utilizadas para la observación de las micobacterias se basan en la propiedad de su ácido-alcohol resistencia; es necesario recordar que esta característica se comparte con otras bacterias, como las especies de *Nocardia*, *Legionella micdadei*, *Rhodococcus spp.* y quistes de *Cryptosporidium sp.*, *Isospora sp.*, *Cyclospora sp.* y *Microsporidea*, aunque presentan menos estabilidad en la coloración. 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 10 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 (35).

Las técnicas de coloración se han mantenido 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: el tipo de muestra, el número y la concentración de micobacterias, técnica de coloración utilizada, tiempo dedicado a la observación, actitud y perseverancia del microscopista ante una muestra sospechosa de TB (32) (33).

La MFC de frotis teñidos con auramina se estudia como una alternativa a la MCB con tinción de ZN. En una revisión sistemática publicada en 2006, la MFC muestra una especificidad similar y una sensibilidad media del 10% más alta que la tinción de ZN. Sin embargo, MFC no ha podido implementarse en muchos países endémicos de TB, una de las razones es el alto costo del microscopio. Esto cambia con el advenimiento de microscopios fluorescentes más baratos con diodos emisores de luz. Estudios realizados sobre el rendimiento de esta técnica demuestran que tienen mayor S, además de ventajas cualitativas, operacionales y de costos sobre la MFC y la MCB (36)

Cultivo bacteriológico: incrementa la confirmación del diagnóstico en alrededor del 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de TB pulmonar. Es un método muy sensible (detecta un mínimo de 10 bacilos viables x mililitro de muestra), permite la identificación de *Mtb*, realizar las pruebas de susceptibilidad a los fármacos antituberculosos, permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. No obstante, tiene la limitación del tiempo prolongado de crecimiento de las micobacterias (de dos a seis semanas), lo que retrasa la toma de decisiones clínicas adecuadas (34) (37) (38).

III.6.2. Diagnóstico no convencional

Microscopia LED

El primer LED (rojo) se inventa en el año 1962 por Nick Holonyak, este emite luz en el espectro visible, pero debido a su escasa luminosidad, solo sirve como indicador. En la década de los 90 se desarrollan los LEDs ultravioleta y azul, lo que permite crear el LED de luz blanca, mejorando la iluminación de los diodos a través de conversión luminiscente. En la actualidad es una tecnología que está en continuo desarrollo para mejorar sus prestaciones y descubrir nuevas aplicaciones. Sus siglas provienen de “*Light-Emitting Diode*” y básicamente es un material semiconductor cuyo propósito es emitir luz al ser excitado con corriente. Según el material del que esté hecho emitirá un color diferente (39).

Como resultado del desarrollo nuevas tecnologías en los laboratorios de micobacteriología, aparece en el mercado el MFL, el mismo tiene un tiempo de vida útil de hasta 10 mil horas y no libera productos tóxicos si se rompen (34).

En estos momentos se comercializan varios productos LED para la detección directa de la TB, dentro de ellos están (40) (41):

Primo Star iLED™ (*Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania*): es un microscopio independiente con un interruptor que cambia fácilmente la función del LED fluorescente al microscopio de luz tradicional, se diseña para ser un verdadero microscopio dos en uno.

Lumin™ (*LW Scientific, Lawrenceville, GA, EE. UU.*) y el **ParaLens**™ (*QBC*™ *Diagnostics, Philipsburg, PA, EE. UU.*): implican la eliminación de una de las lentes de objetivo y el reemplazo con un objetivo equipado con LED que está conectado a una fuente de alimentación externa. Son objetivos con LED que se pueden cambiar para un objetivo en un microscopio de luz existente para conferir capacidad epifluorescente. Se transportan con facilidad pues vienen en cajas de transporte de pequeña dimensión, livianas y de caparazón duro. Para

volver al microscopio de luz, se puede utilizar un objetivo diferente o el objetivo de MFL se reemplaza con el original.

FluoLED™ (*Fraen Corporation Srl, Settimo Milanese, Italia*): utiliza luz transmitida (o transfluorescencia) para la excitación del portaobjetos teñido con fluorocromo: la luz proviene de debajo de los portaobjetos, excita el fluorocromo y luego pasa a través de la lente del objetivo al ojo del usuario. Requiere instalación en un microscopio de luz existente y luego proporciona luz 2 en 1 completa y funcionalidad transfluorescente.

CyScope® (*Partec, Gorlitz, Alemania*) y **FieldLab** (*Cytoscience, Suiza*): son microscopios independientes, más pequeños y están diseñados para una máxima portabilidad. Utilizan iluminación LED para iluminación fluorescente y luz blanca.

Nuevas técnicas de laboratorio para el diagnóstico de la tuberculosis

A partir de la década del 90 se desarrollan novedosas técnicas de laboratorio para el diagnóstico de TB y las pruebas de susceptibilidad a las drogas, basadas en el uso de medios de cultivo líquidos, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, hibridación de ADN y técnicas para la detección de mutaciones, así como la detección de antígenos y anticuerpos. Algunos de estos métodos, son recomendados por la OMS y muestran su potencial para mejorar significativamente la detección de casos y el manejo de los pacientes (38) (37).

Métodos de diagnósticos automatizados

Durante las últimas décadas se desarrollan sistemas automatizados para la detección del crecimiento de diferentes microorganismos en medio líquido (medios enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y con más rapidez que los medios sólidos). La mayoría de los sistemas automatizados 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 O₂ 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 automatizados (42).

Técnicas moleculares para la identificación de las micobacterias

Desde inicios de los años 90, se publican varias metodologías para la detección de *Mtb* por PCR, usando cebadores oligonucleótidos para amplificar un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) específico para este microorganismo (43) (44). Este es el primer método disponible para amplificar secuencias de ácidos nucleicos; sin embargo, su aplicación en el diagnóstico de la TB ha sido muy limitada, debido sobre todo a la complejidad en la extracción, amplificación, así como la detección del ADN de micobacterias y a los riesgos de seguridad biológica inherentes a su manejo (45).

Los métodos moleculares ofrecen varias ventajas sobre las técnicas convencionales para la detección e identificación rápida del complejo *Mtb* y de otras micobacterias, como son: el corto tiempo para obtener resultados (5-48 horas), confianza y reproducibilidad. Las deficiencias de la técnica están en los riesgos de contaminación cruzada y que no son de utilidad en el control de tratamiento, ya que no distingue entre bacilos vivos y muertos (46).

Prueba de amplificación directa de *Mtb*. (AMTD, por sus siglas en inglés): consiste en una amplificación isotérmica mediante una transcripción inversa cuya secuencia diana es el gen 16S ARNr (ácido ribonucleico ribosomal). Los resultados están disponibles en 2 horas y media. Los sistemas más utilizados son el ensayo AMTD-2 y el “COBAS Amplicor *M. tuberculosis* test”, este último amplifica un fragmento de 584 pb del gen 16S ARNr, es automatizada y puede realizarse directamente de la muestra clínica (37).

Análisis por enzimas de restricción: se basa en la amplificación del fragmento *pb* 441 del gen *hsp65* por PCR, seguido por digestión de los productos amplificados con dos enzimas de restricción BstEII y HaeIII. Los productos de la reacción de digestión se separan y visualizan por electroforesis en gel de agarosa (46).

Ensayos de sondas en línea: 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 interpretación. Actualmente se disponen de dos sistemas comercializados: “INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (*Innogenetics NV, Ghent, Belgium*), y el GenoType MTBC/ GenoType *Mycobacterium CM/ AS (Hain Lifesciences, Nehren, Germany)*. (46)

Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop Mediated Isothermal Amplification): se fundamenta en la nueva plataforma LAMP (*Eiken Chemical Co.* en Japón). Esta tecnología amplifica un ADN diana bajo condiciones isotérmicas (alrededor de 65°C). Está diseñado para detectar visualmente ADN de muestras clínicas en menos de dos horas. Un grupo experto de la OMS concuerda que esta tecnología tiene potencial para ser una herramienta diagnóstica rápida de TB, pero que la evidencia disponible de este ensayo es insuficiente (46).

Xpert MTB/ RIF: es una de las más evaluadas y la OMS recomienda su empleo en la detección del complejo *Mtb* y la susceptibilidad a la RIF, basándose en su sensibilidad (S), especificidad (E), simplicidad técnica y rapidez (45) (47). Utiliza la tecnología molecular Beacon para detectar secuencias de ADN amplificadas en un ensayo de PCR en tiempo real. Los resultados se obtienen en 2 horas (46) (47) (48).

Métodos moleculares rápidos para test de sensibilidad a drogas (TSD): se han desarrollado múltiples ensayos que permiten la detección simultánea del complejo *Mtb* y de las mutaciones asociadas con la resistencia a rifampicina (sola o en combinación con isoniacida). Se basan en PCR, y pueden utilizarse directamente con muestras clínicas dando resultados en 24 a 48 horas; Actualmente se disponen de dos ensayos comerciales: el INNO-LiPA1 Rif.TB (*Innogenetics, Ghent, Belgium*) y el GenoType MTBDRplus® (*Hain LifeScience GmbH, Nehren, Germany*). (46) (49).

Otras técnicas de identificación

Identificación basada en inmunocromatografía: se han desarrollado tres ensayos rápidos para diferenciar entre aislados del complejo *Mtb* y 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* (46).

Patho-tb test (Francia): 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 rápida (47).

Análisis del perfil lipídico: es reconocido como una herramienta útil para diferenciar especies micobacterias. Se han señalado el 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 (50).

Pruebas serológicas: la detección de anticuerpos contra *Mtb* en suero, podría ofrecer resultados rápidos a bajo costo, pero por desgracia, los que se disponen en estos momentos tienen una aplicación limitada, debido a la reacción cruzada y baja S. La OMS en la actualidad 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 adecuado (51) (52).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal en el LNRI-TBLM del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” en el período comprendido desde febrero a julio del 2018. Para evitar el sesgo de la información se incluyeron dos observadores al realizar la lectura de las láminas. Para los resultados finales se utilizó la media de la lectura de los dos observadores, los cuales recibieron un entrenamiento internacional sobre la MFL por parte de una especialista en la temática del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.

IV.1 Selección del universo y muestra de estudio

El universo de estudio estuvo constituido por todas las muestras pulmonares que se recibieron en el LNRITBLM – IPK procedentes de pacientes con sintomatología respiratoria de más de 21 días (549). Se incluyeron en el estudio todos los especímenes pulmonares (mucosos o mucopurulentos), con volumen superior a 2mL, adecuadamente identificados y a los que se le realizó el cultivo; se excluyeron los extrapulmonares, los derramados o no identificados adecuadamente, con volumen inferior a 2 mL y a los que no se le realizó cultivo bacteriológico, por lo que la muestra final a estudiar quedó conformada por 306 especímenes.

IV.2 Procesamiento de las muestras

Procedimiento para realizar 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; 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 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

La preparación de la tinción fluorescente (ver anexo 1).

Procedimiento:

1. Se cubrió el frotis con el colorante de auramina O al 0,1% filtrada y se dejó reposar durante 20 minutos como mínimo.
 2. Se aclaró el frotis con agua del grifo y se escurrió la lámina.
 3. Se cubrió el frotis con el decolorante (alcohol- ácido 5%) y se dejó reposar durante 1 o 2 minutos.
 4. Se aclaró el frotis con agua del grifo y se escurrió.
 5. Se cubrió el extendido con la solución de permanganato de potasio (tinción de contraste), dejándolo actuar durante 1 minuto.
 6. Se aclaró el frotis con agua del grifo y se escurrió la lámina.
 7. Se dejó secar al aire libre y al abrigo de la luz.
 8. Se examinó el frotis utilizando el ParaLens de QBC.
- **Lectura de los extendidos por microscopia LED y por microscopia de fluorescencia convencional:** se realizó en cruces (100 campos ópticos), como se describe (53).

Informe	Lectura con lente 40 X
No se observan BAAR	0 BAAR/1 línea
Paucibacilar	1 – 19 BAAR/1 línea (N° 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 y se aplicó calor hasta la emisión de vapores dejándose 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.

Lectura de los extendidos por microscopía de campo brillante en cruces (100 campos ópticos), según como se describe (5).

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

Para la lectura de la MCB se utilizó el microscopio modelo Axiostar plus, para la MFL se utilizó el adaptador ParaLens de QBC y para la MFC el microscopio de fluorescencia Olympus BX41.

IV. 3. Procesamiento de las muestras para el cultivo

IV. 3.1. Método de Petroff modificado con solución salina (27)

- Por cada 2 mL de muestra, se adicionó 2 mL de NaOH al 4%.
- Se homogenizó (vórtex).
- Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agitó en ocasiones.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

- 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.

IV.3.2. Elaboración del medio de cultivo Löwenstein Jensen (LJ) (anexo 2)

Las muestras una vez procesadas se inocularon en el medio de cultivo sólido Löwenstein Jensen (LJ) y en el medio líquido (Sistema BacT ALERT 3D)

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 crecimiento se le realizó 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.

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

IV.3.3. Cultivo en medio líquido (Sistema automatizado BacT ALERT 3D)

1. Se descontaminó la parte superior de la botella MP con alcohol al 70% y se adicionó con una jeringuilla estéril 0,5 mL del antibiótico liofilizado reconstituido previamente, según las instrucciones del fabricante (54) (55).
2. Una vez procesadas las muestras se inoculó con jeringuilla estéril 0,5 mL de la muestra descontaminada. Luego se descontaminó por segunda vez la parte superior de la botella MP con alcohol al 70% y se cargó al equipo BacT/ ALERT 3D.
3. De las botellas presuntas positivas detectadas por el equipo, se extrajo 1 mL de la botella y se transfirió a un tubo con tapa de rosca de 15 mL y se centrifugó a 3 000 gravedades por 15 minutos.
4. Se decantó el sobrenadante y del sedimento se realizó una tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.

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

IV.3.4. Procedimiento para realizar la tira SD BIOLINE (anexo 3) (56)

Procedimiento de la prueba: se adicionaron 100 µL de la botella MP presunta positiva a micobacterias o 100 µL de la suspensión bacteriana o fluido de condensación en la ventana de la tira para inocular la muestra y se esperó 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.

IV.4. Procesamiento de los datos: se recogió la información y se confeccionó una base de datos en el programa Microsoft EXCEL XP. 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.

IV.5. Análisis de la información

- **Comparación de la MFL con las técnicas microscópicas convencionales empleadas para el diagnóstico de micobacterias:** para este análisis se esperó el resultado del cultivo y se incluyeron todos los frotis con cultivo positivo a micobacterias e igual número de láminas con cultivo negativo.
- **Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED:** se incluyeron todos los casos nominales con sintomatología respiratoria de más de 21 días (208). Se compararon los resultados de la MFL con la MCB y MFC, utilizando como prueba de referencia el cultivo.
- **Análisis estadístico de los resultados y cálculo de los ID de la MFL, MFC y MCB:** se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDATA (por sus siglas en inglés), versión 3.1 (EpiData Association, Dinamarca), con un intervalo de confianza del 95%. Para el cálculo de los indicadores de desempeño (ID) se excluyeron los cultivos contaminados. La interpretación de los resultados de concordancia (C) entre las microscopias se realizó mediante el cálculo del índice de kappa (k), según lo recomendado por Landis y Koch (57), como se muestra en la tabla siguiente.

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

IV.6 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 42-18). En el manejo de las muestras y los aislamientos clínicos se tuvieron en cuenta varios aspectos éticos. Por el tipo de estudio que se realizó no se requirió de consentimiento informado de los pacientes que intervinieron en el estudio. El trabajo se llevó a cabo en gabinetes de seguridad clase II (marca Euroaire, modelo 425-BSC-N-1300-IIA2), según las normas y procedimientos del laboratorio 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. Los nombres de los pacientes involucrados se mantuvieron de manera confidencial. El personal encargado tuvo conocimiento suficiente de las normas de bioseguridad en el manejo de las muestras.

V.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La MFL se recomienda en el 2010 por la OMS para el diagnóstico de la TB, como una alternativa de la MCB, utilizando la tinción de ZN (12). Este estudio es el primero realizado en Cuba sobre la evaluación de la MFL, comparada con otras técnicas de microscopía, lo que constituyó un aporte a esta temática. Es importante señalar que hubo un 99% de coincidencia entre los dos observadores que realizaron la lectura de las láminas y los resultados que se describen a continuación es la media de las lecturas de ambos microscopistas.

En la **tabla 1** se muestra la comparación de los resultados de estas tres técnicas. Por la MFL y MFC coincidió que se identificaron 38 (37,8%) láminas positivas a BAAR, de ellas 18 paucibacilares (10 más que por la MCB), similar a lo que sucedió para las positivas a + (uno más por la MFL y MFC) y +++ (tres más por la MFL y MFC), corroborando la mayor sensibilidad de las microscopías que utilizan la tinción con auramina O. Por la MCB fueron positivas 24 (24,5%) láminas, pero al comparar este resultado con la MFL y MFC las diferencias no fueron significativas ($p= 0,1590$).

Tabla 1: Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED con la microscopía de campo brillante y la microscopía de fluorescencia convencional. LNRI – TB – IPK. Febrero – Julio 2018.

n= 98 Microscopía	Negativos	Positivas				Total positivos
		Paucibacilares	+	++	+++	
Campo Brillante	74	8	3	2	11	24 (24,5%)
Fluorescencia LED	60	18	4	2	14	38 (37,8%)
Fluorescencia Convencional	60	18	4	2	14	38 (37,8%)

Por la MFL se identificaron 14 láminas positivas a BAAR que resultaron negativas por la MCB (12 paucibacilares, uno positivo + y uno +++), por lo que se incrementó la positividad en un 13,3%. Del total de láminas positivas

identificadas por ambas técnicas en cuatro de ellas la MFL las identificó con codificaciones superiores a las de la MCB. La MFL detectó más frotis con escasos BAAR que la MCB. De las láminas que resultaron paucibacilares (ocho) y positivas a ++ (dos) por la MCB, la MFL la identificó con una codificación superior (dos a + y una a +++, respectivamente). Para la codificación de una + (tres) por la MCB la MFL identificó dos con codificaciones superiores (++ y +++)), esto confirmó la mayor sensibilidad de esta técnica.

Al realizar el mismo análisis entre la MFL y la MFC se encontraron tres láminas identificadas como paucibacilares por la MFL que resultaron negativas por la MFC y el mismo número que fueron negativas por la MFL y fueron paucibacilares por la MFC. Esto pudiera obedecer a que por el número escaso de bacilos identificados por cada una de las técnicas (de uno a dos BAAR por campo) no se hubiera coincidido en pasar por la misma línea a la hora de realizar la lectura, por otro lado resulta difícil identificar pocos bacilos en el frotis, lo cual depende de la experiencia del observador. Es importante señalar que todas las láminas identificadas como positivas por la MFL, en el 100% se confirmaron la presencia de micobacterias por el cultivo.

Al analizar la C se consideró buena entre la MFL y MCB ($k= 0,6773$) y muy buena al comparar la MFL y MFC ($k=0,8711$).

En la **tabla 2** se muestra la comparación de los ID de las tres técnicas de microscopias. Para la MFL los indicadores de sensibilidad (S), valor predictivo negativo (VPN) y C fueron de 77,55%, 81,87% y 88,78%, respectivamente. La S para la MCB fue de 48,98% (muy inferior a la MFL) con un VPN de 66,22% y C del y 74,49%; sin embargo la especificidad (E) y valor predictivo positivo (VPP) fue del 100% para ambas técnicas. Por la MFC los ID fueron similares a los de la MFL con el 75,51% de S y 97,96% de E. El VPP y VPN fueron de 97,37% y 80,00%, respectivamente. El índice de youden (IY) calculado para la MFL (0,78) fue muy superior comparado con la MCB (0,49), que se comportó por debajo de

0,75 que es el límite inferior para considerar una prueba diagnóstica adecuada. En comparación con el obtenido por la MFC fue ligeramente inferior (0,73).

Tabla 2: Comparación de los resultados de los indicadores de desempeño de la microscopía de fluorescencia LED, la microscopía de campo brillante y la microscopía de fluorescencia convencional. LNRI – TBLM – IPK. Febrero – Julio 2018.

Indicadores de desempeño	Tipo de Microscopía		
	Fluorescencia LED	De Campo brillante	Fluorescencia Convencional
Sensibilidad	77,55%	48,98%	75,51%
Especificidad	100,00%	100,00%	97,96%
VPP	100,00%	100,00%	97,37%
VPN	81,87%	66,22%	80,00%
Concordancia	88,78%	74,49%	86,73%
Índice de Youden	0,78	0,49	0,73

En la literatura revisada no se encontraron trabajos donde se compare la MFL y MCB (según los resultados del cultivo positivos a micobacterias y la misma cantidad de negativos) como la seguida en esta investigación, por lo que no se pudo comparar con otros estudios.

La S de la MFL y MFC obtenida en este trabajo fue menor a la que reportan Marzouk y cols (58) en el 2013 que realizan un estudio, siguiendo una metodología similar a la de esta investigación, a partir de 180 muestras positivas por el cultivo y el mismo número de muestras negativas. En ese estudio los autores obtienen una S de 82,2% y 79,4% para MFL y MFC, respectivamente. Sin embargo la E para las microscopías fluorescentes en la presente investigación fue similar a la que obtienen los mismos autores (97,2% para ambas técnicas).

La C entre MFL y MFC que se obtuvo en este trabajo fue menor a la que reportan Kuhn y cols (59) en un estudio multicéntrico donde participan tres países (Bangladesh, Trinidad y Etiopia), que compara la MFL (utilizando el adaptador ParaLens QBC) con la MFC, obteniéndose un 100% de C pero en esa investigación se utiliza el adaptador con objetivo de 60x y se investigan menor cantidad de láminas (25) con resultados conocidos del cultivo (5 láminas negativas y 20 frotis positivos con diferentes grados de positividad).

La OMS en el año 2010 recomienda la sustitución de la MFC por la MFL con tinción de auramina O, en todos los centros de salud donde se utiliza la MFC y a su vez recomienda que esta se introduzca gradualmente como una alternativa para MCB con tinción de ZN en todos los laboratorios (60). La MFL es una de las técnicas hoy disponibles en el mercado, tiene el potencial de mejorar algunas de las desventajas de estos dos métodos. Incluyen el desarrollo de sistemas de iluminación basados en bombillas LED (diodos emisores de luz) que tiene como ventaja la vida útil de hasta 50 000 horas, además pueden funcionar con batería y no requieren un cuarto oscuro (59) (61).

El uso de diagnósticos con técnicas más sensibles, incluida la microscopía fluorescente (como el sistema ParaLens QBC), es limitado en los países de bajos recursos por la falta de una infraestructura adecuada, capacitación del personal del laboratorio, así como la falta de capital monetario. Sin embargo, esta técnica es potencialmente más sensible y menos laboriosa que la MCB utilizando el ZN u otros métodos como el de Kinyoun para la identificación de BAAR. Por lo tanto, los microscopistas que estén entrenados en el uso de métodos convencionales con tinción fluorescente y microscopía de campo oscuro, no tendrían dificultades para leer láminas con los ParaLens. Además sería un método útil en los países en vías de desarrollo por su costo aceptable y se evitaría la compra de un segundo microscopio ya que el adaptador convierte un microscopio de luz brillante en uno de fluorescencia LED (59) (61).

V.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 3 se muestran los resultados de la comparación de las tres técnicas de microscopía utilizadas en este estudio. Por la MFL y la MFC coincidió que se identificaron 180 (86,5%) láminas negativas y 28 (13,5%) positivas, de ellas 10 láminas paucibacilares, 4 positivas a +, 2 a ++ y 12 +++. Por la MCB se identificaron 18 (8,6%) láminas positivas: 4 paucibacilares, 3 positivas a +, 2 a ++ y 9 a +++.

Tabla 3: Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED, la microscopía de campo brillante y la microscopía de fluorescencia convencional. LNRI – TBLM – IPK. Febrero – Julio 2018.

Microscopía		Negativos	Positivas				Total positivos
			Paucibacilares	+	++	+++	
De Campo Brillante	190 (91,4%)	4		3	2	9	18 (8,6%)
Fluorescencia LED	180 (86,5%)		10	4	2	12	28 (13,5%)
Fluorescencia Convencional	180 (86,5%)		10	4	2	12	28 (13,5%)

Del total de láminas que resultaron paucibacilares (4) por la MCB, en dos de ellas, tanto por la MFL como MFC se identificaron con una codificación superior (+). De igual forma sucedió con las codificaciones de + y ++, por lo que se confirma la mayor sensibilidad de esta prueba. Minion y cols en 2011 (13), Marais y cols en 2008 (61), y Kelamane cols en el 2016 (63), notifican que la microscopía fluorescente es más efectiva en muestras paucibacilares y con +, que la tinción de ZN. Por la MFL y MFC se identificaron mayor número de frotis paucibacilares (seis) que con la MCB, similar a lo que obtienen Laifangbam y cols en 2009 en Nepal que estudió 102 pacientes (63).

Al comparar los porcentajes de positividad de la MFL respecto a la MCB las diferencias no fueron significativas ($p=0,1594$). La concordancia entre estas dos técnicas se consideró buena al obtenerse un índice de kappa (k) de 0,7570.

Los resultados en cuanto al porcentaje de positividad que se obtuvo en este estudio por la MFL (13,5%) y por la MCB (8,6%) fueron inferiores al que señalan N'Guessan y cols en el Instituto Pasteur de Francia en 2013, utilizando el adaptador ParaLens QBC. En esa investigación los autores informan una positividad para la MFL y MCB del 42% y 40%, respectivamente (43). Estas diferencias pudieran deberse a que Cuba es un país de baja carga de TB, además se estudiaron un mayor número de pacientes con sospecha de TB que las investigadas por N'Guessan y cols (50 muestras), además Francia es un país de alta carga de TB y la probabilidad de encontrar un elevado número de casos positivos fue más alta. También fueron inferiores a lo que informan Van Deun y cols en 2008 (64), en un estudio donde determinan el rendimiento de la MFL en comparación con la MCB en centros hospitalarios de países con medianos y bajos recursos, en 2 179 casos sospechosos, donde se notifican por parte de los autores porcentajes de positividad para la MCB y MFL de 36,0 % y 38,6%, respectivamente. Esto pudiera obedecer a que se estudian un mayor número de muestras clínicas y se incluyen países con mediana carga de TB, por lo que el autor de este trabajo infiere que pudo estar relacionada con la mayor positividad encontrada en ese estudio.

Por la MFL se identificaron 10 casos negativos por la BK convencional con la tinción de ZN. Esto 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 resultado (8), para poder comenzar con el tratamiento. De estos 10 pacientes, 9 fueron positivos a micobacterias (7 de ellos a *Mtb* y 2 MNT), solo en 1 caso el cultivo fue negativo, 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 proporción de verdaderos positivos a BAAR por MFL y MCB fue de 13,043% y 8,696%, respectivamente, pero al comparar estas proporciones no existieron diferencias significativas ($p=0,2065$) entre la proporción de láminas positivas observadas con la MFL y la MCB.

También se compararon los resultados de la MFL y la MFC. Del total de láminas analizadas, se identificó a dos que resultaron paucibacilares por la MFL que se diagnosticaron como negativas por la MFC y dos que se identificaron como negativas por MFL que se codificaron como paucibacilares por la MFC. Esto pudiera atribuirse a varios factores como la experticia del microscopista, a los escasos bacilos presentes en la muestra y que no estuviera homogéneamente distribuido en el frotis y a la línea recorrida por el observador.

La concordancia (98,1%) que se obtuvo entre MFL y MFC se consideró muy buena al obtenerse un índice de k de 0,9174, similar a lo que notifican Van Deun y cols (99,1%) en 2008 en Tailandia, pero utilizando otro tipo de microscopio LED (LED FluoLED Easy) (65). Sin embargo el índice de k de esta investigación fue superior a la obtenida por Whitelaw y cols ($k=0,871$) en un estudio en Addis Ababa, Etiopia en 2015 (60), las diferencias pueden estar en correspondencia a que solo se incluyeron en ese estudio a pacientes coinfectados con VIH donde las muestras pulmonares son casi siempre paucibacilares y con frecuencia el resultado de la BK es negativo.

La proporción de verdaderos positivos a BAAR por MFL y MFC fue de 13,043% y 12,077%, respectivamente, pero al comparar estas proporciones no existieron diferencias significativas ($p=0,8821$) entre la proporción de láminas positivas observadas con la MFL y la MFC.

En la tabla 4 se muestra la comparación de los indicadores de desempeño de la MFL en relación con la MCB y MFC. La S de la MFL fue de 81,82% superior a la MFC (75,76%) y MCB (54,55%). El VPP fue similar para MFL (96,43%) y la MCB (100%), pero superior al de la MFC (89,29%). El resto de los parámetros:

E, VPN y C de la MFL fue de 99,43%; 96,65% y 96,62%; respectivamente, fue similar a los obtenidos con la MFC y MCB. El valor de índice de Youden calculado para la MFL fue cercano a uno (0,81), superior al obtenido por la MFC (0,74) y muy por encima del obtenido por el de la MCB (0,55).

Tabla 4: Comparación de los indicadores de desempeño de la microscopía de fluorescencia LED, la microscopía de campo brillante y la microscopía de fluorescencia convencional. LNRI – TBLM – IPK. Febrero – Julio 2018.

Indicadores de desempeño	Microscopía Fluorescencia LED	Microscopía Campo Brillante	Microscopía Fluorescencia Convencional
Sensibilidad	81,82%	54,55%	75,76%
Especificidad	99,43%	100,00%	98,28%
VPP	96,43%	100,00%	89,29%
VPN	96,65%	92,06%	95,53%
Concordancia	96,62%	92,75%	94,69%
Índice youden	0,81	0,55	0,74

La S que se obtuvo en este trabajo (81,82%) con la MFL en comparación con MCB, fue superior a la obtenida por Albert y cols en un estudio conducido en Uganda en el año 2010, que compara la MCB con tres sistemas diferentes de microscopios LED (Fraen AFTER, iLED, y Lumin) y obtuvo una sensibilidad que osciló entre 67,9% y 71,7%, la cual pudo estar afectada debido que solo se incluyen pacientes VIH (44). Aunque estos sistemas de microscopía LED utilizan el mismo principio no estuvo incluido el método, utilizando el adaptador ParaLens de QBC. Por otro lado la S y E fue similar a la que reportan Kelamane y cols quienes obtienen 80, 17% y 97,4%, respectivamente (62).

La S (81,82%) y E (99,43%) que se obtuvo en este estudio para la MFL fue menor a la que notifican N'Guessan y cols, en Francia en 2013, que utilizan, al igual que el presente estudio, el adaptador ParaLens QBC y obtienen una S de

94,7% y E de 90,3%. Por otro lado, la S del MCB de esta investigación (54,55%) fue inferior a la que señalan los mismos autores (84,2%) (43).

De forma general la sensibilidad de la MFL en esta investigación fue superior a la de la MFC, resultados similares a los de Cuevas y cols (66) en 2011, en un estudio multicéntrico que incluye varios países (Etiopía, Nepal, Nigeria y Yemen).

En otro estudio realizado por Trusov y cols en Macedonia con 205 frotis de esputos, obtienen una S para MFL (utilizando el adaptador Lumin) y MFC del 87,8% y para la MCB del 78,0% (67), superiores a los obtenidos en este trabajo.

La mayor sensibilidad de la MFL en comparación con la MCB pudo 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 fuschina, lo cual da como resultado la tinción de un mayor número de bacilos. Por otro lado permite una identificación más fácil con un contraste más nítido entre el fondo y los bacilos (9) (68), el fondo de la lámina teñido en la MFL es más brillante, facilitando un mejor enfoque y examen de las láminas con pocos bacilos; además del área aumentada de la lámina examinada (68) (69). Otros factores que pudieron contribuir al mayor rendimiento de esta tecnología es la mejora en la competencia de los técnicos de laboratorio a través a la capacitación adicional del personal y el uso de microscopios aptos técnicamente y por supuesto que tenga un buen sistema de control de calidad de la técnica implementado.

Los resultados en cuanto a la especificidad de este estudio (99,43%) fue similar a la que reportan Imaz y cols en 2017 (9) en Argentina (99,9%), donde comparan y evalúan el rendimiento de la MCB con la MFL en 6 968 muestras clínicas, pero utilizando otros microscopios LED (TK LED y el Primostari LED). Sin embargo la S de la MFL y la MCB encontrada en esta investigación (81,82%

y 54,55; respectivamente) fueron inferiores a la que encuentran los mismos autores (87,7% y 76,3%, respectivamente).

Se han realizado otros estudios en el mundo donde se evalúan la microscopía de fluorescencia LED en países de medianos y escasos recursos económicos. Chang y cols en 2015 realizan un meta-análisis de varias investigaciones sobre esta temática donde encuentran que la S tuvo una variación del 40% - 83% y la E del 82% al 100%. En esta revisión se encontró una buena especificidad combinada de la MFL (70).

La especificidad de la MFL puede estar influenciada por varios factores tales como experiencia y entrenamiento del microscopista, así como la naturaleza paucibacilar de las muestras clínicas dentro de determinados grupos poblacionales, como los VIH positivos, de los cuales no hay estudios suficientes para medir el rendimiento de esta técnica (70).

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 MCB con la tinción de ZN convencional para identificar un mayor número de pacientes positivos que presentan síntomas de TB (43).

La microscopía continúa siendo la piedra angular en el diagnóstico de la TB particularmente en países en desarrollo pero se requiere para la lectura de aproximadamente 5 y 10 minutos por lámina, lo que crea cargas de trabajo considerable para estos los laboratorios (43).

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 (43) (71) (72).

La MFC puede reducir las cargas de trabajo de laboratorio, pero ha sido difícil ampliar su implementación debido al alto costo y complejidad del microscopio, así como el sistema de iluminación de la lámpara de vapor de mercurio las cuales tienen una vida corta (de aproximadamente 250 horas), se requiere de un suministro continuo de electricidad, además de que las bombillas de repuesto pueden ser difíciles de obtener, por otro lado se le adiciona la necesidad de un cuarto oscuro y los riesgos de salud percibidos asociado con la exposición a la luz ultravioleta (73-75).

Dados los resultados obtenidos en este trabajo la MFL utilizando el adaptador ParaLens QBC puede constituir una alternativa a la microscopía de luz ZN para la detección de micobacterias, lo cual sería de gran utilidad en los grupos de riesgo, tales como los pacientes VIH, que por su estado inmunológico con frecuencia son BK negativa utilizando la MCB convencional.

Por la MFL se identificaron 28 pacientes que fueron cultivo positivo a micobacterias, 24 *Mtb* y tres MNT, para una tasa de positividad del 13,5% (solo uno fue negativo al cultivo y se trató de un paciente en seguimiento de tratamiento). Por la MCB se identificaron 18 casos, de ellos 17 *Mtb* y uno MNT (los 18 fueron positivos al cultivo), para una positividad del 8,6%, inferior a la que se obtuvo por la MFL. Por otro lado con la MFC, la positividad fue igual a la que se obtuvo por la MFL, pero por el cultivo se confirmaron 25 aislados (23 *Mtb* y dos MNT), dos cultivos negativos correspondieron a pacientes en seguimiento de tratamiento. Sin embargo al comparar la tasa de positividad de las 3 técnicas de microscopía utilizadas en el estudio, las diferencias no fueron estadísticamente significativas al obtenerse un valor de $p > 0,05$, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED, la microscopía de campo brillante y la microscopía de fluorescencia convencional de acuerdo con la tasa de positividad. LNRI – TB – IPK. Febrero – Julio 2018.

Microscopía	Tasa Positividad	Aislados	p
Fluorescencia LED	13,5% (28)	24 MTB* 3 MNT	-
De Campo Brillante	8,6% (18)	17 MTB 1 MNT	0,1593
Fluorescencia Convencional	13,5% (28)	23 MTB* 2 MNT	0,7686

Leyenda: MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; MNT: micobacteria no tuberculosa. *pacientes con cultivo negativo que correspondieron a pacientes en seguimiento del tratamiento.

El porcentaje de detección de BAAR por la MFL se incrementó en un 4,9% (10 pacientes, de ellos nueve *Mtb* y uno MNT) en relación con la MCB. La tasa de positividad que se obtuvo con la MFL (13,5%), superó la de Getachew y cols (76) en Etiopía en 2015 (6,2%), quienes comparan el rendimiento de la MFL con la de ZN, esta diferencia puede estar dada porque en este estudio solo se incluyen pacientes con VIH, quienes por lo general debido a la presencia de un pequeño número de bacilos en el esputo, con frecuencia la microscopía es negativa. En la presente investigación se incluyeron pacientes VIH y no VIH, pero no fue posible inferir el rendimiento de la técnica en este grupo porque no se pudo obtener esta información en un gran porcentaje de los casos, lo que constituyó una limitante del estudio.

La MFL incrementó la tasa de positividad en comparación con la MCB (4,9%). En un meta-análisis encargado por la OMS, de publicaciones y datos no publicados, encuentran que la MFL es significativamente más sensible (aproximadamente en un 6 %) sin pérdida apreciable de especificidad en

comparación con la microscopía ZN directa, similar al obtenido en este estudio (60).

Se realizan otros estudios que evalúan la utilidad de la MFL para el diagnóstico de la TB en muestras extrapulmonares. Abdissa y cols (77) en 2015 evalúan la efectividad de esta técnica para el diagnóstico de BAAR a partir de 144 biopsias y la comparan con la MCB (con el cultivo como método de referencia). Con la tecnología LED se incrementó el diagnóstico en 33,3% de los casos en comparación con la MCB y se obtuvo un porcentaje de positividad para MFL y MCB de 34% y 18,8%, respectivamente. Dado los limitados estudios reportados a nivel mundial de la utilidad de MFL en muestras extrapulmonares, sería interesante evaluar en estudios posteriores la utilidad de esta técnica en el LNRI-TBLM utilizando otros tipos de muestras clínicas.

La MFL tiene múltiples ventajas sobre la MCB 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, que además de facilitar su implementación. Los menores costos de capital y el mantenimiento de los sistemas basados en LED, la observación más rápida de los frotis y una mayor sensibilidad comparada que con la MCB, hace que sean potencialmente más adecuados para los laboratorios con bajos recursos económicos (66).

Aunque no se calculó en este estudio el tiempo por cada técnica utilizada, si está documentado que utilizando la MFL se consume menos tiempo que por la MCB en el diagnóstico de la TB. Esto se debe a que los bacilos se destacan como objetos brillantes sobre un fondo oscuro en el microscopio de fluorescencia, lo que los hace fácilmente identificables y por lo tanto causan menos tensión ocular y menos agotamiento visual (78).

- ❖ La microscopía de fluorescencia LED es más eficiente para identificar frotis con escasos bacilos que las técnicas microscópicas convencionales, lo que corrobora su introducción como método diagnóstico para la tuberculosis.
- ❖ La microscopía de fluorescencia LED identifica un mayor número de casos positivos a BAAR que la tinción de Zielh Neelsen, por lo que su introducción en la red de laboratorios sugiere su gran utilidad para el PNCTB en la detección y manejo de los pacientes.

VII.RECOMENDACIONES

- ❖ Introducir la microscopía de fluorescencia LED en laboratorios regionales del país para mejorar la detección de casos por baciloscopía.
- ❖ Evaluar el rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED en los pacientes con VIH y en muestras extrapulmonares.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2015.22.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Geneva, Switzerland. World Health Organization, 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/publicatins/global_report/en/ (accessed Sept 12, 2015).
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2017.23.
4. World Health Organization, HIV-Associated TB facts, 2013. Disponible en: <http://www.who.int/tb/challenges/hiv/>.
5. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte I. Baciloscopía. 2008.
6. The Global Plan to stop TB 2011 – 2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. Geneva. WHO. 2010: Págs.55– 7.
7. Palomino JC. Current developments and future perspectives for TB diagnostics. Future Microbiol 2012; 7(1):59–71.
8. Vallego VP, Rodríguez JC, Searle MA, Farga CV. Ensayo Xpert/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir 2015; 31: 127-31.
9. 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>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. Minion J, Zwerling A, Pai M. Diagnostics for tuberculosis: what new knowledge did we gain through The International Journal of Tuberculosis and Lung disease in 2008. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13(6):691-7.
11. Wilson ML. Recent Advances in the Laboratory Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Drug Resistance. *CID* 2011; 52(11):1350–5.
12. World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. Policy statement 2011. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2011.8.
13. 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>.
14. Lönnroth K, Migliori GB, Abubakar I, D'Ambrosio L, de Vries G, Diel R, et al. World Health Organization. Towards tuberculosis elimination: an action framework for low-incidence countries. *Euro Resp J* 2015. Disponible en: <http://doi.org/10.1183/09031936.00214014>.
15. Wirth T, Hildebrand F, Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, et al. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathog.* 2008; 4(9). Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000160>.
16. Cartes Parra JC. Breve historia de la Tuberculosis. *Rev Med Costa Rica y Centroamerica* 2013; LXX (605): 145-50.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

17. Daniel W. 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.
18. Micobacterias. En: Fraga JL, García Carbajal NL. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microb méd. 25ª ed. México, DF: McGraw Hill Interamericana; 2011. 289-92.
19. 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.
20. 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>.
21. Lozano Salazar JL, Plasencia Asorey C, Costa Montané D M, Puente Saní V. Coinfección por tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana: confluencia de dos epidemias. MEDISAN 2012; 16(9):1439.
22. Mederos Cuervo LM, Reyes Pérez A, Valdés Alonso L, Rodríguez Delgado F, Sardiñas Aragón M, Martínez Romero MR. Coinfección por *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium tuberculosis* en paciente con el síndrome de inmunodeficiencia humana. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2014. 31(4):788-92.
23. Palou E. Tuberculosis y SIDA: una Coinfección eficiente. Rev Med Hondur 2010; 78(1):33-7.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

24. Peralta I, Cabrera MC, Gutiérrez MJ. Coinfección TB/VIH: una amenaza para los programas de control de ambas enfermedades. *Medicent Electrón* 2015; 19(3):160-2.
25. Ramírez M., A. Menéndez, A. Noguero (2015): Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. *Rev Esp Sanid Penit* 17: 3-11.
26. Bermejo MC, Clavera I, Michel de la Rosa FJ, Marín B. Epidemiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar* 2007; 30 (2):7-19.
27. Resolución Ministerial No. 277. Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 2013.
28. Plataforma Regional de América Latina y el Caribe. Situación epidemiológica de la tuberculosis en la región de las Américas. Acceso [19 abril 2017]. Disponible en: <http://plataformalac.org/2017/03/situacion-epidemiologica-de-tuberculosis-y-malaria-en-la-region-de-las-americas/>.
29. Caminero Luna AJ. Epidemiología. En: Tuberculosis una perspectiva actual. *JANO* 2001; 60 (1380):40-7.
30. OPS/ OMS. Situación de la tuberculosis en Las Américas, 2016. Acceso [18/04/2017]. Disponible en: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=38626&lang=es.
31. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

32. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana, Cuba: Anuario Estadístico de Salud; 2017. ISSN: 1561-4433.
33. Chaidir L, Parwati I, Annisa J, Muhsinin S, Meilana I, Alisjahbana B et al. Implementation of LED Fluorecence Microscopy for Diagnosis of Pulmonary and HIV - Associated Tuberculosis in a Hospital Setting in Indonesia. PLOS ONE 2013; 8(4). Disponible en: www.plosone.org.
34. Ramos de Rosario BB, Soto Cáceres V, Borrego MR. Validez del método concentrado en esputo con hipoclorito de sodio para el diagnóstico de BAAR en pacientes con radiografía anormal y Baciloscopia negativa. Rev Cuerpo Méd HNAAA 2012; 5(2):15-8.
35. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte II. Cultivo. 2008.
36. Pérez del Molino ML. Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. Elsevier 2018. Disponible en: <http://www.elsevier.es>.
37. 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; 3(1):10-8.
38. Callisaya J, Catacora V. Validación del método de concentración con hipoclorito de sodio para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. BIOFARBO 2008; 16(1):54-60.
39. Schubert EF, Kim JK, Luo H, Xi J-Q. Solid-state lighting-a benevolent technology. Rep Prog Phys 2006; 69: 3069–99.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

40. Minion J, Sohn H, Pai M. Light-emitting diode technologies for TB diagnosis: what is on the market? *Expert Rev of Med Devices* 2009; 6(4): 341- 5.
41. Minion J, Brunet L, Pai M. Fluorescent Light Emitting Diode (LED) Microscopy for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a Systematic Review & Meta-analysis. WHO Expert Group Meeting 2009. Geneva. Disponible en: https://www.google.com/search?ei=vQ2EW_WwOaTr5gKI75eACA&q=Fluorescent+Light+Emitting+Diode.
42. Martinez MR, Sardiñas M, Garcia G, Mederos LM, Díaz R. Evaluation of BacT/ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. *JTR* 2014;2:59-64.
43. 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.
44. Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G, Ademun P, Mukkada S, Nyesiga B et al. Performance of Three LED-Based Fluorescence Microscopy Systems for Detection of Tuberculosis in Uganda. *PLoS ONE* 2010; 5 (12). Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015206>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

45. Barriga Angulo G, Solís Trejo M, Aceves Rosas A, López Álvarez L, Ramírez Cruz F, Monzalvo Hernández M E, et al. Evaluación de la prueba GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la resistencia a rifampicina en muestras extrapulmonares. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2014; 61(3): 140-4.
46. Teran R, Waard J. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. *JIFCC* 2015; 26(4):310-25.
47. Nour-Neamatollahi A, Davar Siadat S, Yari S, Hadizadeh Tasbiti A, Ebrahimzadeh N, Vaziri F. A new diagnostic tool for rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Saudi J Biol Sciences* 2016. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X16000280>
48. Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(4):349–61.
49. Boehme CC, Saacks S, O'Brien RJ. The changing landscape of diagnostic services for tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34(1):17-31.
50. Fernández de Vega FA, Esteban Moreno J, González Martín J, Palacios Gutiérrez JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España; 2005. p: 12-39.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

51. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A. Commercial Serological Tests for the Diagnosis of Active Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS Med. 2011; 8(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153457>.
52. World Health Organization. Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2011.5.
53. Steingart K. R., et al. Fluorescence versus conventional for sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis 2007; 6:570-81.
54. Inserto BacT/ALERT® MP 43-03064. Biomeriux-[Citado junio 2017]. Disponible en: <http://tbevidence.org/documents/rescentre/sop/BacTALERT%20MP.pdf>.
55. Customer Training Manual: Mycobacterial Testing With BacT/ALERT® Systems and Media. Global Customer Support K5 31JAN09-[Citado junio 2017]. Disponible en: <http://www.tbevidence.org/documents/rescentre/sop/BacTALERT%20TM.pdf>.
56. Brochure TB Ag MPT64 Rapid. Is it TB or Non-TB?- [Citado junio 2017]. Disponible en: http://www.standardia.com/es/home/product/rapid/infectiousdisease/TB_Ag_MPT64.html
57. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33 (1):159-74.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

58. Marzouk M, Ferjani A, Dhaou M, Ali MH, Hannachi N, Boukadida J et al. 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.
59. 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.
60. 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* 2011; 38(6):1393-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5454486/>.
61. Marais B, Brittle W, Painczyk K. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 203 – 7.
62. Kelamane S, Mispah P, Sandhya S, 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* 2016; 4 (3):14-9.
63. Laifangbam S, Singh HL, Singh NB, Devi KM, Singh NT. A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *KUMJ* 2009;7(27):226-30.
64. Van Deun A, Chuquiyauri R, Torrea G, Agapito J, Verdonck K, Gotuzzo E. Yield of fluorescence microscopy versus culture for tuberculosis at a middle-income country referral hospital. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(6):564-9.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

65. 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.
66. 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). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3134458/>
67. Trusov A, Bumgarner R, Valijev R, Chestnova R, Talevski S, Vragoterova C, Neeley ES. Comparison of Lumin LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009, 13:836-41.
68. 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.
69. 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* 2015; 8:596-8. Disponible en: <https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-015-1584-z>.
70. Chang EW, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2016; 47: 929–37.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

71. Nwofor A, Lawson L, Gambo A, Obasanya O, Meshak P, Jilang T et al. Optimising Mycobacterium tuberculosis detection in resource limited settings. *BMJ Open* 2014;4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004093>.
72. 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* 2018. 20 (1): 110-6.
73. AU Nyaruhirira, Toussaint M, Nemser B, Vandebriel G, Gasana M, Ben Amor Y. Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of tuberculosis in Rwanda using Zeiss Primo Star. *Pan African Med J* 2015; 21. Disponible en: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/21/198/full/>.
74. Affolabi D, Torrea G, Odoun M, Senou N, Ali Ligali M, Anagonou S et al. Comparison of two LED fluorescence microscopy build-on modules for acid-fast smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14(2):160–4.
75. Lema C, Dionne K, Ayuk L, Awasom CH, Sander M, McArthur C et al. Evaluation of the ParaLens™ LED microscope attachment versus standard fluorescence microscopy for detection of Mycobacteria. *JTR* 2013; 1(2): 14-6.
76. 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 2015. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2015/794064>.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

77. 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.
78. Torrea G, Chakaya J, Mayabi M, Van Deun A. Evaluation of the FluoreslenS™ and fluorescence microscopy blinded rechecking trial, Nairobi, Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12(6):658–63.

Anexo 1: Preparación de la tinción fluorescente.**PREPARACIÓN DE REACTIVOS****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 c.s.p.....	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.....	1 000 ml

Colorantes de contraste: puede usarse solución 0,5% de permanganato de potasio.

Solución de permanganato de potasio 0,5%

Permanganato de potasio.....	5 g
Agua destilada.....	1000 mL

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

La solución debe ser color púrpura. Si se transforma en rojiza significa que el permanganato se oxidó, y la solución debe descartarse.

Anexo 2: Elaboración del medio de cultivo Löwenstein Jensen.

Fundamento: Se han desarrollado una gran variedad de medios para cultivar a las micobacterias. Éstos pueden dividirse en tres grupos principales: los medios preparados en base de huevo, los medios de agar y los medios líquidos. El medio ideal para aislar a las micobacterias debe cumplir con los requisitos siguientes: a) ser barato y fácil de preparar, utilizando ingredientes 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 (KH_2PO_4), sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), citrato de magnesio, asparagina, glicerol, piruvato de sodio y agua destilada.

Materiales: erlenmeyer de 500 mL y 1 000 mL, probeta de 10 y 1 000, irrigador de 500 mL y 1 000 mL, tubos de 20x150 mm con tapa de rosca, gradilla, reloj contador, gasa y papel, horno de tiro de aire forzado, incubadora.

Procedimiento

1. Se pesaron las siguientes sales:

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

2. Se adicionaron las sales a los 600mL de agua destilada.

3. Se aplicó calor y se agitó alternadamente hasta que se evidenció una disolución total.

4. Se adicionaron 12 mL de glicerol y se agitó por varios segundos.
5. Se adicionaron 0,4 g de verde malaquita y se agitó por varios segundos.
6. Se mezcló la solución con 1 000 mL de huevos frescos homogenizados. Se agitó y dejó reposar durante 5 minutos.
7. Se distribuyó con el irrigador 6,5 ml del medio en tubos 20 x 150 mm.
8. Los tubos se colocaron con las tapas flojas y en plano inclinado dentro del horno en frío a una temperatura de 82 grado por una hora
9. Se dejó enfriar lentamente dentro del horno, para evitar la formación de agua de condensación.

Anexo 3: Procedimiento para realizar la tira SD BIOLINE.

Permite la distinción rápida entre el complejo *M. tuberculosis* y MNT y la identificación del complejo *M. tuberculosis* en combinación con sistemas de cultivo. El resultado de la prueba es en 15 minutos (58).

Preparación del inóculo: Si fue a partir del medio líquido: se tomaron 100 μ L de la botella MP y se transfirieron a la tira. Si fue a partir del medio sólido: se realizó una suspensión bacteriana con una asada de 3 a 4 colonias del medio sólido, positivo a BAAR y se resuspendió en 200 μ L del buffer o agua destilada estéril y/o 100 μ L del fluido de condensación de los tubos y se aplicó directamente.



Nota: La intensidad del color de la banda depende de la concentración del Ag MPT64 en el medio de cultivo.