

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Utilidad de la microscopia de fluorescencia LED para el diagnóstico de la tuberculosis en el Hospital Benéfico Jurídico. Enero-Junio/ 2023.



AUTOR: Dra. Mariadna Alfonso Méndez

TUTOR: Dra. María Rosarys Martínez Romero. MSc

ASESOR: Lic. Raúl Díaz Rodríguez. DrC.

**Tesis para optar por el título de Especialista de Primer grado en
Microbiología.**

La Habana, 2023

Dedicatoria: A mis padres e hijos.

Agradecimientos:

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

A mis padres, a mi hermano y principalmente a mis hijos por apoyarme y quererme incondicionalmente.

A mi cuñada por ayudarme siempre que lo necesite.

A mi tutora María Rosarys por su paciencia, devoción, apoyo incondicional, por brindarme sus conocimientos, tantas horas de trabajo. Sin ella no hubiese sido posible esta investigación.

A mi asesor Raúl por su profesionalismo.

A Misle y Grechen por brindarme su amistad, su ayuda y apoyo incondicional.

A Milagro, Mirita, Adita y en general a todas las personas que me ayudaron y apoyaron durante el procesamiento de muestras en el laboratorio de microbiología del Hospital Benéfico Jurídico.

A las profesoras Ana Margarita y Odisney por ayudarme y brindarme sus conocimientos.

A la familia que se ha creado durante estos tres años de estudio por apoyarme y estimularme a seguir adelante.

A mis amigas de siempre por estar conmigo y apoyarme (Yudisel, Yilian y Mírela)

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

Muchas Gracias.

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN:.....	3
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	3
1.3 OBJETIVOS	3
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Breve historia de la tuberculosis	4
2.2 Taxonomía y clasificación de las Micobacterias.....	5
2.3 Características generales de las micobacterias.....	6
2.4 Estructura celular de las micobacterias.....	7
2.5 Epidemiología de la tuberculosis.....	8
2.6 Situación Epidemiológica en Las Américas	9
2.7 Situación epidemiológica en Cuba	10
2.8 Diagnóstico de las Micobacterias	11
2.8.1 Métodos convencionales.....	11
Baciloscopía.....	11
Cultivo Bacteriológico.....	12
2.8.2 Pruebas de identificación de <i>CMTB</i>	13
2.8.3 Técnicas Moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis recomendada por la OMS.	14
Plataforma GeneXpert	14
2.8.4 Otras plataformas recomendadas para el diagnóstico de la tuberculosis.....	15
Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop Mediated Isothermal Amplification).....	16
Hibridación inversa de alta complejidad para la detección de resistencia a la pirazinamida.....	17
Ensayos Truenat MTB, MTB Plus y MTB-RIF Dx	17

Pruebas con sondas lineales (LPA, por su sigla en inglés).....	18
2.8.5. Otras técnicas de identificación. Ensayo de flujo lateral para la detección de lipoarabinomanano (LAM) en orina.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
IV. RESULTADOS	26
V. DISCUSIÓN.....	30
VI. CONCLUSIONES.....	36
VII. . RECOMENDACIONES.....	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
IX. ANEXOS.....	47

Resumen:

Las ventajas y buen desempeño de la microscopía de fluorescencia (MF) LED llevan a la OMS a recomendar su uso desde el 2011. El objetivo del estudio fue determinar la utilidad de la MF LED para el diagnóstico de la tuberculosis (TB). Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal. Se estudiaron 145 muestras clínicas recibidas en el laboratorio de microbiología del Hospital Benéfico Jurídico de Enero-Junio/ 2023. A cada se le realizó tinción fluorescente y de Zielh Neelsen (ZN). Se utilizó el cultivo como prueba de referencia. Se calcularon y compararon los indicadores de desempeño y se analizaron las variables sociodemográficas. Por MF LED se identificaron: 32 frotis positivos a bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) ,18 más que por la tinción de ZN, y 10 frotis con escasos bacilos (8 más que la técnica convencional). Se identificaron 8 casos positivos a BAAR que fueron negativos por la coloración de ZN. La sensibilidad de MF LED (85,71%) y el índice de Youden (0,75) fue mayor que las observadas con ZN (61,90% y 0,61, respectivamente). Predominó el sexo masculino y el grupo etario de 31 a 59 años en los casos con TB. La diabetes mellitus (21,1%), el tabaquismo (13,5%), y otras enfermedades no transmisibles (10,2%) fueron los factores de riesgo más predominantes en los casos con TB. La MF LED permite el diagnóstico confiable, y es eficiente para la identificación de los casos con TB estudiados, particularmente en muestras paucibacilares lo que avalaría su introducción en el algoritmo del laboratorio de Hospital Benéfico Jurídico y fortalece al Programa Nacional de Control y Prevención de la enfermedad en Cuba. Los factores de riesgo predominantes en esta investigación demuestran el comportamiento estable entre los grupos vulnerables reconocidos, por lo hay que intensificar las intervenciones comunitarias, el seguimiento y el manejo adecuado de estos pacientes.

I.INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad transmisible causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) y una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La TB constituye un importante problema de salud a nivel mundial, en países de medianos y bajos ingresos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca de una cuarta parte de la población mundial está infectada por CMTB. (1)

El diagnóstico temprano de la TB constituye la principal limitación de los Programas de Control. La baciloscopía (BK) es uno de los métodos iniciales para el diagnóstico de la enfermedad. Es una prueba sencilla, de fácil procesamiento y bajo costo, además está disponible en la mayoría de los países en vías de desarrollo. Sin embargo, dada la variabilidad de la sensibilidad (S) de esta herramienta diagnóstica (22 - 43% para un solo frotis y hasta un 60% en condiciones óptimas del cultivo), hace que la utilidad sea limitada, sobre todo, en muestras de esputo con escasos bacilos. El cultivo en medio sólido es más sensible que la BK, pero requiere de técnicas más complejas y los resultados demoran entre 30 y 60 días. (2,3)

La microscopía de fluorescencia (MF) LED (*Light-Emitting Diodes*, por sus siglas en inglés) se desarrolla para brindar a los países con recursos limitados acceso a los beneficios de microscopía de fluorescencia. Esta técnica tiene como ventajas, en primer lugar, que los microscopios ópticos existentes se convierten a fuentes de luz LED con adaptadores, por lo que son menos costosos, además requieren menos energía, pueden funcionar con baterías, consume menos tiempo de observación y lectura porque se examinan con menos aumento que la tinción de Zielh Neelsen (ZN). Además la calidad del polvo de auramina comercial, es menos variable que la fuchina básica, por lo que la tinción puede ser más fácil de controlar. (4,5)

El buen desempeño de la MF LED lleva la OMS a recomendar su uso como una alternativa para la microscopía convencional con la tinción de ZN en laboratorios de alto y bajo volumen de procesamiento de muestras y que esta debe sustituirse de manera escalonada. (4,6)

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) contrae el compromiso de apoyar a los países de la región para acelerar la implementación de la Estrategia Fin de la TB y se conviertan en la primera región del mundo en alcanzar la eliminación de ésta enfermedad como problema de salud pública. Cuba se encuentra entre los primeros países (tercer lugar de la región de Las Américas) con una baja incidencia de TB (≤ 10 casos por cada 100 000 habitantes), por lo que puede estar entre los primeros en avanzar hacia la eliminación de esta temible enfermedad. (7)

En Cuba, el Programa Nacional de Control y Eliminación de la TB (PNCET) perteneciente a la Dirección Nacional de Epidemiología, del Ministerio de Salud Pública, cuenta con un Plan Estratégico Nacional, tomando en cuenta la Iniciativa Mundial de Fin de la TB, donde dentro sus objetivos se encuentra implementar técnicas de laboratorio que aumenten la sensibilidad y rapidez en la detección de casos. (8)

Con el fin de alcanzar un progreso sostenido hacia la eliminación de la TB, es necesario adaptar las estrategias actuales para el de control de esta enfermedad. Uno de los pilares para lograr este propósito es mejorar la calidad del diagnóstico. (7)

La Habana notifica alrededor de 25 % del total de los casos nuevos de TB del país. Al cierre del año 2021 la tasa de notificación de casos nuevos y recaídas reporta un 7,3 por 100 000 habitantes, por encima de la media nacional (6,3 por 100 000 habitantes). (9,10).

En el año 2018, la Dra. Pedrera realiza un estudio de validación y evaluación de la MF LED en muestras de esputo en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tb, Lepra y Micobacterias del IPK (LNRI-TBLM-IPK), y demuestra la mayor sensibilidad de esta técnica (81,82 % para la tinción fluorescente contra 54,55 % por ZN), y que esta herramienta es más eficiente para identificar frotis con escasos bacilos que la tinción de ZN al identificar mayor número de casos positivos. (11)

1.1 JUSTIFICACIÓN:

La Habana es la provincia de mayor densidad poblacional e importancia económica, donde se concentran los principales focos generadores de la enfermedad y su comportamiento determina, en buena medida, los resultados de la nación. Cuanto mayor es el número de enfermos que están expectorando bacilos en la comunidad, mayor es la diseminación de la TB. (10)

El Hospital Neumológico Benéfico Jurídico es el centro de referencia Nacional de Enfermedades respiratorias donde se atienden pacientes de todo el país, incluidos los casos de TB de la provincia Habana complicados o los pacientes donde se ha detectado alguna resistencia a los fármacos antituberculosos. Por lo que se hace necesario incluir pruebas de laboratorio más sensibles para mejorar la detección de casos de TB.

La identificación de los casos infecciosos es el principio de la solución para el problema de los enfermos y, fundamentalmente, para un problema de salud pública; por lo que la implementación de la MF LED puede mejorar la detección de casos de TB pulmonar BK positiva y permitirá evaluar esta técnica en las condiciones programáticas de rutina en el Laboratorio del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico de La Habana.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La MF LED se corresponde con el cultivo Löwenstein Jensen (LJ), presentando aceptables parámetros de desempeño, lo que avala su uso en la detección de una mayor tasa de casos de TB en la Habana.

1.3 OBJETIVOS

1. Determinar el rendimiento de la microscopia fluorescente LED para el diagnóstico de laboratorio de Tuberculosis en muestras de pacientes sospechosos del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico
2. Describir variables sociodemográficas de los casos con sospecha de tuberculosis, atendidos en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico, en el periodo de estudio.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Breve historia de la tuberculosis

La TB es una enfermedad bacteriana infectocontagiosa conocida hace más de 3 millones de años. Es considerada la infección más antigua y más prevalente que ha azotado a la humanidad. Esta afección sólo aparece claramente identificada en tiempos de Hipócrates (460-370 a.C.), quien acuñó el término de "tisis" o consunción. La tisis se define como la enfermedad más extendida y fatal de todos los tiempos. Se han registrado sus huellas en momias egipcias e incaicas. (12, 13,14)

La etiología de la TB no pudo aclararse hasta el 24 de marzo de 1882, donde el eminente científico Robert Koch (1843-1910), presentó su trascendental descubrimiento en la Sociedad de Fisiología de Berlín. Koch, en pocos meses aisló el bacilo, descubrió una tinción especial para demostrarlo en frotis de esputo, lo cultivó en medios especiales que desarrolló y lo más revelador fue la paciencia que tuvo para esperar que los cultivos, en sus medios primitivos, dieran resultado. Con el paso de los días y de las semanas, estuvieron en condiciones de demostrar la existencia de un microorganismo nuevo, nunca antes cultivado y de crecimiento más lento que ninguno de los hasta entonces conocidos: el bacilo de la TB, demostrado el agente etiológico y la creación de nuevos métodos de estudio de las enfermedades infecciosas y llamado el llamado fenómeno de Koch, (reacción de tuberculina). (10,13)

Las condiciones de vida eran tan precarias a comienzos de la revolución industrial. En los siglos XVII y XVIII, la TB causa la cuarta parte de todas las muertes de adultos en Europa. (13,15)

Los progresos sucedieron rápidamente y con el descubrimiento de métodos diagnósticos y conocimiento de la enfermedad, los sanatorios se convirtieron en el eje fundamental del tratamiento, se iniciaron los primeros programas de terapia ocupacional y de rehabilitación laboral. La era moderna de la TB comienza en 1946 con la utilización de agentes antimicrobianos demostrando

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). (15)

2.2 Taxonomía y clasificación de las Micobacterias

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales*. Posee un solo género: *Mycobacterium*, hay 189 especies reconocidas oficialmente, las que han sido agrupadas según su patogenicidad. (16,17)

Complejo *M. tuberculosis*, incluye: *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii* (causa rara de TB humana), *M. caprae* (patógeno bovino), *M. microti* (patógeno roedores), *M. mungi* (mangostas), *M. pinnipedii* (patógeno para focas), *M. orygis* (patógeno para animales y humanos en África y Asia) y *M. surricatae* (suricatas). Mientras *M. tuberculosis* y *M. africanum* son especies adaptadas a humanos, las otras especies prefieren anfitriones animales (específicos) con un posible contagio zoonótica a los humanos, principalmente de *M. bovis* a través del ganado. Las dos especies adaptadas a humanos comprenden ocho linajes filogenéticos (L1–L8), siendo L1–L4 y L7–L8 *M. tuberculosis sensu stricto*, L5 y L6 *M. africanum*. En cuanto a su repartición geográfica, L2 y L4 son las más extendidas, mientras que L1 y L3 se distribuyen de forma intermedia, L5 y L6 se restringen a África Occidental, y L7 se encuentra sólo en Etiopía. *M. africanum* es responsable de hasta el 40% de la TB en África Occidental. (3)

Complejo *Mycobacterium leprae*, incluye: *M. leprae* y *M. leprae-murinum*, productores de lepra humana y en roedores respectivamente.

Micobacterias ambientales: son más de 180 las especies reconocidas, dentro de las cuales las más importantes son las siguientes, en nivel de patogenicidad descendente de 1 a 3 (3):

1-*M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. shimoidei*, *M. abscessus*.

2. MAC, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. celatum*.

3. *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*.

III. 3. Morfología de las micobacterias

Las micobacterias son bacilos rectos y delgados, de forma general miden aproximadamente 0,2 - 0,6 x 1-10 micras (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. Las especies de este género son considerados aerobios estrictos y obtienen la energía de la oxidación de compuestos sencillos del carbono. (10,18)

2.3 Características generales de las micobacterias

Los medios para el cultivo primario de micobacterias deben incluir uno de tipo no selectivo y otro selectivo. Los tipos selectivos contienen antibióticos para evitar la proliferación excesiva de bacterias y hongos contaminantes. Se conocen tres fórmulas generales: medio de agar semi-sintético (como el middlebrook 7H10 y 7H11), medios de huevo espesado (LJ) y los caldos (Middlebrook 7H9 y 7H12). (10)

Las micobacterias tienen una velocidad de crecimiento mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. *CMTB* tiene un tiempo de generación aproximadamente de 18 horas, por lo que necesita de 3-4 semanas de incubación a 37 °C, para formar colonias visibles macroscópicamente. Las formas saprófitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan bien entre 22-37 °C, producen más pigmento y son menos ácido-resistentes que las formas patógenas. *M. leprae* crece in vitro. Son resistentes a la decoloración con alcohol o ácido, debido a la composición de la pared celular que es rica en lípidos de alto peso molecular. (18)

Las micobacterias poseen una elevada resistencia a los desinfectantes, por la naturaleza hidrófoba de su superficie celular y su proliferación en cúmulos, pero son destruidas por la pasteurización y la esterilización al calor. Son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir durante largos períodos en esputos secos u otros líquidos corporales. Estos hechos son de importancia para la prevención de las infecciones por micobacterias, tanto en el medio hospitalario como en la comunidad. (10)

Las diferentes especies varían en su pigmento, morfología macroscópica y microscópica, sus colonias pueden ser rugosas, color hueso crema, elevadas convexas y de bordes irregulares (*CMTB*); lisas y transparentes, con bacilos sin agrupaciones discernibles (*M. avium-intracellulare complex*), o de aspereza intermedia. Microscópicamente se pueden observar desde formas cocoides a largos filamentos, ocasionalmente forman ramificaciones, estas se observan en cultivos enriquecidos (*M. kansasii*). (18)

La temperatura ideal para su crecimiento es de 32-37°C, y su pH óptimo es entre 6,5 - 6,830. En dependencia de la producción de pigmentos se dividen en: fotocromógenas (requieren luz para la formación de pigmentos), escotocromógenas (forman pigmento con y sin presencia de luz) y no cromógenas (no producen pigmentos). (18)

Estos bacilos son difíciles de teñir con la tinción de gran, aunque se consideran débilmente gran positivos. 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. (10)

2.4 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 lipoarabinomanano (LAM). (10)

2.5 Epidemiología de la tuberculosis

La TB sigue siendo una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad el mundo. Se reporta que un total de 1,6 millones de personas murieron de TB en 2021 entre ellas 187 000 personas con VIH en todo el mundo. La TB es la decimotercera causa de muerte y la enfermedad más mortífera por detrás de la COVID 19 y por delante del VIH y el Sida. Se estima que en ese mismo año se enfermaron por este patógeno 10,6 millones de personas en todo el mundo (6 millones de hombres, 3,4 millones de mujeres y de niños 1,2 millones). (19)

Aunque la TB está presente en todos los países y grupos de edades, es una enfermedad que se puede curar y prevenir. El mayor número de nuevos casos de TB se produjo en la Región de Asia Sudoriental (46%), seguida de la Región de África (23%) y de la Región del Pacífico Occidental (18%). Alrededor del 87% de los nuevos casos se produjeron en los 30 países con alta carga de TB, y más de dos tercios del total mundial se encuentran en Bangladesh, China, Filipinas, la India, Indonesia, Nigeria, el Pakistán y la República Democrática del Congo. Las personas inmunodeprimidas, como las que viven con el VIH o padecen de desnutrición o diabetes, o las que consumen tabaco tienen un mayor riesgo de enfermarse. (19)

La OMS ha declarado la TB como una emergencia mundial pues está fuera de control en muchas partes del mundo, a pesar de los programas de TB establecidos en cada país. En el 2021, a nivel mundial hubo 2,2 millones de nuevos casos de TB que se le atribuyó a la desnutrición, 740 000 al consumo de alcohol y 690 000 al hábito de fumar. (10, 19,20)

La Estrategia Fin a la TB que abarca un paquete de intervenciones organizadas en torno a los tres pilares de la integración: atención y prevención centradas en el paciente, políticas audaces y sistemas de apoyo e intensificar la investigación e innovación, las cuales deberían adaptarse a nivel de país por lo

que ha desarrollado un programa específico y ambicioso que pretende su erradicación para el año 2050. (10, 19,20)

Si se analiza la situación actual de la TB a nivel global, es un fiel reflejo de las enormes diferencias económicas y sociales que existen entre los distintos países y a pesar de las mejorías persiste la TB como un problema de salud. Las metas e indicadores del nuevo sistema de acciones contra la TB, están reflejados en los 17 objetivos de desarrollo sostenible para 2030, adoptados por la Organización de las Naciones Unidas y cuya agenda global comenzó el 1 de enero del 2016. Una de sus metas es poner fin a la epidemia mundial de TB, con énfasis en la interdependencia y el sinergismo entre el desarrollo socioeconómico y la salud. (21, 22,23)

2.6 Situación Epidemiológica en Las Américas

La TB en la Región de las Américas continúa siendo un problema de salud pública. Esta situación refleja la persistencia de los condicionantes sociales y factores de riesgo que afectan de manera más directa a las poblaciones vulnerables. A pesar de ello, en el continente hay algunos países que se encuentran más cerca de la eliminación de la enfermedad como problema de salud pública. Los esfuerzos que realizan los programas nacionales, la mayoría con recursos propios, se deben acelerar para poder cumplir con las metas de la Estrategia Fin de la TB y con los compromisos internacionales adquiridos por los países. (24)

La OMS estima que en el 2019 hubieron 290 000 casos nuevos y recaídas de TB en la Región de las Américas (un aumento con respecto al 2018). El 88,1% de los casos se encontraban en 12 países; un poco más de la mitad se concentran en Brasil (33,1%), Perú (13,4%) y México (10,3%). La tasa de notificación en ese mismo año fue de 23,4 casos por cada 100 000 habitantes. Se estima que el 10% de los pacientes de las Américas tenían infección TB/VIH y 3,7% presentaban TB resistente a la rifampicina o multirresistente (TB-RR/MDR). (24,25)

A partir del inicio de la pandemia de COVID-19 en el primer trimestre del 2020, se vio alterada la prestación de servicios de salud en general, incluyendo los de

TB, debido a las medidas de confinamiento, al temor de la población a contagiarse en los servicios de salud y al redireccionamiento del personal hacia la atención de la pandemia. Esto ha afectado a las intervenciones de prevención y control de la TB en todos los países y amenaza con revertir los logros alcanzados hacia el cumplimiento de las metas internacionales. Además, el impacto de la pandemia de COVID-19 sobre la economía y los niveles de pobreza representa más de una década perdida, lo que contribuye a incrementar los determinantes sociales de la TB. (24,25)

En el año 2020 se diagnosticaron 18 300 niños con TB en las Américas, la mitad de ellos menores de 5 años. La COVID 19 ha tenido un impacto desproporcionado en los niños y adolescentes, lo que ha provocado un aumento de la transmisión en sus hogares, una reducción de la vigilancia activa, menos ocasiones para acudir a un centro de salud y un seguimiento limitado del tratamiento. (25)

En el 2020 en la región se reportaron 291 000 casos de y 27 000 muertes por TB, de las cuales 29% (7 900) correspondieron a la coinfección por TB/VIH. En el 2021 se estimaron 309 000 casos de TB y se notificaron 215 116 (70%) y la muerte estimada para la región fueron 32 000 de las cuales (11%) correspondieron a la coinfección por TB/HIV. Se diagnosticaron 4 820 casos de TB RR/MDR, de estos el 95 % al inicio del tratamiento. (26, 27)

2.7 Situación epidemiológica en Cuba

Cuba es uno de los países con menor incidencia en el mundo, con una tasa inferior a 10 infectados cada 100 mil habitantes, por lo cual se trabaja en el cumplimiento de los objetivos de la Estrategia Fin de la TB, de la OMS. Para lograr este objetivo es fundamental el diagnóstico oportuno, el tratamiento y cortar la cadena de transmisión. En el sistema de salud cubano se destacan las potencialidades de tener un servicio gratuito para el ciento por ciento de la población, la eficacia de los fármacos empleados en el procedimiento, la garantía de seguridad alimentaria-laboral para los pacientes y el monitoreo constante por el médico y la enfermera de la familia. (28)

Al comparar 2020 con 2019, se constató una disminución en el número de muestras clínicas (esputo) enviadas; también la reducción de las correspondientes a la vigilancia de la resistencia de *M. tuberculosis*. El comportamiento actual indica un detenimiento del incremento de la enfermedad, al cierre de 2021 se registran una tasa de incidencia (4,3) para una tasa de notificación de (4.7) x 100 mil habitantes. (9 ,29)

2.8 Diagnóstico de las Micobacterias

El diagnóstico de certeza de TB en el laboratorio se demuestra mediante la presencia de bacilos en una muestra de la lesión por medio de la BK (examen microscópico), el cultivo o una prueba molecular rápida (como el ensayo Xpert MTB/ RIF, Xpert MTB/ Ultra RIF o el TB-LAMP). (11)

2.8.1 Métodos convencionales

Baciloscopía

En muchos países la BK continúa siendo la primera prueba diagnóstica utilizada en grupos de pacientes sospechosos de TB no priorizados para el empleo de los métodos rápidos moleculares. Es simple, sencilla, económica y eficiente para detectar los casos infecciosos. (11)

Para que sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo, entre 5 000 y 10 000 bacilos por mililitro de muestra. Este contenido de bacilos se encuentra en los pacientes con TB pulmonar, especialmente en aquellos cuya lesión es severa, con cavitación. Estos pacientes son los que mayores posibilidades tienen de transmitir los bacilos manteniendo la enfermedad en la comunidad. (11)

La BK, sin embargo, tiene una sensibilidad limitada para el diagnóstico de la enfermedad extrapulmonar y en ciertos grupos de pacientes, como los niños y las personas que viven con VIH. La técnica se basa en la propiedad de ácido alcohol resistencia que tienen las micobacterias de unir la fucsina fenicada o auramina y retenerlas frente a la acción de decolorantes como la mezcla de ácido y alcohol. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen en la pared celular. (11)

La coloración de ZN ha sido la técnica más empleada para el diagnóstico de TB en los países de América Latina durante muchos años. Comparado con la microscopía de fluorescencia (MF), la microscopía convencional, con tinción de ZN, tiene la ventaja que requerir un entrenamiento más sencillo, ya que la capacidad de identificar el bacilo por esta metodología es más fácil de adquirir. (11)

La MF es al menos 10% más sensible que la microscopía de ZN. Es una técnica muy rápida de realizar, reduce el tiempo necesario para la realización de la lectura y requiere personal adiestrado, está especialmente recomendado para laboratorios con alta carga de trabajo. También hay que tener en cuenta que los frotis teñidos por auramina pueden reteñirse por ZN, esta tinción permite distinguir ciertas características morfológicas, pero no permite diferenciar con certeza las especies de micobacterias. (10)

La MF convencional utiliza lámparas de mercurio. La MF con lámpara LED, comparada con esta metodología ofrece considerables ventajas ya que no requiere de un cuarto totalmente oscuro para la lectura de los extendidos. Además la MF LED tiene importantes ventajas operativas sobre la lámpara de mercurio tradicional: elevada vida útil, no genera calor y no tiene los riesgos de contaminación del ambiente en caso de rotura. (11)

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 sensibilidad 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 la perseverancia del microscopista ante una muestra sospechosa de TB. (11)

Cultivo Bacteriológico

El cultivo es el método de diagnóstico bacteriológico de mayor sensibilidad y se considera la prueba de oro para el diagnóstico de la TB. Puede evidenciar un

mínimo de 10 a 100 BAAR en una muestra y es el único método válido para seguir la evolución de los casos y confirmar su curación. Para la TB extrapulmonar es el mejor método de diagnóstico. Permite la identificación de *CMTB* y realizar las pruebas de susceptibilidad. (16)

Existen diferentes medios de cultivo para micobacterias, están los que se preparan a base de huevos (como el LJ) y los medios líquidos. El cultivo en LJ es medio sólido es más sensible que la BK, pero requieren de técnicas más complejas y demoran de 30-60 días para que las colonias puedan ser detectadas y se pueda realizar la identificación final a través de las pruebas bioquímicas. (30)

El sistema automatizado Bact Alert 3D, utiliza el medio líquido para la detección de *M. tuberculosis* y tiene una alta sensibilidad y especificidad. Es un sistema no invasivo, permite la monitorización y detección rápida, de forma sensible y confiable de las micobacterias y utiliza un método colorimétrico de alta sensibilidad para detectar la producción de CO₂, producto del metabolismo micobacteriano, además no necesitan de ninguna instrumentación por parte del operador. (30,31)

Actualmente existen dos versiones del equipo, el Bactec™ de acuerdo con su capacidad de incubación y el 320 o 960 que hacen referencia al número de tubos que se pueden ingresar en el equipo. (32)

2.8.2 Pruebas de identificación de *CMTB*

Existen pruebas de identificación rápida, como los ensayos inmuno cromatográficos, que permite diferenciar los aislados del *CMTB* de las MNT. Dentro de ellos están: el BD's MGIT TBc ID, el Tauns' Capilia TB (Japón) y el SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid Test (Corea). Todo son ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral. El BD y el SD Bioline detectan el antígeno MPT64, mientras que el Capilia detecta el antígeno MPB64; ambas son proteínas secretoras específicas del *CMTB*. (33)

2.8.3 Técnicas Moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis recomendada por la OMS.

Plataforma GeneXpert

El ensayo Xpert MTB/RIF, es un sistema cerrado que integra y automatiza el procesamiento de la muestra, la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la detección de las secuencias diana mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Es un PCR en tiempo real, integrado y semicuantitativo, que identifica el *CMTB* y detecta las mutaciones más frecuentes en el gen *rpoβ* asociadas con resistencia a rifampicina (RIF). (34)

El ensayo puede realizarse directo de muestra de esputo o en sedimentos concentrados preparados a partir de expectoración inducida, obteniéndose resultados en menos de dos horas. Es un método actualmente recomendado por la OMS para el diagnóstico de la TB y la detección de resistencia a RIF. (34)

Estudios previos reportan una sensibilidad y especificidad del Xpert MTB RIF de 85% y 98% respectivamente, usando el cultivo como referencia estándar. En el estudio la prueba molecular reveló mayor sensibilidad en pacientes a microscopia positiva (99%), en tuberculosis pulmonar (87%), adultos (82%) y PVV (81%). (35)

El ensayo Xpert Ultra, también utiliza la misma plataforma GeneXpert. Cepheid lo desarrolló para superar las limitaciones del cartucho Xpert MTB RIF. Para mejorar la sensibilidad el ensayo Xpert Ultra incorpora dos objetivos de amplificación multicopia (*IS6110* y el *IS1081*) y tiene una cámara de reacción de ADN más grande que Xpert MTB/RIF (50 µL PCR en Xpert Ultra contra 25 µL en Xpert MTB/RIF). También incluye una amplificación de ácido nucleico totalmente anidada, ciclos térmicos más rápidos y fluidos, además de enzimas mejoradas. Esto da como resultado que el límite de detección del Xpert Ultra sea de 16 unidades formadoras de colonias bacterianas (ufc) por mililitro, en comparación con 114 ufc/mL para Xpert MTB/RIF. (34)

Para mejorar la precisión de la detección de resistencia a la RIF, se incorpora el análisis basado en la temperatura de fusión. Específicamente, cuatro sondas identifican la resistencia a la RIF mediante mutaciones gen *rpoB* por medio de la detección de cambios en la temperatura de fusión lejos del rango de referencia de tipo salvaje. (34)

2.8.4 Otras plataformas recomendadas para el diagnóstico de la tuberculosis

Plataforma Abbott Molecular: tiene dos pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, *nucleic acid amplification test*, por sus siglas en inglés): una para detección de *CMTB* (*RealTime MTBt*), que utiliza como blanco los elementos genéticos el *IS6110* y el gen *pab* y otro para la detección de resistencia a la RIF e INH (*RealTime BTT RIF/INH*), para el que utiliza ocho sondas marcadas con colorantes para detectar variantes en la región determinante (RRDR) del gen *rpoB* (para detectar la resistencia a RIF) y cuatro sondas para detectar resistencia a la INH (con dos sondas cada una para los genes *katG* e *inhA*). (34)

Plataforma Becton Dickinson (BD): se basa en una PCR en tiempo real multiplexada (*BD MAX™ MDR-TB*). Para detectar el *CMTB* utiliza como blanco los elementos genómicos multicopia *IS6110* e *IS1081*, así como un objetivo genómico de una sola copia. Para la detección de resistencia a RIF, la prueba se dirige a los codones RRDR 507–533 *Escherichia coli* nomenclatura (426–452 nomenclatura *Mtb*) del gen *rpoB*; para la detección de resistencia a INH, se dirige tanto a la región promotora de *inhA* como al codón 315 del gen *katG*. (34)

Plataforma Bruker-Hain Diagnostics: tiene dos NAAT en tiempo real: el *FluoroType® MTB* (detecta el *CMTB*) y el *FluoroType MTBDR* (detecta *CMTB* y resistencia a RIF e INH). La prueba MTBDR utiliza PCR en exceso asimétrico y sondas de encendido/apagado de luz. Los genes diana son *rpoB* para la detección de TB y resistencia a la RIF; el promotor *inhA* y el gen *katG* para detectar la resistencia a la INH. Las plataformas utilizadas para la amplificación

y detección son *FluoroCycler*® para el ensayo MTB y *FluoroCycler XT* para el ensayo MTBDR. (34)

Plataforma Roche Diagnostics (Roche): dispone de dos NAAT: el ensayo *Cobas*® MTB para detectar *CMTB* y *Cobas*® MTB RIF/INH para detectar la resistencia a los medicamentos (RIF e INH). El *Cobas*® MTB detecta tanto el ARN ribosómico 16S (ARNr) como los genes *esx* como genes diana. Para la detección de la resistencia a los medicamentos se utiliza la región RRDR (para la RIF) y región promotora *inhA* y el gen *katG* (para la I MH. (34)

Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop Mediated Isothermal Amplification)

El TB LAMP (Eiken Chemical Company, Tokio, Japón) es otro método molecular recomendado por OMS para reemplazar la BK. Puede ser implementado en laboratorios de baja complejidad. Es un poco menos sensible que el Xpert para detectar casos con BK negativa y cultivo positivo, en particular aplicado al diagnóstico de pacientes VIH positivos. (33)

El principio de esta técnica se basa reacción de amplificación isotérmica mediada por bucles. Es un ensayo manual que requiere menos más de 1 hora para realizar y se puede leer a simple vista bajo la luz ultravioleta. Tiene un rendimiento relativamente alto, no requiere instrumentos sofisticados, es relativamente fácil de usar, requiere poca infraestructura y tiene requisitos de bioseguridad similares a los de la BK de esputo. Esta herramienta está siendo explorada para su uso como una prueba una rápida de diagnóstico, la cual sería una alternativa a la microscopía de frotis en entornos de recursos limitados. (34)

El procedimiento consta de tres pasos: preparación de muestras (las bacterias son tratados mediante el calor para la inactivación y lisis bacteriana, este paso incluye también la extracción de ADN), amplificación y visualización (el tubo de ensayo contiene una molécula de unión al ADN de doble cadena que emitirá fluorescencia bajo la luz ultravioleta, por lo que se puede detectar directamente la presencia del microorganismo mediante la observación. (34)

Hibridación inversa de alta complejidad para la detección de resistencia a la pirazinamida.

La pirazinamida es un antibiótico importante para el tratamiento de la TB sensible a los medicamentos debido a su capacidad de erradicar los bacilos persistentes, así como las propiedades sinérgicas con otros antibióticos. La monorresistencia a este fármaco es muy poco frecuente; sin embargo, se asocia fuertemente con frecuencia con TB multidrogoresistente (TB MDR) y TB resistente RIF (TB RR), con un estimado de 30-60% de MDR/RR-TB también resistente este medicamento. Por tanto se hace necesario detectar la resistencia en aquellas personas diagnosticadas con TB-RR, para que los médicos puedan tomar una decisión sobre si incluir o excluirlo en el régimen de tratamiento. (34)

Una de estas tecnologías fue desarrollada por Nipro (Osaka, Japón), denominada *Genoscholar™ PZA-TB*. Es un LPA con tecnología basada en hibridación inversa. Este ensayo está comercialmente disponible. Comparado con *MTBDRplus* y *MTBDRsl*, el *Genoscholar PZA-TB LPA* no incluye sonda mutante específica porque las mutaciones de resistencia están muy extendidas en todo el gen *pncA* sin mutaciones predominantes. En cambio, el ensayo *Genoscholar PZA-TB* tiene como objetivo un fragmento de 700 pares de bases (pb) que cubre todo el gen *pncA* y la región promotora hasta el nucleótido-18 del tipo salvaje de la cepa de referencia H37Rv. (34)

La primera versión del ensayo contenía 47 sondas, que cubrían el gen promotor *pncA* y marco de lectura abierto. La segunda versión contiene 48 sondas, tres de las cuales (*pncA* 16,17 y 35) representan mutaciones silenciosas que se conoce que son marcadores genéticos no asociados con resistencia a pirazinamida: Gly60Gly (sonda 16), Ser65Ser (sonda 17) y Thr142Thr (sonda 35). (34).

Ensayos Truenat MTB, MTB Plus y MTB-RIF Dx

Estos ensayos (de la Molbio Diagnostics, Goa, India), pueden utilizarse en laboratorios periféricos con una infraestructura mínima y los técnicos con una

formación mínima, además los resultados se obtienen en menos de 1 hora. (34)

El Truenat MTB y MTB Plus se utilizan como pruebas diagnósticas iniciales para la TB, mientras que MTB-RIF Dx se utiliza como prueba refleja para detectar la resistencia a la RIF en aquellos con resultados positivos en las pruebas iniciales de Truenat. (34)

Estas pruebas utilizan una micro-PCR en tiempo real para la detección del *CMTB* y la resistencia a la RIF en el ADN extraído a partir de una muestra de esputo. Utilizan dispositivos automatizados (que funcionan con baterías) para extraer, amplificar y confirmar la presencia de loci de ADN genómico específico, lo que permite el diagnóstico rápido. Si el resultado del ensayo Truenat MTB es positivo, el usuario puede tomar otra alícuota del DNA extraído y ejecutar el ensayo MTB-RIF Dx para detectar la presencia de mutaciones seleccionadas asociadas a la resistencia a la RIF. (34)

Pruebas con sondas lineales (LPA, por su sigla en inglés)

Las LPA son una familia de pruebas de ADN que utilizan tiras reactivas que pueden detectar el *CMTB* y determinar su perfil de farmacorresistencia. Esta determinación se realiza mediante el patrón de unión de los amplicones con las sondas que tienen como diana partes específicas del genoma del *CMTB*, mutaciones comunes asociadas a la resistencia a los medicamentos contra la TB o la correspondiente secuencia de ADN de tipo salvaje (no mutada). Estas pruebas son técnicamente más complejas de realizar que la prueba Xpert MTB/RIF; sin embargo, pueden detectar la resistencia a una gama más amplia de fármacos de primera y segunda línea (por ejemplo: la INH, las FQL y los fármacos inyectables) y los resultados se pueden obtener en 5 horas. (36)

Existen dos grandes grupos de pruebas:

- Las que detectan el *CMTB* y las que detectan la resistencia a fármacos de primera línea (conocidas como LPA de primera línea), como GenoType MTBDR*plus* (v. 1 y v. 2) y Genoscholar NTM+MDRTB II.
- Las que detectan la resistencia a fármacos de segunda línea (conocidas como LPA de segunda línea), como GenoType MTBDR*sl*. (36)

2.8.5. Otras técnicas de identificación. Ensayo de flujo lateral para la detección de lipoarabinomano (LAM) en orina

Es una prueba que detecta un antígeno polisacárido de las micobacterias, mediante cromatografía de flujo lateral (*Determine TB-LAM*, Alere Inc, Waltham, EEUU, luego Abbott, California, EEUU) en orina. Fue recomendada para asistir al diagnóstico de TB pulmonar (no confirmarlo), y sólo para pacientes VIH positivos con signos y síntomas de TB pulmonar o extrapulmonar, y CD4 < 100 células / μ l o gravemente enfermos.

Es una técnica sencilla de realizar y puede utilizarse en el mismo sitio de atención de los pacientes, sin necesidad de un laboratorio. Puede ser particularmente útil para pacientes que no pueden producir esputo. La recomendación de OMS se extendió para niños VIH positivos en la misma situación, aun reconociendo que la evidencia es limitada y que preocupaba la baja especificidad demostrada en los estudios iniciales en pediatría. La OMS remarcó que esta prueba no elimina la necesidad de otras de mayor precisión (Xpert, cultivo, LiPA y PS fenotípica). (36)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional descriptivo, prospectivo de corte transversal. El universo de estudio estuvo constituido por todas las muestras clínicas de personas con sospecha de TB atendidos en la consulta médica y de pacientes ingresados en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico, que se recibieron en el laboratorio de microbiología en el periodo de Enero-Junio/2023.

Criterio de inclusión: todas las muestras clínicas con cantidad superior a 2ml con indicación de BK y cultivo e identificadas de forma correcta.

Criterios de exclusión: muestras derramadas, muestras mal conservadas, frascos vacíos.

Se incluyeron todas muestras que cumplieron con los criterios de inclusión en el estudio (145). Se utilizó como prueba de referencia el cultivo en medio sólido LJ.

Los sintomáticos respiratorios se estratificaron por grupo de riesgo para desarrollar la TB, según a lo que se describe en el PNCETB. (37)

Procedimientos para el procesamiento de las muestras

Las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión en el estudio fueron procesadas para BK (tinción fluorescente y tinción de ZN) y cultivo bacteriológico en LJ.

Procedimiento para la tinción de ZN

- Se adicionó fucsina básica y se aplicó calor hasta la emisión de vapores dejándose actuar por 5 minutos.
- Se enjuago con agua y se escurrió.
- Se descoloró con alcohol ácido al 3% por 2 minutos
- Se enjuago con agua y se escurrió.
- Se aplicó el azul de metileno al 0,1% por 45 segundos a 1 minuto y se enjuago con agua.
- Se dejó secar al aire.

Para la lectura de las láminas teñidas con ZN convencional: se utilizó el microscopio Axiostar plus (Carl Zeiss, Alemania) y se realizó en cruces según las normas internacionales, como se describe a continuación. (37)

Resultado del examen microscópico	Informe
Negativo (0 BAAR en 100 CO)	Negativo
Positivo escasos BAAR (1 a 9 BAAR en 100 CO)	Número BAAR en 100 CO
Positivo + (10-99 BAAR en 100 CO)	Positivo +
Positivo ++ (1-10 BAAR por campo)	En 50 CO. Positivo ++
Positivo +++ (≥ 10 BAAR por campo en 20 CO)	Positivo +++

Procedimiento para la tinción fluorescente con Auramina O

- Se cubrió con solución de Auramina O 0,1% filtrada y se dejó actuar durante un mínimo de 20 minutos (no calentar).
- Se lavó con agua destilada y se escurrió
- Se cubrió con la solución decolorante (alcohol al 0,5%) durante 1 ó 2 minutos (Repetir este paso si es necesario).
- Se lavó con agua destilada y escurrió.
- Se cubrió con el colorante permanganato de potasio al 0,5 % durante 1 minuto.
- Se lavó con agua destilada, escurrió y se dejó secar al aire al abrigo de la luz.

Para la lectura de la MF LED se utilizó el adaptador Para Lens (QBC Diagnostic, EE.UU.) en un microscopio Primo Star (Carl Zeiss). La codificación de la lámina se realizó en cruces, según las normas internacionales, como se describe a continuación. (37)

Resultado del examen microscópico a 400x	Informe
Negativo	No se observan BAAR
1- 2 BAAR en una línea(*)	“Se requiere confirmación”(**)
3-24 BAAR en una línea	Positivo escasos BAAR
1-6 BAAR por campo	Positivo (+)
7-60 BAAR por campo	Positivo (++)
>60 BAAR por campo	Positivo (+++)

Leyenda: BAAR: bacilos ácido alcohol resistente. () Ver Procedimiento a seguir frente al hallazgo de menos de 3 BAAR en una línea a una amplificación de 400x. (**) Solicitar nueva muestra.*

Procedimiento a seguir frente al hallazgo de menos de 3 BAAR en una línea a una amplificación de 400x.

Debido a la posibilidad de que se trate de artefactos de coloración, se procesó como sigue:

- Se amplió la lectura a otra línea del extendido para confirmar la observación mediante la lectura de otro lector. Si con esa lectura no se encontró más bacilos, se hizo otro extendido de la misma muestra, tratando de elegir partículas purulentas.
- Si la lectura del segundo extendido no modificó el resultado anterior, la muestra se informó como “Se requiere confirmación” solicitando una nueva muestra del paciente y anotar el hallazgo en el Libro de Registro.

Procedimiento para procesamiento de las muestras. Cultivo bacteriológico e identificación en especie.

Las muestras procedentes de sitios estériles se inocularon directamente en el medio de cultivo (0,2 mL en 2 tubos de medio de cultivo LJ)

Las muestras procedentes de sitios no estériles: se le realizó la descontaminación por el método de Petroff modificado con solución salina al 4%, como se describe a continuación:

- Por cada 2 mililitros (mL) de muestra, se adicionó 2 mL de NaOH al 4%.
- Se homogenizó exhaustivamente (vórtex).
- Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agitó ocasionalmente.
- Posteriormente se centrifugó a 3000 gravedades (g) durante 15 minutos (min.) y luego se decantó el sobrenadante.
- Se agregó 15 mL de solución salina fisiológica y se centrifugó nuevamente a 3000 g durante 15 min. y se decantó el sobrenadante.
- Se re-suspendió el sedimento en 2 mL de solución salina fisiológica.
- Se inoculó 0,2 mL en cada tubo de medio de cultivo LJ (2 tubos por cada muestra).

Una vez que se inocularon las muestras en los medios de cultivo se incubaron a 37°C por 8 semanas y se realizó la lectura de forma semanal. Si en ese tiempo no se obtuvo crecimiento se definió el cultivo como negativo.

De producirse crecimiento se realizó una suspensión bacteriana tomando una azada en 0,5 mL de agua destilada y se realizó un examen directo con tinción de ZN. En los aislados donde se confirmó la presencia de BAAR, se realizó la codificación del cultivo como aparece a continuación:

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

Una vez confirmada la presencia de BAAR se procedió a la identificación en especie con la tira SD BIOLINE, ensayo inmunocromatográfico para la detección del Ag MPT64, presente solo en el *CMTB* (ver anexo 3). (38)

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio fue sometido a revisión y aprobación formal por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética del (IPK CEI-IPK 37-22). Esta investigación no represento ningún riesgo para los pacientes. La confidencialidad de los participantes se aseguró a través del anonimato de los datos en las bases de estudio cumpliendo con el principio 24 de la Declaración de Helsinki.

El trabajo se llevó a cabo en gabinetes de seguridad clase II, según la clasificación del Centro Nacional de Seguridad Biológica de Cuba para el trabajo con micobacterias. De esta manera, se impidió la liberación de microorganismos patógenos al exterior, por lo que dicho trabajo no representa riesgos para la comunidad donde se encuentran enclavados los laboratorios. El personal encargado tiene conocimiento suficiente de las normas de bioseguridad en el manejo de las muestras. Los resultados de esta investigación se utilizaron una vez que culminó el estudio como fuente de datos de la tesis de terminación de especialidad.

En cuanto a la relación riesgo/ beneficio, no representó riesgo para las personas que participaron en el estudio. Fue beneficioso porque fueron utilizados por los médicos de asistencia en los casos donde el resultado fue positivo lo cual permitió comenzar con el tratamiento rápido y adecuado, lo que contribuyó a un mejor control de la TB.

Esta tarea formó parte del proyecto de investigación sectorial: Fortalecimiento de las capacidades investigativas, los conocimientos y las acciones para acelerar el progreso hacia la eliminación de la TB en Cuba (2021-2023).

Procesamiento de los datos:

Se recogió la información y se confeccionó una base de datos en el programa Microsoft EXCEL XP. Se realizó las tablas utilizando el mismo programa. Los resultados se presentaron en tablas de frecuencia y se elaborarán tablas de contingencia entre las variables.

Gestión de datos y análisis estadísticos

Se compararon los resultados de MF LED con los de la tinción de ZN. Se estratifico por grados de codificación. Para estimar la concordancia (C) entre las técnicas de microscopías se utilizó el índice de kappa (k), según lo recomendado por Landis y Koch. (37)

Para el cálculo de los indicadores de desempeño (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de validez y el índice de Youden) se utilizó el programa estadístico para datos tabulados EPIDAT (*EpiData Association*, Dinamarca), versión 3.1. Para este análisis se excluyeron los cultivos contaminados y aquellos donde se aisló micobacterias no tuberculosas.

Aunque no formó parte del estudio, para dar credibilidad a los resultados, se realizó el control de calidad de los frotis teñidos con auramina O en el LNRI-TBLM del IPK. Se enviaron, de forma mensual, todas las láminas positivas a BAAR y el 5% de las láminas negativas.

Limitaciones del estudio:

Para esta investigación, se presentó como limitante el número reducido de muestras clínicas, lo que influyó en no tener un resultado más representativo sobre el rendimiento de la microscopía fluorescente en muestras extrapulmonares.

IV. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 145 muestras de pacientes con sintomatología respiratoria de más de 21 días con sospecha de TB atendidos en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico. El esputo fue la el tipo de muestra que más se recibió en el laboratorio con 105 (72,4%), seguida de lavados bronquiales, líquidos pleurales y contenido gástrico con 31 (21,4%), 7 (4,8%) y 2 (1,4%), respectivamente.

En la tabla 1 se muestra la comparación entre MF LED y microscopía convencional con tinción de ZN según resultados de la BK. Para MF LED fueron negativos a BAAR 113/145 frotis para 77,9% y 32 fueron positivas: 10 (6,9%) con escasos BAAR, 8 (5,5%) positivas a una +, 9 (6,2%) positivos ++ y 5 (3,4%) positivas +++.

Para la microscopía con tinción de ZN se identificaron 131 (90,3%) frotis negativos a BAAR y 14/145 láminas positivas: 2 (1,4%) con escasos BAAR, 1 (0,75%) positivo ++ y 11 (positivo +++).

Tabla 1. Comparación entre MF LED y Microscopía convencional con tinción de ZN según resultados de la baciloscopia. Enero-Junio/ 2023.

Resultados de la baciloscopia. N=145	MF LED		Microscopía con tinción de ZN	
	No.	%	No.	%
Negativo (0 BAAR observados)	113	77,9	131	90,3
Positivo escasos BAAR	10	6,9	2	1,4
Positivo +	8	5,5	0	0,0
Positivo ++	9	6,2	1	0,7
Positivo +++	5	3,4	11	7,6

Por la microscopia de fluorescencia LED se identificaron 8 casos positivos que no se identificaron con la tinción de ZN, teniendo en cuenta si esos casos no pertenecían a los grupos vulnerables donde está indicada la prueba molecular Xpert para el diagnóstico rápido de la TB. Esto es muy importante para la detección de casos con la enfermedad dado que se hubiera tenido que esperar por los resultados del cultivo en LJ para iniciar el tratamiento antituberculoso, los cuales demoran entre 30 y 60 días para obtenerse el resultado.

También se calcularon y compararon los indicadores de desempeño para ambas técnicas de microscopia (tabla 2). La sensibilidad de la MF LED fue de 85,71%, superior comparada con la microscopia de fluorescencia convencional (61,90%). La especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la tinción fluorescente fueron de 88,89%, 58,06% y 97,20%; respectivamente. Para la tinción de ZN estos indicadores (en el mismo orden) fueron: 99,15%, 92,86% y 93,55%; respectivamente. El índice de Youden para MF LED fue superior (0,75) que el calculado para tinción ZN (0,61).

Tabla 2. Comparación de los indicadores de desempeño de la MF LED y la microscopía convencional para el diagnóstico de la tuberculosis. Enero-Junio/ 2023

Indicadores de desempeño. N=138	MF LED	Microscopía convencional (tinción de ZN)
Sensibilidad	85,71	61,90
Especificidad	88,89	99,15
Valor predictivo Positivo	58,06	92,86
Valor predictivo Negativo	97,20	93,55
Índice de Youden	0,75	0,61

Al estimar la concordancia entre la MF LED y la microscopia convencional, el valor del índice de kappa (IK) fue 0,5323 (con un intervalo de confianza 0,3591 - 0,7056), por lo que se consideró como una concordancia moderada, de las 6 categorías según la clasificación de Landis y Koch (muy buena, buena, moderada, aceptable, baja y sin acuerdo).

El porcentaje de detección de frotis positivos a BAAR para la MF LED fue de 12,4% (18 frotis positivos), mayor que el calculado para la tinción de ZN (9,0%; 13 frotis positivos). Sin embargo al comparar estas proporciones no fue estadísticamente significativa (valor de $p=0,4471$). Para el cultivo bacteriológico fue esperado que fuera mayor que las técnicas de BK con 14,5% (21 cultivos con aislados de *CMTB*).

Al estratificar los casos atendidos en el Hospital (consulta e ingresados) por grupo de riesgo, se apreció que se confirmó TB en 10/73 fumadores (13,7%), en 5/49 pacientes con ECNT-SDM (10,2%), 4/19 individuos con DM (21,1%). Solo se estudió un solo paciente alcohólico y un recluso, diagnosticándose la enfermedad en ambos casos.

De los casos estudiados predominó el sexo masculino sobre el femenino con 88 (61%) y 57 (39%), respectivamente. En cuanto a la TB confirmada bacteriológicamente por el cultivo, el comportamiento fue similar, dentro de los hombres enfermaron por TB 16 pacientes (18,2%) y 5 (8,8%) fueron mujeres, siendo esta diferencia no significativa estadísticamente ($p= 0,1832$).

Por grupo de edad, se observó que el mayor número de pacientes que se estudiaron fueron el grupo de 31-59 años y en los mayores de 60 años, con 73 (50,4%) y 64 (44,1%), respectivamente. En el grupo de edad de 15 a 30 años solo se estudiaron ocho (5,5%). El mayor número de casos con TB se diagnosticó en el grupo de edad comprendido entre 31-59 años con 14 (66,7%). Le siguió en orden de frecuencia los mayores de 60 años con seis (28,6%) y de 15-30 años solo se diagnosticó un caso (4,8%) (Tabla 3). La mediana de edad fue de 60 años, con una edad promedio de 58,99 años.

Tabla 3. Distribución de los pacientes estudiados según grupo de edad y casos confirmados bacteriológicamente con tuberculosis. Enero-Junio/ 2023.

Grupos de edad N=145	No.	%	Casos confirmados bacteriológicamente con TB (21)	
			No	%
15-30	8	5,5	1	4,8
31-59	64	44,1	14	66,7
≥ 60 años	73	50,4	6	28,6

Según la categoría de caso del total de muestras estudiadas (145), 107 (73,8%) pertenecieron a la categoría de diagnóstico (CD) y 38 (26,2 %) de casos previamente tratados. Se confirmaron con TB 13/21 casos con CD para un 61,9% y 8 (38,15%) que ya habían recibido tratamiento previo con medicamentos antituberculosos.

Aunque no formó parte de los objetivos de este estudio es importante informar los resultados del control de calidad (CC) a las láminas teñidas con auramina O, los cuales se solicitaron al responsable de esta actividad del LNRI-TBLM del IPK. Se evaluaron 56 láminas y se identificó solo un error de lectura (un falso positivo bajo). En este caso se recurrió al resultado del cultivo correspondiente, el cual fue negativo y perteneciente a la categoría de diagnóstico. La concordancia observada entre el autor de esta tesis y el evaluador se consideró muy buena al calcularse un IK de 0,9554 (IC: 0,8689-1,0000).

V. DISCUSIÓN

La lucha contra la TB comienza con una política eficaz de identificación y tratamiento de las personas infectadas o con riesgo de desarrollar la enfermedad, lucha que representa un desafío importante para la salud pública en su intento por disminuir su incidencia. (39)

La muestra más común estudiada en este estudio fue el esputo, resultados similares, en cuanto al tipo de muestra, a los obtenidos por Rodríguez K y colaboradores (colbs.) en un estudio conducido en la región centro norte de Villa Clara, Cuba del 2007 al 2021, donde los esputos fue la muestra más frecuente. Sin embargo desde el punto de vista porcentual fue menor al obtenido por este autor con 94,2% respectivamente. Esto pudo estar relacionado al mayor número y tipo de muestras que se estudiaron, así como tipo de pacientes atendidos. (40)

La detección de casos de TB depende en gran medida del estudio de los sintomáticos respiratorios, aspecto importante para el programa de control. La muestra más útil y de elección en la búsqueda de casos con TBp es el esputo por su mayor productividad y fácil obtención. En general se considera óptimo obtener 2 muestras, una de ellas, preferentemente al despertarse en la mañana que es el momento en que se obtiene mejor y más abundante cantidad del espécimen, además de que se expulsan el mayor número de bacilos, lo cual garantiza una exitosa toma de muestra, un mejor diagnóstico microbiológico y en consecuencia un incremento del rendimiento del examen microscópico. (11,41).

El contenido gástrico y la broncoscopia, aunque son muestras útiles para este tipo de diagnóstico, el proceder para la obtención de las mismas es invasivo. Generalmente se utilizan en niños que no saben expectorar, sobre todo menores de 5 años, o en pacientes encamados o entubados. (40, 41)

El rendimiento de la MF LED fue superior en comparación con la microscopía convencional con tinción de ZN. Similar a lo que reportan otros autores como Pedrera N (10) en un estudio de evaluación de la técnica en el LNRI-TBLM del

IPK en la Habana de febrero a julio del 2018, que confirma que esta herramienta es más eficiente para identificar frotis con escasos bacilos y a su vez identifica un mayor número de casos positivos a BAAR. Gizawa y cols en otra investigación conducida en Addis Ababa, Etiopia en 2020 e Imaz M y cols en Argentina en 2017 en estos estudios también se demuestra la mayor sensibilidad de la MF LED en comparación con la microscopía convencional (ZN), especialmente en pacientes con una cantidad baja de bacilos que probablemente no se puedan detectar en los frotis teñidos con ZN. (42,4)

En esta investigación la sensibilidad de la MF LED fue mayor a lo que reporta Gelalcha y cols en un estudio en el hospital Addis Ababa, Etiopia 2017 que obtuvo una sensibilidad del 77,8%. Esta diferencia pudiera estar dada a que Etiopia es un país de alta carga de TB y TB/VIH y la BK en este grupo poblacional suele ser negativa sobre todo en estadios avanzados de la enfermedad. También pudo haber influido el número de muestras en estudiadas, metodología utilizada, diferencias en el procedimiento o tipo de adaptador utilizado. (43)

Muchas investigaciones avalan que la MF LED tiene un 10% más de sensibilidad comparado con la coloración de ZN. Sin embargo en meta análisis realizado en 2014 por Chang y cols, se informa una sensibilidad agrupada del 66,9 % para MF LED. Este autor muestra que la sensibilidad para esta herramienta varía de 40 a 83%, mientras que la especificidad oscila entre 82 y 100%, mostrando un alto nivel de heterogeneidad entre los estudios analizados. (44)

El IK obtenido en este estudio fue inferior a lo que reporta Pedrera N en un estudio realizado en el LNRI-TBLM del IPK, Cuba; donde evaluó y comparó la técnica fluorescente con la tinción de ZN en 208 frotis y obtuvo un $IK=0,9174$. Estas diferencias pudieran estar en correspondencia a que en la presente investigación se incluyó un menor número de frotis, además de otros factores que pudieran haber influido como la experticia del observador, así como distribución de la muestra en el portaobjetos. (10)

En cuanto al porcentaje de detección de frotis positivos a BAAR, con la MF LED fue mayor en comparación con la tinción de ZN, estos resultados son similares a lo reporta Martínez M y cols en un estudio de validación de la MF LED,

realizado en el LNRI-TBLM del IPK la Habana y a lo que informa Pedrera en el 2018 en un estudio de evaluación de esta metodología, resultados que avalan a esta herramienta para aumentar la sensibilidad y la detección de casos con TB pulmonar BK positiva. (3,10)

En este estudio hubo predominio, en cuanto a sintomáticos respiratorios estudiados con sospecha de TB, de los adultos mayores de 60 años, sin embargo el mayor número de casos confirmados con la enfermedad no fue en este grupo poblacional sino en el grupo etario de 31 – 59 años, una tendencia que se observa en Cuba en la última década. (9)

Los estudios encontrados en la literatura utilizaron grupos de edades diferentes a los incluidos en la presente investigación, lo cual fue una limitación en este estudio. Betancourt y cols en un estudio conducido en un Hospital del Salvador en el 2015 al 2017, informo un mayor número de casos con TB entre los pacientes de 30 a 39 años, seguido de los mayores de 60 años. Lo cual pudo estar en correspondencia al aumento de la ingestión de bebidas alcohólicas y el hábito de fumar en los jóvenes y adultos jóvenes, factores de riesgos importantes para desarrollar la enfermedad en este grupo etario. Otros autores como Rivero MJ y cols en un estudio del 2006 al 2015 y Araujo Inastrilla CR del 2012 al 2019, ambos de Cienfuegos, encontraron que la TB predominó en mayores de 60 años. (45, 46,47)

La edad se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de la TB. El riesgo mayor de enfermar es en los primeros años de vida, y se considera que puede ser de mayor gravedad, pudiendo alcanzar entre el 1-3% de los casos con diseminaciones graves. Entre los seis años y la pubertad disminuye el riesgo de enfermar, incrementándose de nuevo en un 20% en el adulto joven. Este riesgo se mantiene hasta los 65 – 70 años, en que aumenta nuevamente la susceptibilidad de padecer la enfermedad. (48).

Por lo general en los mayores de 60 años, producto a la inmunodepresión fisiológica, tiene mayor probabilidad de desarrollar la TB, además del aumento de la incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas en este grupo etario.

También influyen las condiciones sociales desfavorables a las que estos se enfrentan como por ejemplo: la permanencia en los hogares de ancianos, las condiciones de alimentación desfavorable y la exposición por largo tiempo a otros factores de riesgo como el tabaquismo y el alcoholismo. (48)

De los pacientes estudiados en el presente trabajo, los factores de riesgo que más se identificaron y donde se detectó el mayor número de casos con TB fueron: el hábito de fumar, pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles sin incluir la Diabetes Mellitus y los pacientes diabéticos.

Son diversos los estudios que se han realizado para conocer los factores de riesgo para contraer la enfermedad de la TB. Águila Rodríguez N y cols en un estudio en la provincia de Cienfuegos, del 2007 al 2017, encontró que el tabaquismo fue el que más insidió en los casos diagnosticados con TB en ese periodo. En otro estudio realizado en Cuba, realizado por Martínez Rodríguez A y cols, de los casos notificados del país en el periodo 2009 al 2010, dentro de los factores de riesgo predominó el alcoholismo con 16,6%, del total de casos notificados y padecer de DM, alcanzó el 4,2% del total de casos. Otros estudios internacionales, como el que realizó Montiel D en Paraguay, el VIH seguido de la DM, alcoholismo y tabaquismo, en ese orden, fueron los GR más identificados. (49, 50,51)

El tabaquismo constituye un factor de riesgo importante para contraer la TB y responsable del 20% de la carga por esta enfermedad. Está relacionado con las formas graves en términos de secuelas y resultados negativos durante el tratamiento antituberculoso, como recaída y muerte. Los componentes del humo de tabaco provocan cambios en el sistema respiratorio de tipo inflamatorio e inmunológico, inhibiendo el crecimiento celular y las acciones de algunos mediadores químicos relacionados a la inmunidad innata. (46)

Un hallazgo importante fue que se diagnosticó TB, en un mayor porcentaje, en los pacientes con DM, comparado con el resto de los grupos de riesgo estudiados. Aunque la asociación de TB y DM no está reportada en Cuba como un problema, es necesario realizar investigaciones dirigidas a este grupo

poblacional para conocer realmente la prevalencia de esta enfermedad en este grupo de riesgo.

La TB y la DM son dos patologías que han acompañado a la humanidad a lo largo de su historia. Ambos padecimientos han cobrado gran importancia, por ubicarse dentro de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo. Los pacientes diabéticos poseen hasta tres veces más riesgo para desarrollar TB y es un factor de riesgo importante para el desarrollo de TB resistente a fármacos, con el consecuente impacto para la salud de sus contactos inmediatos. (52,53)

La diabetes altera la respuesta al tratamiento antituberculoso, debido a una disminución de los niveles del antibiótico en la sangre; en el caso de la RIF, se ha observado una disminución de 53 %. Este comportamiento está al parecer relacionado con la interacción de dicho antibiótico con fármacos administrados para el control de la diabetes (sulfonilureas y las biguanidas), lo que reduce su eficacia y, en consecuencia, aumenta la predisposición a desarrollar resistencia. Por otro lado también afecta a células fagocíticas: los macrófagos y a los linfocitos, se afecta la quimiotaxis, la fagocitosis, la activación y la presentación de los antígenos. Hay también una menor actividad bactericida de los leucocitos (macrófagos alveolares menos activos), con menor potencial oxidativo destructivo de los neutrófilos y una menor producción de interferón- γ lo que traduce una menor respuesta inmune de adaptación de linfocitos T helper 1. (52)

No fue posible comparar los resultados de este estudio, en cuanto a otros factores de riesgo importantes para desarrollar la TB, como el alcoholismo y reclusos, debido a que de estos grupos solo acudieron al hospital un caso de cada uno y en ambos se detectó la TB.

El alcoholismo, es una adicción con un componente biopsicosocial. Se asocia a conflictos con la pareja, los hijos y otros familiares; los afectados pueden llegar a una degradación moral ante la sociedad, a la pérdida del rendimiento laboral, el padecimiento de trastornos sexuales, entre otros aspectos negativos y puede

afectar, a la población joven. También se ha demostrado que el alcoholismo inhibe la actividad de los macrófagos en la mucosa respiratoria. (45)

Por su parte los reclusos y exreclusos constituyen otro grupo de alto riesgo para contraer la infección. En estos casos convergen otros factores que agravan el riesgo de enfermar de TB, como el alcoholismo, los trastornos psiquiátricos y otras enfermedades crónicas asociadas, la poca exposición a la luz solar y el hacinamiento. (45)

En esta investigación no se incluyeron pacientes VIH, lo cual fue otra limitación del estudio, pero es necesario mencionar que es una condición que predispone a la TB. (45)

En este estudio predominó el sexo masculino en los casos diagnosticados con TB, similar a lo que reportan otros autores cubanos como Gutiérrez O y cols (39) en su estudio conducido en el municipio Ciro Redondo, Santiago de Cuba en los años 2017 al 2021, a los de Rivero MJ y cols en un Hospital de Cienfuegos del 2006 al 2015 y Blanco G y cols en el municipio Manzanillo 1990 al 2010. También fue similar a lo que se reporta a nivel internacional, como Ríos J en Perú en Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del 2018 a 2021. (46, 55,56)

El predominio de sexo masculino en los enfermos de TB pudiera estar en correspondencia a su mayor exposición a los factores de riesgo como el alcoholismo, tabaquismo y mayor probabilidad de internamiento en centros de reclusión. Según datos de la OMS la TB afecta más al sexo masculino en todos los grupos de edades y en todas las áreas geográficas. (56)

VI. CONCLUSIONES

- La microscopia fluorescencia LED es eficiente para la identificación de los casos con sospecha de tuberculosis pulmonar, en particular los casos paucibacilares, lo que avala su introducción en el algoritmo del laboratorio de Hospital Benéfico Jurídico.
- El sexo masculino, la edad mayor o igual a 60 y el antecedente de padecer diabetes mellitus, son las variables sociodemográficas relevantes en los casos con sospecha de tuberculosis pulmonar del Hospital Benéfico Jurídico, lo que demuestra que la enfermedad se comporta de forma estable entre los grupos de riesgos reconocidos en Cuba y que es necesario incrementar las intervenciones comunitarias, así como el seguimiento y el manejo adecuado de los pacientes que se reconocen como de riesgo.

VII. . RECOMENDACIONES

- Realizar otras investigaciones de laboratorio que permitan conocer la utilidad de la microscopia de fluorescencia LED con un mayor número de muestras clínicas extrapulmonares que procedan de pacientes con sospecha de TB.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization [Internet]. Global tuberculosis report 2021. Geneva: WHO; 2021 [citado 10 Ene 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
2. Vallego VP, Rodríguez JC, Searle MA, Farga CV. Ensayo Xpert/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev. Chil. Enferm. Respir [Internet]. 2015 [citado 10 Ene 2021]; 31(2):127-31. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482015000200010
3. Martínez Romero MR, Pedrera Pozo N, García León GC, Sardiñas Aragón M, Mederos Cuervo LM, Díaz Rodríguez R. Validación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en Cuba. Rev CENIC Cienc Biol [Internet]. 2021 [citado 10 Ene 2021]; 52(2): 259-66. Disponible en: <https://revista.cnic.cu/index.php/RevBiol/article/view/962>
4. Imaz M, Allassia S, Aranibar M, Gunia A, Susana Poggi S, Togneri A, et al. Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina. Bioméd [Internet]. 2017 [citado 13 Ene 2021]; 37(2):164-74. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572017000200164
5. 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 [Internet]. 2018 [citado 14 Ene 2021]; 35(4): 307-11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6034383/>
6. World Health Organization [Interent]. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. Policy statement 2011. Geneva: WHO; 2011 [citado 14 Ene 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131929/>

7. Pan American Health Organization [Internet]. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Washington, D.C.: PAHO; 2021 [citado 13 Ene 2021]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55047>
8. Díaz Rodríguez R, Lemus Molina D, Martínez Romero MR. La tuberculosis en Cuba en tiempos de COVID-19: ¿retroceso en su plan de eliminación. Rev. Cubana. Med. Trop. [Internet]. 2020 [citado 14 Ene 2021]; 72(3): e585. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1156547>
9. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud [Internet]. Anuario Estadístico de Salud. Cuba: La Habana; 2021 [citado 13 Ene 2021]. Disponible en: <https://salud.msp.gob.cu/anuario-estadistico/>
10. Pedrera Pozo N. Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED en el diagnóstico de Micobacterias en Cuba. [Tesis de especialidad]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2018 [citado 15 Ene 2021] 54 p. <http://catalogobibliotecaipk.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=341>
11. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: manual de actualización de la baciloscopía. Washington, D.C.: OPS; 2018 [citado 15 Ene 2021] Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-para-diagnostico-bacteriologico-tuberculosis-parte-1-manual-actualizacion>
12. Guerra-Macías I, Espinosa-Torres F. Absceso frío tuberculoso. Revisión de la literatura a propósito de cinco casos en Angola. RIC. [Internet]. 2020 [citado 2 feb 2021]; 99(4): 386-97. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=103598>
13. Farga CV. La conquista de la tuberculosis. Rev. Chil. Enferm. Respir. [Internet]. 2004 [citado 17 May 2023]; 20(2): 101-18. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482004000200009&lng=es

14. Martínez Rodríguez IM, Díaz Rodríguez R, Rodríguez Bertheau AM. La tuberculosis, desde un problema de salud hasta un arma biológica. Rev. Cuba. Med. Militar [Internet]. 2021 [citado 17 May 2023]; 50(1):e0210899. Disponible en: <https://revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/899>
15. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Madrid: Elsevier Inc; 2015. 2818p.
16. Arias F, Gutiérrez R, Gallardo M, Moreno M, Muñoz I, Kohan K, et al. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis [Internet]. Chile: Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia; 2019. [Citado 17 May 2023]. 74p. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/Manual%20de%20procedimientos%20t%C3%A9cnicos%20para%20el%20diagn%C3%B3stico%20bacteriol%C3%B3gico%20de%20la%20TBC.pdf>
17. Viale MN, Zumárraga MJ, Araújo FR, Zarraga AM, Cataldi AA, Romano MI, et al. La genómica de las micobacterias. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2016, 35(1): 215-27.
18. 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 Bacteriol [Interent]. 2014 [citado 6 abr 2022]; 1(1): 2-6. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/315356368_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_s#fullTextFileContent
19. World Health Organization [Internet]. Compendium of WHO guidelines and associated standards: ensuring optimum delivery of the cascade of care for patients with tuberculosis, 2nd ed. Geneva: WHO; 2018 [citado 6 abr 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514101>

20. Noa-Suárez D, Vázquez-Balart L. Tuberculosis farmacorresistente en provincia Guantánamo, 2010-2019. Rev Inf Cient [Internet]. 2021 [citado 11 abr 2022]; 100(4):e3470. Disponible en: <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/3470>
21. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Informe mundial sobre la Tuberculosis. Ginebra: OMS; 2016. [Citado 5 jun 2023]. Disponible en: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary_es.pdf
22. Wei X, Zou G, Yin J, Walley J, Yang H, Kliner M, et al. Providing financial incentives to rural-tourban Tuberculosis migrants in Shanghai: an intervention study. Infect Dis Poverty [Internet]. 2012 [citado 6 abr 2022]; 1(1):9. Disponible en: <https://idjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-9957-1-9>
23. Boccia D, Hargreaves J, Lönnroth K. Cash transfer and microfinance interventions for Tuberculosis control: review of the impact evidence and policy implications. Int J Tuberc Lung Dis [Internet]. 2011 [citado 5 jun 2023]; 15 (suppl 2): 37–49. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740658>
24. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Global Tuberculosis Report 2020. Ginebra: OMS; 2020 [citado 5 jun 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
25. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Día Mundial de la Tuberculosis 2022. Washington D.C: OPS; 2022 [citado 8 jul 2023]. Disponible en <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-tuberculosis-2022>
26. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2021. Washington, D.C: OPS; 2022 [citado 8 jul 2023]. Disponible en <https://www.paho.org/es/documentos/tuberculosis-americas-informe-regional-2021>

27. Rodríguez Villavicencio K, López Berrio S, Cruz Valle Y. Caracterización bacteriológica de pacientes con Tuberculosis pulmonar de la región centro norte de Villa Clara, 2007-202. Convención Internacional de Salud [Internet]. Cuba: Convención Internacional de Salud; 2022 [citado 20 ago 2023]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjTs6vdqf2BAxUHRjABHfc-AqIQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fconvencionsalud.sld.cu%2Findex.php%2Fconvencionsalud22%2F2022%2Fpaper%2Fdownload%2F89%2F10&usq=AOvVaw28ru_CguwCRwcNbybaOFuH&opi=89978449
28. Ministerio de Salud Pública [Internet]. Cuba mantiene su compromiso de poner fin a la Tuberculosis. Cuba: MINSAP; 2021 [citado 20 ago 2023]. Disponible en: <https://salud.msp.gob.cu/cuba-mantiene-su-compromiso-de-poner-fin-a-la-tuberculosis/>
29. Barreto Argilagos G, Beltrão Molento M, Rodríguez Torrens HC, Neumann Barroso CD. Paradojas que limitan un conocimiento real de la tuberculosis y pueden favorecer su expansión durante la COVID-19. Rev. prod. Anim [Internet]. 2022 [citado 25 ago 2023]; 34(2). Disponible en: <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4193>
30. Martínez MR, Sardiñas M, García G, Mederos LM, Díaz R. Evaluation of BacT/ ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. Journal of Tuberculosis Research [Internet]. 2014 [citado 23 ago 2023]; 2(2): 59-64. Disponible en: https://www.scirp.org/html/1-1130017_46598.htm
31. Martínez Romero MR, Sardiña Aragón M, García León G, Mederos Cuervo L, Vega Riverón B, Díaz Rodríguez R. Evaluación del sistema automatizado BacT ALERT 3D para el aislamiento de micobacterias en el LNRTB-IPK. Neumol Cir Torax [Internet]. 2012 [citado 23 ago 2023]; 71(4). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=39491>
32. Llerena Polo C, Zabaleta Vanegas AP. Guía para la vigilancia por laboratorio de tuberculosis. Colombia: Dirección de redes en salud pública; 2020.

33. Teran R, Waard JH. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. JIFCC [Internet]. 2015 [citado 23 ago 2023]; 26(4):310-25. Disponible en: <https://cms.ifcc.org/wp-content/uploads/2015/11/eJIFCC2015Vol26No4pp310-325.pdf>
34. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Manual operativo de la OMS sobre la tuberculosis. Módulo 3: Diagnóstico. Métodos de diagnóstico rápido para detectar la tuberculosis, 2020. Washington, D.C.; 2022 [citado 23 ago 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275325377>
35. Li S, Liu B, Peng M, Chen M, Yin W, Tang H, et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: A systematic review and meta-analysis. PLoS [Internet]. 2017 [citado 8 sep 2023]; 12(7): e0180725. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180725>
36. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Directrices unificadas de la OMS sobre la tuberculosis. Módulo 3: Diagnóstico. Métodos de diagnóstico rápido para la detección de la tuberculosis, 2020. Washington, D.C.: OPS; 2022 [citado 8 sep 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-unificadas-oms-sobre-tuberculosis-modulo-3-diagnostico-metodos-diagnostico>
37. Ministerio de Salud Pública. Resolución Ministerial 277/2014. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de normas y procedimientos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 2015. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/programa_2015.pdf.
38. Ficha técnica tuberculosis Ag MPT64. [Citado 10 Ene 2021]. Disponible en: <https://doczz.es/doc/5857556/ficha-t%C3%A9cnica-tuberculosis-ag-mpt64>
39. Gutiérrez Domingo O, Espinosa Troya Y. Caracterización epidemiológica de la tuberculosis en el municipio Ciro Redondo en el quinquenio del 2017 al 2021. Ciro Redondo [Internet]. 2020 [citado 12 sep 2023]. Jornada Virtual con la Ciencia enfrentando al futuro. Disponible en: <https://jccredondo2021.sld.cu/index.php/jccredondo/2021/paper/viewPaper/281>

40. Rodríguez Villavicencio K, López Berrio S, Cruz Valle Y. Caracterización bacteriológica de pacientes con Tuberculosis pulmonar de la región. Convención Internacional de Salud [Internet]. 2022 [citado 12 sep 2023]; Cuba Salud. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiMnuyUzf-BAXUnTTABHbvABaMQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fconvencionsalud.sld.cu%2Findex.php%2Fconvencionsalud22%2F2022%2Fpaper%2Fdownload%2F89%2F10&usq=AOvVaw28ru_CguwCRwcNbybaOFuH&opi=89978449
41. De Armas Rodríguez Y, Armas Pérez A, González-Ochoa E. Perspectivas del paciente en relación con la calidad de los esputos para baciloscopias en tuberculosis. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2010 [citado 12 sep 2023]; 62(1):73-6. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-584935>
42. Gizaw N, Abera A, Sisay S, Desta K, Kreibich S, Gerwing-Adima L, et al. The yield of Auramine O staining using led microscopy with bleach treated sputum samples for detection of pulmonary tuberculosis at St. Peter tuberculosis specialized hospital, Addis Ababa, Ethiopia. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis [Internet]. 2020 [citado 18 sep 2023]; 18: 100140. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6939099/>
43. Gelalcha AG, Kebede A, Mamo H. Light-emitting diode fluorescent microscopy and Xpert MTB/RIF® assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis among patients attending Ambo hospital, west-central Ethiopia. BMC Infect Dis [Internet]. 2017 [citado 18 sep 2023]; 17(1):613. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893193/>
44. Chang EW, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. Eur Respir J [Internet]. 2016 [citado 10 sep 2023]; 47(3): 929–37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26647430/>

45. Bentancourt H, Guerra D, Rivas D, Milton F. Asociación entre la radiografía de tórax y pruebas bacteriológicas e inmunológica y comorbilidades más frecuentes en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Nacional General y de Psiquiatría “Dr. José Molina Martínez”. Rev Científica Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer [Internet]. 2021 [citado 12 sep 2023]; 2-9p. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1357934>
46. Rivero MJ, León Valdivies YJ, Sierra Martínez DP, Jam Morales BC. Tuberculosis Pulmonar: estudio clínico-epidemiológico. Rev. cubana Med. Gen. Integr [Internet]. 2017 [citado 18 sep 2023]; 33(3): 321-30. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-901180>
47. Araujo-Inastrilla CR. Incidencia de la Tuberculosis en Cuba. Rev Colum Med [Internet]. 2022 [citado: 21 de oct 2023]; 1(1):e3. Disponible en: <http://www.revcolumnamedica.sld.cu/index.php/columnamedica/article/view/3>
48. Túñez Bastida V, García Ramosa MR, Pérez del Molino ML, Lado Lado FL. Epidemiología de la tuberculosis. Med Integral 2002; 39(5):172-8.
49. Águila Rodríguez N, Delgado Acosta H, Rodríguez Buergo D, Rodríguez Fernández L, Gutiérrez Castro R, Bravo Polanco E. Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con tuberculosis en el municipio Cumanayagua. Provincia Cienfuegos. 2007-2017. Medisur 2018; 16(5): 647-54. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-976188>
50. Martínez-Rodríguez, Alina et al. Survival of Cuban Patients with Pulmonary Tuberculosis (2009–2010). MEDICC Review. 2016; 18 (1-2): 22-7.
51. Montiel D, Ecurra L, Domínguez L. Características epidemiológicas y clínicas de pacientes con tuberculosis. Experiencia Hospital Nacional. Rev. cient. cienc. salud 2019;1(2):19-26.
52. Álvarez-Herrera T, Placeres-Hernández J. Tuberculosis pulmonar y diabetes mellitus. Presentación de dos casos. Rev. méd. electrón. [Internet]. 2016 [citado 21 de oct 2023]; 38 (3): [aprox. 6 p.]. Disponible en: <https://revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/1611>

53. Yaneth Giovanetti MC, Morales Parra GI, Herrera CN, Prasca AJ. Frecuencia de diabetes mellitus en pacientes con tratamiento para tuberculosis en Colombia. Rev haban cienc méd [Internet]. 2019 [citado 22 de oct 2023]; 18(3):477-86. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/254>
54. Ramonda P, Pino P, Valenzuela LI. Diabetes mellitus como factor predictor de tuberculosis en el Servicio de Salud Metropolitano Sur en Santiago, Chile. Rev Chil Enf Respir [Internet]. 2012 [citado 21 de oct 2023]; 28(4): 277-85. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482012000400003
55. Blanco Zambrano GL, Arias del Castillo AM, Marrero Rodríguez H, Quintero Salcedo S, Serra Valdes MA. Tuberculosis pulmonar con baciloscopía positiva en el Municipio Manzanillo de 1990 al 2010. Rev Cubana Hig Epidemiol. [Internet]. 2015 [citado 23 de oct 2023]; 53(1): [aprox. 7 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156130032015000100005&lng=es
56. Perú. Ministerio de Salud. Boletín de Tuberculosis. [Internet]. 2022 [citado 18 sep 2023]. 1(1). Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/3351010-boletin-tuberculosis-n-01-agosto-de-2022>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos para la tinción fluorescente

Auramina O

Solución 1 (Auramina O 1%).

Nota: Se manipulo la auramina O 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 (se dejó la Auramina O en etanol de un día para otro, y se colocó a una temperatura entre 25 y 30 °C (en la estufa)
- Se rotulo la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento en frasco color ámbar al abrigo de la luz.

Solución 2 (Solución fenol)

Cristales de fenol	30 g
Agua destilada csp	900mL

Nota: se tuvo en cuenta que los cristales de fenol estaban incoloros. Los cristales de fenol son corrosivos, tóxicos y pueden causar quemaduras; se evitó el contacto con la piel y las mucosas; se preparó en ambiente bien ventilado

- Se disolvieron los cristales de fenol en el agua
- Se rotulo la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Se guardó en frasco color ambar al abrigo de la luz

Solución de trabajo: Auramina O 0,1%

- En una botella color ámbar se adicionaron 50 mL de solución 1 y 450 mL de la solución 2.
- Se ajustó la tapa del frasco y se mezcló bien.
- Se dejó reposar de un día para otro.
- Se rotulo con el nombre del reactivo, las fechas de preparación y vencimiento y se almaceno a temperatura ambiente, alejado del calor y protegido de la luz (no más de un mes).

Nota: La Auramina O recientemente preparada tiene un color amarillo oro intenso. Si el colorante resulto pálido, se descartó el reactivo. Además se cuándo se aplicó sobre los extendidos durante el proceso de coloración.

Solución decolorante

Ácido clorhídrico	5 mL
Etanol	1000 mL

Nota: se debe agregar siempre el ácido al alcohol, suavemente, y no al revés porque la temperatura de la solución aumenta explosivamente. Se colocó en botella color ámbar y se rotulo la botella con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y vencimiento. Se almaceno a temperatura ambiente.

Solución permanganato de potasio al 0,5% (Colorantes de contraste)

Permanganato de potasio	5 g
Agua destilada	1000 mL

- Se colocó el permanganato de potasio en el interior de un Erlenmeyer de 2 litros de capacidad conteniendo 500 mL de agua destilada.
- Se agito suavemente hasta disolver y se agregó los restantes 500 mL de agua y se agito
- Se guardó en una botella color ámbar bien tapada y se rotulo con el nombre y las fechas de preparación y vencimiento.

Nota: se almaceno a temperatura ambiente. La solución debe ser color púrpura. Si se transforma en rojiza significa que el permanganato se oxido (en ese caso se descartó el lote).

Anexo 2.

Equipos:

- Microscopio óptico Primo Star (Carl Zeiss, Alemania) con Dispositivo de Fluorescencia-LED (QBC Diagnostics, EE.UU.) y en buen estado técnico
- Cabina de seguridad biológica tipo 2.
 - Balanza
 - Probetas
 - Agitador magnético

Materiales e insumos

- Frasco volumétrico
- Embudo
- Botellas de vidrio marrón
- Etiquetas
- Guantes
- Bata de laboratorio
- Controles positivos y negativos de láminas para la tinción fluorescente
- Libro de registro
- Láminas portaobjetos
- Marcador permanente o lápiz diamante.
- Frasco con alcohol-arena.
- Asas de nycrom o asas desechables.
- Gradilla para tinción de láminas.
- Cronómetro
- Papel absorbente.
- Timer

Reactivos

- Permanganato de potasio
- Agua destilada purificada
- Auramina O
- Fenol
- Alcohol
- Ácido clorhídrico

Anexo 3. Elaboración de medio de Cultivo Löwenstein Jensen (LJ)

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

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

Procedimiento

1. Se pesó 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 adiciono las sales a los 600 mL de agua destilada.

3. Se aplicó calor y se agito alternadamente hasta que se evidencio una disolución total.

4. Se adiciono 12 mL de glicerol y se agito por varios segundos.

5. Se adiciono 0,4 g de verde malaquita y se agito por varios segundos.

6. Se mezcló la solución con 1000 mL de huevos frescos homogenizados. Se agito y dejo reposar durante 5 minutos.

7. Se distribuyó con el irrigador 6,5 ml del medio en tubos 20 x 150 milímetros

8. Los tubos se colocaron con las tapas flojas y en plano inclinado dentro del horno en frío a una temperatura de 82°C por una hora.

9. Se dejó enfriar lentamente dentro del horno, para evitar la formación de agua de condensación.

Anexo 4. Procedimiento para realizar el ensayo inmunocromatográfico con la tira SD BIOLINE. (14)

Este método permite la distinción rápida entre el complejo *M. tb* y las micobacterias no tuberculosas. Para la preparación del inóculo se realizó una suspensión bacteriana con una asada de 3 a 4 colonias del medio sólido, positivo a BAAR y se resuspendió en 200 µL del buffer o agua destilada estéril y/o 100 µL del fluido de condensación de los tubos y se aplicó directamente en la ventana de la tira donde se deposita la muestra a testar y se esperaron 15 minutos antes de emitir el resultado final de la prueba.



Nota: La intensidad del color de la banda depende de la concentración del Ag MPT64 en el medio de cultivo. En caso donde se invalidó la prueba se repitió el mismo utilizando otra tira.

