***Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara***

***Facultad de Medicina***

***Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología de Villa Clara***



**Título:** Caracterización del diagnóstico de tuberculosis por GeneXpert MTB/Rif

**Autora:** Dra. Yamila González Bermudez. Residente de Microbiología Médica.

**Tutora:** Dra. Maidelys Mendoza Acosta. Especialista de I y II Grado en Microbiología. Máster en Enfermedades Infecciosas. Profesor Asistente.

**Asesora:** Dra. Noira Durán Morera. Especialista de I Grado en Medicina General Integral y de I Grado en Bioestadística. Profesor Auxiliar.

***Trabajo de tesis para optar por el título de especialista de I grado en Microbiología Médica***

***2022***

**Índice**

Exordio

Dedicatoria

Agradecimientos

Resumen **Páginas**

1.Introducción …………………………………………7

2.Objetivos …………………………………………….15

3.Marco teórico ……………………………………….16

4.Diseño metodológico ………………………………37

5.Análisis de los resultados ………………………….41

6.Discusión de los resultados ………………………..47

7.Conclusiones ………………………………………...57

8.Referencias bibliográficas

9.Anexos

***¨Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.¨***

***Albert Einstein***

**Dedicatoria**

A mis padres por su amor incondicional y apoyo constante, a mi hermana adorada por ser mi mejor y gran ejemplo a seguir, a mi pequeño Guille por alegrar mi vida, a mi compañero y mano derecha durante todos estos años y a mi abuela que me acompaña siempre y cuida desde el cielo.

**Agradecimientos**

Quiero agradecer a mis padres porque sin ellos hubiese sido imposible haber llegado hasta aquí. A mi hermana que siempre me ha guiado y ayudado a elegir el mejor camino. A mi Adri por apoyarme siempre en cada paso de mi carrera. Mi agradecimiento además, para los profesores que , de una manera u otra, aportaron sus conocimientos y experiencias para la realización de este trabajo.

**Resumen**

**Introducción:** El GeneXpert MTB/Rif es una prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real recomendada desde el año 2010 que es capaz de detectar simultáneamente la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a la Rifampicina en un plazo de dos horas. **Objetivo:** Caracterizar el diagnóstico de tuberculosis por GeneXpert MTB/Rif en el Laboratorio Provincial de Microbiología y Química Sanitaria del Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología de Villa Clara en el periodo enero 2018–diciembre 2020. **Metodología:** Se realizó un estudio descriptivo transversal. La población de estudio estuvo constituida por 710 muestras de pacientes sospechosos de tuberculosis. **Resultados:** Del total de muestras estudiadas resultaron positivas 131 (18.5%); siendo Ciego de Ávila y Camagüey, las provincias con mayor porcentaje de positividad, con 53.8% y 32.0% respectivamente. El esputo fue el tipo de muestra predominante y con mayor positividad con un 20.7%. El grupo de los previamente tratados obtuvo el mayor porcentaje de positividad (40.0%). Se detectaron 11 casos resistentes a la Rifampicina, de los cuales 7 pertenecieron a la provincia de Camagüey. Se obtuvo una sensibilidad de 96.6% y una especificidad de 89.1% con respecto al cultivo de medio sólido. **Conclusiones:** El esputo resultó ser la muestra más útil para la realización de GeneXpert MTB/Rif. En las muestras positivas se detectó una baja resistencia a la Rifampicina. Se obtuvieron indicadores de rendimiento adecuados para la técnica.

**Introducción**

Con el nombre de tuberculosis (TB) se designa la enfermedad infecciosa causada  
por bacilos del género *Mycobacterium*, incluidos en el denominado complejo  
*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis, M. bovis, M. caprae, M. microtti, M.*  
*pinnipedii, M. canettii y M. africanum*) y por otras especies de micobacterias  
oportunistas potencialmente patógenas para el hombre.1-3

Afecta al ser humano sobre todo a nivel pulmonar, manifestándose con tos crónica, producción de esputo, anorexia, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y hemoptisis; también puede producir enfermedad extrapulmonar.4

La asociación entre tuberculosis y el hombre precede a la historia escrita. Fue descubierta en momias pertenecientes a la predinastía egipcia (3500- 2650 a.c.) y en restos humanos ubicados en Suecia e Italia que datan del período Neolítico. La literatura expone la labor de Teófilo Jacinto Laënnec en el siglo XIX, quien atendía a los tísicos y hacía las autopsias de los que morían.5,6

Décadas después, Schonlein da el nombre actual de tuberculosis.Un impacto científico importante lo constituye el descubrimiento del *Mycobacterium tuberculosis*. El 24 de marzo de 1882, en Alemania, el científico Robert Koch describe el agente patógeno de esta enfermedad infecciosa.5,6

En 1998 se secuenció el genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis*, dando inicio a numerosas investigaciones. Entre otras cosas, han evidenciado la diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis*, con seis linajes, predominando cada uno de ellos en distintos lugares del mundo. Esta diversidad se traduciría también en características fenotípicas, con repercusiones clínicas y diagnósticas. Se han observado diferencias entre linajes en el tropismo por localizaciones y en la virulencia.7

*Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria aerobia estricta y de lenta multiplicación. La envoltura celular de esta micobacteria se caracteriza por la presencia de una variedad de lípidos complejos que constituyen el 60% de su peso total, lo cual le confiere una baja permeabilidad, lo que contribuye a la dificultad para combatir las enfermedades micobacterianas, dotando al microorganismo con resistencia innata a los agentes terapéuticos y a las defensas del hospedero. La tuberculosis se puede desarrollar como una infección latente o como una enfermedad activa; la forma latente implica un estado reversible de la bacteria en el cual las células pueden permanecer largo tiempo sin dividirse, mientras que la enfermedad activa corresponde a la forma sintomática en la que los bacilos tuberculosos se replican causando daños en los tejidos.8-10

En el ámbito mundial, se estima que 10 millones de personas (intervalo: 8.9 – 11,0 millones) enfermaron de tuberculosis en 2019, una cifra que se ha ido reduciendo muy lentamente en los últimos años. Se calcula que en 2019 se registraron 1.2 millones (intervalo: 1.1–1.3 millones) de muertes por tuberculosis entre personas VIH-negativas (frente a los 1.7 millones de 2000,) y otras 208 000 muertes (intervalo: 177 000– 242 000) entre personas VIH-positivas (frente a las 678 000 de 2000).Los hombres (edad ≥15 años) representaron el 56% detodos los casos de tuberculosis en 2019. En comparación,las mujeres constituyeron el 32% y los niños (edad <15años) el 12%. De entre todos los casos, el 8.6% fueron personascon VIH.11

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2019 hubo 290 000 casos nuevos y recaídas de TB en la Región de las Américas. La cifra representa un aumento con respecto al 2018, cuando se estimaron 282 000 casos, y corresponde a 3% de la carga mundial de 9,9 millones de casos. En el 2019, se estimó que 10% de los pacientes de las Américas tenían coinfección TB/VIH y 3.7% presentaban tuberculosis resistente a la Rifampicina o multiresistente (TB-RR/MDR). En el 2019 se estimó que 88.1% de los casos de TB en las Américas se encontraban en 12 países. Un poco más de la mitad se concentran en tres países: Brasil (33.1%), Perú (13.4%) y México (10.3%).12

En Cuba, en el año 2020, se reportó un total de 532 casos de tuberculosis, de los cuales 339 fueron hombres y 133 mujeres. Los grupos etarios más afectados fueron los comprendidos a partir de los 15 años de edad en adelante, con solo siete casos en pacientes de uno a 14 años, y dos en menores de un año. Hubo un predominio de la tuberculosis pulmonar, con 461 casos. Las provincias más afectadas fueron La Habana, Villa Clara, Ciego de Ávila y Santiago de Cuba con 158, 51, 50 y 49 casos respectivamente.13

El diagnóstico de la tuberculosis es integral, pues procedimientos como: la radiología, exámenes de laboratorio clínico, la reacción de la tuberculina, el uso de anatomía patológica apoyados en la historia clínica, pueden sugerir la presencia del patógeno, pero su demostración mediante el cultivo constituye “la regla de oro”.14

La dificultad de diagnóstico ha sido un obstáculo crucial para dar una respuesta eficaz a los problemas de la tuberculosis en particular y luego a la TB asociada al VIH y la tuberculosis multidrogoresistente (TB-MDR).14

Antes del año 2007 las recomendaciones para el diagnóstico de TB se basaban en la realización de la baciloscopia (BK) del esputo por tinción de Zielh-Neelsen (ZN) o fluorescencia convencional y el cultivo en medio sólido de Löwenstein-Jensen  
(LJ).15-17

La baciloscopia es la prueba más ampliamente usada en el mundo para el diagnóstico de la tuberculosis, la cual se caracteriza por ser sencilla y rápida para detectar la presencia del bacilo mediante la valoración microscópica de una muestra de la lesión.8,18,19

Con este método se detectan microorganismos calificados como bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). La detección de casos con baciloscopia positiva BAAR (+) es determinante ya que son los más contagiosos y presentan una mortalidad elevada. El registro y notificación de estos casos permite realizar una vigilancia bacteriológica hasta la condición de curado del paciente.11,18,19

La BK es la prueba más comúnmente utilizada en la mayoría de los entornos con recursos limitados para el diagnóstico de la TB; sin embargo, tiene varias limitaciones: demuestra bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), pero no diferencia el *M. tuberculosis* de otras micobacterias no tuberculosas (MNT), su sensibilidad es limitada, y no permite detectar la resistencia a los fármacos.15

El desarrollo reciente de la tecnología dio lugar al microscopio de fluorescencia el mismo usa un sistema de iluminación basado en la luz emitida por un diodo (LED) con un tiempo de vida útil de hasta diez mil horas, que constituye el microscopio de florescencia LED (MF LED).20

La más conocida es la tinción de auraminarodamina. La sensibilidad de las tinciones fluorescentes es un 10% superior. Requieren mayor experiencia del observador y disponer de microscopio de fluorescencia. Recientemente se han diseñado los MF LED, que son más económicos y requieren menor mantenimiento, lo que permiten su instauración en países de baja renta.7

El cultivo sirve para complementar el diagnóstico de TB. En los casos de TB diagnosticada por bacteriología, detecta el 20–30% de casos que no se diagnostican con baciloscopia. Es un proceso de diagnóstico tardío por el lento crecimiento del bacilo que tarda de 30 a 60 días.21

Es la prueba diagnóstica más sensible y la considerada de referencia. El dintel de positividad está en 10-100 bacterias/ml, de 50-100 veces más sensible que la microscopía. Debido al crecimiento lento de las micobacterias, la muestra debe someterse a un proceso previo de eliminación de la flora bacteriana acompañante, conocido como descontaminación, especialmente importante en el esputo, en el que siempre están presentes bacterias de la flora oral.7,22

Otro requerimiento importante para la realización del cultivo es la infraestructura sofisticada de los laboratorios de bioseguridad, generalmente de nivel III.8

Los medios para cultivar micobacterias son específicos. Los más conocidos son los sólidos que incorporan huevo entre sus componentes, como el de Löwenstein-Jensen, diseñado durante el primer tercio del siglo XX. Con menor difusión también se utilizan otros sólidos, como Coletsos, Trudeau y Ogawa. Entre los medios sólidos con agar y sin huevo los más usados son Middlebrook 7H10 y  
7H11.7,22

Ante las desventajas del cultivo en medio sólido, se han plantado nuevas alternativas para sustituir los cultivos tradicionales con sistemas de radiocultivo líquido automatizado, en los cuales se empela como única fuente de carbono el Palmitato-C. Estos sistemas funcionan detectando los desechos metabólicos gaseosos radioactivos, que se generan entre 10 y 15 días de cultivo, indicando el crecimiento de la bacteria. Este método posibilita una detección más rápida, pues puede detectar crecimiento del bacilo en una semana en pacientes con frotis positivo y en dos semanas en aquellos con frotis negativo; además es un método más sensible que el cultivo convencional (70% a 95% frente a 60% a 80%).8

Posteriormente se han desarrollo métodos más automáticos, basados en fluorescencia, que evitan los inconvenientes de la radiactividad. Actualmente se dispone de tres sistemas fluorimétricos validados: BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, MD, EE. UU.), MB BacT (BioMerieux, Francia) y VersaTREK (Termo Fisher, MA, EE. UU.).7

Las pruebas inmunocromatográficas constituyen un avance dentro de los métodos de identificación a partir del cultivo. El más novedoso, es el basado en el antígeno MPT64 y está comercializado bajo tres marcas diferentes: Capilia TB (TAUNS, Japón y Nippon Becton Dickinson Co, Ltd, Japón), SD TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics, Corea) y BD MGIT TBc Identification Test (Becton Dickinson). Se basa en la reacción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno MPT64, una de las proteínas predominantes excretadas por *Mycobacterium tuberculosis complex,* con la excepción de algunas subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG.23

Es un método sencillo y de bajo costo, por lo que se ha convertido en alternativa a las sondas de ácidos nucleicos en la práctica de rutina. Estudios de meta-análisis demuestran una sensibilidad del 97-99% y una especificidad del 99-100% en aislamientos clínicos, sin diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos comercialmente disponibles.23

Las pruebas que usan suero como muestra para determinar el estado de salud, son adecuadas para países con recursos limitados porque a menudo requieren equipos fácilmente disponibles, aunque estos no son 100% satisfactorios para la detección de TB. Actualmente, es común tener antígenos precargados en una membrana de nitrocelulosa y agregarles muestras de suero o sangre completa. Estas pruebas a menudo se desarrollan en pocos minutos y, por lo tanto, son candidatos muy atractivos para el diagnóstico de TB simple, preciso, económico e idealmente en las localidades donde viven los pacientes sin necesidad de acudir a la clínica. Desafortunadamente, a pesar de las décadas empleadas para desarrollar una prueba serológica idealmente sensible y específica que pueda detectar con éxito la TB, hasta ahora no ha habido ningún avance real.24

Las técnicas moleculares se constituyen en los avances más recientes y validados para el diagnóstico de la tuberculosis. Estas pruebas permiten incluso la tipificación de las micobacterias en aquellas muestras donde los métodos de cultivo y otras técnicas convencionales de detección son negativas.8,25

Los métodos moleculares más comunes que reporta la literatura son:

**Amplificación mediada por transcripción (sigla en inglés TMA):** Amplified *M. Tuberculosis* Direct test (AMTD, Gen probe).

**Amplificación convencional del DNA por PCR:** Amplicor *Micobacterium tuberculosis test* (Roche).

**Amplificación de desplazamiento de la hebra (sigla en inglés SDA):** BD ProbeTec ET Direct Sistem de TB (DTB, Becton Dickinson).

**Ensayos en base sólida de hibridización:** Rif INNO-Lipa. Kit TB (Innogenetics, Gent, Bélgica), el MTBDR plus genotype y el genotype *Mycobacterium* Direct (MD) assays (Hain Lifescience, Nehren, Alemania).

**PCR en tiempo real (sigla en inglés RT PCR):** Cobas Taqman, MTB test (Roche), GeneXpert MTB/Rif (Cepheid Diagnostics, Ginebra, Suiza) y Light Cycler PCR (Roche).25,26

Esta técnica se basa en amplificación de diferentes dianas de ADN y detección fluorimétrica por sondas marcadas como TaqMan, o biosondas FRET, entre otros. Estos ensayos tienen ventajas importantes, especialmente su rapidez y menos problemas de contaminación cruzada.26

El GeneXpert MTB/Rif es una prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real recomendada por la OMS desde el año 2010 que es capaz de detectar simultáneamente la presencia de *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina (TB-RR) en un plazo de dos horas.15

Puede ser utilizada con muestras pulmonares (esputo) y extrapulmonares de pacientes con síntomas de TB, entre éstas el líquido pleural, cefalorraquídeo y aspirado de ganglios. No deben ser procesadas muestras de sangre, heces, líquido ascítico y pericárdico por este método. Para el año 2013, se comenzó a  
implementar la prueba GeneXpert MTB/Rif en países de Latinoamérica como Brasil, Colombia, Costa Rica, Haití, Guatemala, Guyana, Surinam, México y El Salvador. En Honduras se comenzó a utilizar en el 2016.21

Para el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI‑TBLM) y el Programa Nacional de Control (PNC) de Cuba constituye una prioridad contar con herramientas que permitan un diagnóstico oportuno, tanto de la TB como de la resistencia a las drogas.27

El PNC junto al LNRI‑TBLM elaboró normativas basadas en las recomendaciones de la OMS, dirigidas a los grupos vulnerables (GV) con más probabilidad de contraer TB y desarrollar resistencia a las drogas antituberculosas. El empleo del ensayo molecular en GV, como los pacientes infectados por el VIH‑SIDA, pudiera repercutir de manera positiva en el diagnóstico oportuno de la TB, ya que su mayoría cursa con baciloscopia negativa, así como en los casos de pacientes reclusos y ex reclusos. Adicionalmente, permitiría detectar de forma rápida la resistencia a rifampicina en personal que realiza intercambio con países con elevada carga de TB resistente.27

En Cuba se implementó el diagnóstico molecular de la tuberculosis mediante GeneXpert MTB/Rif en el año 2014 en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Actualmente, el país cuenta con tres laboratorios que poseen la tecnología GeneXpert MTB/Rif ubicados en las provincias de La Habana, Villa Clara y Holguín; los cuales brindan servicios regionales que abarcan el resto de las provincias del país. En Villa Clara se implementó dicha tecnología en el año 2018 en el Laboratorio Provincial de Microbiología y Química Sanitaria del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio que caracterice el rendimiento del GeneXpert MTB/Rif en el laboratorio, lo cual ha motivado el desarrollo de esta investigación.

**Problema científico:** ¿Qué aspectos caracterizan el diagnóstico de tuberculosis por GeneXpert MTB/Rif en el Laboratorio Provincial de Microbiología y Química Sanitaria de Villa Clara en el periodo enero 2018 – diciembre 2020?

**Objetivos**

**General:**

Caracterizar el diagnóstico de tuberculosis por GeneXpert MTB/Rif en el Laboratorio Provincial de Microbiología y Química Sanitaria del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Villa Clara en el periodo enero 2018-diciembre 2020.

**Específicos:**

1. Describir la positividad de la técnica según variables de interés epidemiológico.
2. Establecer la relación de los resultados de GeneXpert MTB/Rif con los resultados de la baciloscopia y el cultivo.
3. Demostrar la detección de resistencia a la Rifampicina según las provincias y grupos vulnerables.
4. Determinar el rendimiento de la técnica en el laboratorio del CPHEM de Villa Clara.

**Marco teórico**

El diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis (TB) depende del examen directo del esputo en búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) o del aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) en el cultivo.28,29

La muestra más examinada es el esputo debido a que la tuberculosis pulmonar es la más frecuente. Sin embargo, dado que la enfermedad puede manifestarse en cualquier órgano, con menor frecuencia puede requerirse la investigación de muestras muy variadas como son: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, sangre, pus de cavidades abiertas, biopsias, entre otras. Estas muestras de lesiones extrapulmonares deben procesarse también por cultivo y/o (para algunos tipos de muestras, especialmente líquido cefalorraquídeo y biopsias) mediante una prueba rápida molecular (como el GeneXpert MTB/Rif o el GeneXpert MTB/ Ultra Rif)30,31.

**Baciloscopia**

La baciloscopia es una técnica que se utiliza para observar la presencia de bacilos que hay en una muestra de esputo y se realiza mediante una tinción ácido-alcohol resistente, la cual hace posible la detección de todos los géneros de *Mycobacterium tuberculosis.*32

Tras identificar un paciente con sospecha de enfermedad tuberculosa, se recogen tres muestras de esputo. En la primera atención de sospecha se recolecta la primera muestra, para lo cual se le explica al paciente cómo realizar la expectoración para expulsar el esputo. La segunda, se debe recoger al día siguiente, a primera hora de la mañana, repitiendo la misma técnica y la tercera muestra se toma al tercer día. Todas las muestras deben ser enviadas al laboratorio lo antes posible para su procesamiento, correctamente etiquetadas con la identificación de cada paciente.30,32,33

Un envase de boca ancha de 30 a 50 ml facilita que el paciente coloque toda la expectoración dentro del envase, reduciendo la posibilidad de pérdidas de muestra y también facilita el trabajo del laboratorio, principalmente en la evaluación de la calidad de la muestra, la ubicación de la partícula útil y la realización del extendido. El cierre hermético evita derrames durante el transporte y la producción de aerosoles cuando se abre en el laboratorio. Las tapas a presión no se deben utilizar pues conllevan mayor riesgo de formación de aerosoles y salpicaduras en el momento de ser retiradas. El material plástico transparente permite observar la calidad de la muestra. No se deben lavar y reutilizar frascos de vidrio, para evitar posibles errores en la baciloscopia originados en la transferencia de material de una muestra a otra y minimizar la manipulación de material potencialmente infeccioso.30,34

Una buena muestra tiene de 3 a 5ml, es generalmente espesa y mucosa. Puede ser fluida y con partículas de material purulento. El color es variable (blanco, amarillento y hasta verdoso) y a veces son sanguinolentas.34

A pesar de los múltiples avances efectuados en los últimos años en el diagnóstico de la TB, la baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen continúa siendo la base del diagnóstico y seguimiento de la TB por su sencillez, rapidez, reproducibilidad en todos los ámbitos, bajo costo y detecta los casos contagiosos de la comunidad, lo que constituye la base del diagnóstico y seguimiento de la TB.8,35,36

La ácido-alcohol resistencia se correlaciona con el alto contenido en lípidos de la pared celular y con la presencia de un tipo específico de ácido grasos llamados ácidos micólicos. Esta peculiar composición confiere a la célula una alta hidrofobicidad. Para poner de manifiesto la ácido-alcohol resistencia, la tinción de Ziehl-Neelsen emplea tres colorantes:

* Mezcla de fucsina-fenol (carbolfucsina): cuando se aplica en caliente es capaz de teñir todo tipo de células bacterianas, incluidas las *Mycobacterias*. El fenol facilita la penetración de la fucsina básica en la pared celular.
* Agente decolorante: es una solución de ácido clorhídrico en etanol con un elevado poder de decoloración que, no obstante, es insuficiente para arrastrar la fucsina asociada a la pared celular de *Mycobacterias*.
* Colorante de contraste: azul de metileno, que cumple el mismo papel que la safranina en la tinción de Gram.35,37

En Cuba, a cada lámina se le realiza la lectura según lo establecido en el Manual de Normas y Procedimientos del Programa Nacional de Control de la TB. La codificación se establece de acuerdo con el número de bacilos observados en 4 líneas (2 horizontales y 2 verticales):

0 BAAR en 4 líneas: código 0

1-5 BAAR en 4 líneas: el propio número

6-24 BAAR en 4 líneas: código 6

+25 BAAR en 4 líneas: código 7

+25 BAAR en 1 línea: código 8

BAAR observados en la mayoría de los campos: código 9

La sensibilidad de esta tinción para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes es del 74% y la especificidad del 98%, teniendo un límite de detección de 5,000-10,000 bacilos/ml de muestra.8,35,36

Su principal inconveniente es su moderada sensibilidad, que está condicionada por la localización y el grado de afectación de la enfermedad, la calidad de la muestra y el tiempo que dedica el observador para determinar que una baciloscopia es negativa.35

**Cultivo**

El cultivo es esencial para la confirmación y para la realización de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos; constituye la prueba estándar de referencia para el diagnóstico de la tuberculosis por su implementación sencilla, además de su alta sensibilidad.7,8,21,38

El cultivo es considerado actualmente la técnica *gold standard* para el diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis, ya que se pueden detectar entre 10 y 100 bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* por ml de muestra.22

Es un proceso de diagnóstico tardío por el lento crecimiento del bacilo, de 30 a 60 días. Debido a que detecta únicamente bacilos vivos, es el método ideal para demostrar curación de los pacientes.21,22

Se realiza en medios sólidos a base de huevo: Ogawa, Löwenstein-Jensen y en medios líquidos: Middlebrook 7H9, Middlebrook 7H10.7,10,22,38

Se utilizan muestras que pueden estar contaminadas, entre éstas: esputo, hisopado laríngeo, lavados bronquial y gástrico, orina, piel, heces, biopsias de lesiones abiertas y tejido post mortem. Estas muestras deben ser sometidas a un proceso de descontaminación para mejorar la recuperación de micobacterias viables.34,39

Es posible alcanzar un alto porcentaje de recuperación de micobacterias presentes en especímenes clínicos en tanto los procedimientos de descontaminación y digestión se lleven a cabo correctamente. La digestión contribuye a la liberación de las micobacterias del material en el que se hayan contenidas, mientras que la descontaminación tiene como fin eliminar la competencia de microorganismos de más rápido crecimiento que las micobacterias tuberculosas.34

Existen varios métodos de descontaminación. Los más utilizados son el método de Petroff modificado NALC-NaOH, Kudoh Ogawa, método del Ácido Sulfúrico (H2SO4) al 4% y el método del Laurilsulfato (de Tacquet y Tison).El método de elección para la descontaminación de las muestras es el de Petroff.34,40

En Villa Clara se utiliza además el método de agitación y precipitación lenta de Valdivia y colaboradores, ideal para laboratorios de recursos limitados por su sencillez, menor costo y bajo riesgo para el manipulador, mostrando igual productividad y bajo índice de contaminación que el método de Petroff, empleado por la red de laboratorios nacionales.41

El bacilo de la tuberculosis puede crecer utilizando glicerol como fuente de carbono y asparagina e iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes. Metaboliza el glicerol a piruvato. Otro componente clave para el desarrollo del bacilo es la albúmina, habitualmente incorporada en los medios de cultivo con el agregado

de huevos de gallina o seroalbúmina bovina. Algunos medios sintéticos contienen biotina y catalasa para estimular el desarrollo de bacilos dañados.40,42

Cuando sólo es posible utilizar medios a base de huevos, conviene sembrar las muestras en Löwenstein-Jensen y Stonebrink u Ogawa simultáneamente. En la medida en que sea posible, es conveniente agregar además algún caldo o medio con agar especialmente para las muestras que contienen bajo número de bacilos, como son la mayoría de las extrapulmonares.40

*Mycobacterium tuberculosis* se ha adaptado a vivir a la temperatura corporal del hombre y en la oscuridad. Se multiplica mejor cerca de los 37ºC, la velocidad de desarrollo disminuye al alejarse de esa temperatura, muy difícilmente crece por debajo de los 34ºC y puede morir por encima de los 40ºC. La luz solar (UV) es perjudicial para su sobrevivencia.42

Tan prolongada incubación a 37ºC debe ser hecha en tubos, viales o botellas que además de ofrecer bioseguridad, eviten la desecación. A la vez el bacilo es aerobio estricto y por eso debe quedar atrapada una atmósfera de oxígeno dentro del tubo, vial, botella o placa.40,42

De ser positivo el cultivo, se observarán colonias de color blanco a crema, secas, rugosas, opacas, polimorfas y de dimensiones variables cuando el medio es sólido, o turbidez si es líquido. Se debe realizar siempre la confirmación morfológica por microscopía a partir del cultivo.8

Las principales ventajas del cultivo radican en que constituye el diagnóstico definitivo de la TB y presenta una mayor sensibilidad, lo que permite aumentar significativamente el número de casos identificados en comparación con la microscopía. Las desventajas se basan en su complejidad, mayor costo, así como el tiempo de espera para los resultados. Por otro lado, la aplicación de estas técnicas requiere una infraestructura de laboratorio con niveles de bioseguridad apropiados para procesar las muestras y realizar el cultivo, que no está en la actualidad universalmente disponible en los países de alta carga de tuberculosis.22

**GeneXpert MTB/Rif**

El ensayo GeneXpert MTB/Rif, es una plataforma de PCR en tiempo real automatizada, integrada y semicuantitativa, que utiliza la plataforma GeneXpert (Cepheid). Esta prueba identifica el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y detecta las mutaciones más frecuentes en el gen rpoβ asociadas a resistencia a rifampicina (RIF), directo de muestras de pacientes con síntomas de tuberculosis, en menos de dos horas. El GeneXpert MTB/Rif Assay está indicado para utilizarse con muestras de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis que no hayan recibido tratamiento antituberculosis o que hayan recibido menos de tres días de tratamiento. Esta prueba está concebida como una ayuda para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar cuando se usa junto con los resultados clínicos y otros hallazgos de laboratorio.43-49

La prueba GeneXpert MTB/Rif fue aprobada por la OMS para la evaluación de muestras pulmonares en diciembre de 2010, especialmente en entornos con altas tasas de tuberculosis asociada al VIH y de tuberculosis multirresistente.50-52

Los sistemas del instrumento GeneXpert automatizan e integran la purificación de muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de la secuencia diana a través de ensayos de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real y PCR en tiempo real. Los sistemas constan de un instrumento, un ordenador personal y software precargado para realizar las pruebas y ver los resultados. Los sistemas requieren el uso de cartuchos GeneXpert desechables, de un solo uso, que contienen los reactivos de RT-PCR y PCR, y alojan ambos procesos. Al tratarse de cartuchos autónomos, la contaminación cruzada entre muestras se reduce al mínimo.53,54

El cartucho del GeneXpert MTB/Rif funciona como un mini laboratorio de biología molecular, en cuyo interior se realizan todos los pasos para realizar la PCR en tiempo real: la liberación del ADN, la combinación con los reactivos, la amplificación y la detección a través de fluorescencia liberada por sondas específicas. Para ello, el cuerpo del cartucho se encuentra segmentado en distintas cámaras, las que contienen todas las soluciones y reactivos necesarios para la realización de la técnica.46,53

El GeneXpert MTB/Rif Assay incluye reactivos para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina a partir de muestras de esputo sin procesar y sedimentos de esputo concentrados. En el cartucho se incluye, además, un control de procesamiento de muestras (SPC) y un control de comprobación de la sonda (PCC). El SPC está presente para controlar el procesamiento adecuado de las bacterias diana y monitorizar la presencia de inhibidores en la reacción PCR. El control de comprobación de la sonda (PCC) comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo.46,54

El GeneXpert MTB/Rif Assay detecta simultáneamente el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina mediante la amplificación de una secuencia del gen rpoBespecífica del complejo MTB, que se sondea con cinco balizas moleculares (sondas A–E) para detectar mutaciones en la región determinante de resistencia a la rifampicina (RRDR). Cada baliza molecular está marcada con un fluoróforo diferente. El umbral de ciclo (Ct) máximo válido está definido en 39.0 para las sondas A, B y C, y en 36.0 para las sondas D y E, para el análisis de datos MTB/Rif.54,55

***Reactivos e instrumentos***

El kit del GeneXpert MTB/Rif Assay contiene reactivos suficientes para procesar 10 muestras de pacientes o de control de calidad. El kit contiene lo siguiente:

**Cartuchos del GeneXpert MTB/RIF Assay con tubos de reacción integrados**

Microesfera 1 (liofilizada): dos de cada por cartucho

• Polimerasa

• dNTP (desoxinucleósidos trifosfato)

• Sonda

• BSA (Albúmina sérica bovina)

Microesfera 2 (liofilizada): dos de cada por cartucho

• Cebadores

• Sondas

• BSA (Albúmina sérica bovina)

Microesfera 3 (liofilizada): una por cartucho

• Control de procesamiento de muestras (SPC) ~6000 esporas no infecciosas de *B. globigii*

Reactivo 1 (4 ml por cartucho)

• Tampón Tris

• Tensioactivos

• EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

Reactivo 2 (4 ml por cartucho)

• Tampón Tris

• Tensioactivos

• EDTA (ácido etilenediaminetetraacético)

**Reactivo para muestras (8 ml por frasco)**

• Hidróxido de sodio

• Isopropanol

**Pipetas de transferencia desechables: 12**

**CD: 1 por kit**

• Archivo de definición de ensayo (ADF): ADF para uso con los sistemas GeneXpert Dx e Infinity

• Instrucciones para importar el ADF en el software GeneXpert

• Prospecto54

***Conservación y manipulación***

Se deben conservar los cartuchos y los reactivos del GeneXpert MTB/Rif Assay a una temperatura entre 2°C y 28°C. No se deben utilizar los reactivos ni los cartuchos después de la fecha de caducidad indicada. El cartucho es estable un máximo de 6 semanas a una temperatura entre 2°C y 45°C, después de abrir la bolsa. No debe abrirse el cartucho hasta que esté listo para realizar la prueba. No se debe utilizar ningún reactivo que presente turbidez o un cambio de color.54

***Muestras***

El ensayo GeneXpert MTB/Rif puede emplearse para diagnosticar la tuberculosis en diversas muestras de origen pulmonar y extrapulmonar. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud ha publicado un listado con las muestras recomendadas para realizar el ensayo, que incluye los valores de sensibilidad y especificidad para cada una.46,53

En general, la prueba está recomendada para todas las muestras pulmonares: expectoración espontánea e inducida, contenidos gástricos y lavados broncoalveolares, con valores de sensibilidad y especificidad globales de 88 y 99% respectivamente, cuando se utiliza como prueba inicial en reemplazo de la baciloscopia. Para la resistencia a rifampicina se reporta una sensibilidad de 95% y una especificidad de 98%.53

La sensibilidad es muy alta para tuberculosis pulmonar en adultos que tienen una baciloscopia y cultivo positivos (98%), pero para pacientes con baciloscopia negativa y cultivo positivo, la sensibilidad es de 68%. Para los pacientes coinfectados con VIH se ha reportado una sensibilidad de 79% y en los niños con tuberculosis pulmonar, la sensibilidad alcanza el 65% para muestras de expectoración o de contenido gástrico.53

Respecto a las muestras extrapulmonares, los valores de sensibilidad y especificidad varían de acuerdo a la localización y cantidad de bacterias en la muestra. En tejido o aspirado de ganglio la sensibilidad alcanza un 85%, para líquido cefalorraquídeo (LCR), un 79.5% y menos de 50% para líquido pleural, por lo que este último no está recomendado para el diagnóstico.46,49,53

Las muestras de fluido ascítico, fluido pericárdico, orina, sangre y deposiciones no deben ser procesadas mediante esta metodología. Se debe tener presente que cualquier muestra con trazas de sangre o xantocromía pueden generar falsos negativos.53-55

La cantidad mínima para realizar la prueba GeneXpert MTB/Rif depende de la naturaleza de la muestra:

Expectoración: 1 mL

Líquidas (salivas y LCR): >500 µl

Tejido ganglionar: La cantidad recolectada

Siempre se debe considerar un volumen extra al mínimo indicado para la realización del cultivo.46,53

***Procedimiento para la obtención de muestras pulmonares***

Estas muestras provienen del árbol bronquial y pueden ser espontáneas o inducidas. La expectoración o esputo obtenido de manera espontánea es considerada la de mejor rendimiento (tanto para baciloscopia, cultivo y GeneXpert MTB/Rif) y para obtenerla el paciente debe toser de acuerdo a lo indicado por el personal a cargo en el contenedor recomendado. Tiene la gran ventaja de que es económico y fácil de realizar, pero requiere de una buena educación del paciente para obtener una muestra de calidad. Es responsabilidad del personal de salud informar al paciente sobre la importancia de una expectoración de calidad, que debe provenir de los pulmones y que la mucosidad de la nariz o garganta y la saliva no son buenas muestras. Se le debe proveer al paciente un recipiente plástico con tapa rosca y agua para que enjuague la cavidad bucal previo a la recolección de la muestra (se debe evitar el uso de otro líquido para el aseo inicial).46,53

La expectoración inducida está indicada en pacientes que no pueden producir una muestra espontánea o en niños. Se induce la expectoración por maniobras kinésicas o por nebulización laríngea. Se debe considerar que puede producir muestras acuosas y que requiere de equipo y personal especializado. Los lavados y aspirados realizados en pacientes con incapacidad de expectorar no están recomendados, ya que los anestésicos empleados en el procedimiento disminuyen la viabilidad del bacilo y pueden producir un retardo en el desarrollo o un cultivo falso negativo.53,55

En relación al contenido gástrico, este tipo de muestra se utiliza principalmente para el diagnóstico de tuberculosis infantil. El procedimiento recupera el esputo adherido en la garganta que ha sido tragado, no obstante, además de ser incómodo para el paciente, requiere equipamiento y debe ser realizado por profesionales capacitados específicamente.53,54

***Muestras extrapulmonares***

La OMS recomienda el uso de las siguientes muestras extrapulmonares para la prueba del GeneXpert MTB/Rif:

* Líquido cefalorraquídeo (LCR)
* Nódulos Linfáticos u otros tejidos (las muestras deben ser procesadas en Cabinas de Seguridad Biológica)53,55

Las muestras de LCR son generalmente paucibacilares y pueden ser procesados de una manera similar a la del esputo. Sin embargo, la concentración de la muestra por centrifugación (sedimento) puede proporcionar mejores resultados en la prueba. Se requiere un laboratorio con un gabinete de bioseguridad (CSB) para abrir los vasos de la centrífuga y decantar el sobrenadante. Las muestras líquidas que pueden recibirse en el laboratorio dentro de jeringas deben ser procesadas en CSB para realizar el GeneXpert MTB/Rif. Se deposita el contenido de la jeringa en un tubo cónico de 50 ml, para prevenir la formación de aerosoles. Las muestras de tejidos necesitan ser homogeneizadas usando molinos de tejidos o morteros, se pueden generar aerosoles por lo que las muestras deben ser procesadas en CSB.53

***Preparación de las muestras pulmonares***

Se debe velar por que las muestras recibidas hayan mantenido la cadena de frío entre 2°C y 8°C durante su transporte hacia el laboratorio. Debe existir correspondencia de los datos del paciente según orden médica, a partir de la cual se le asignará un código para cada muestra. La codificación asignada debe estar indicada en la orden médica, así como en el recipiente que contiene la muestra. Se estima el volumen de la muestra en su recipiente y se transfiere al tubo de 15ml. En caso se tratase de un tejido ganglionar, se debe homogenizar previamente en un mortero con 0.5 ml de solución salina. Se añade el reactivo de la muestra en la proporción 2:1 al tubo de 15 ml. Se tapa el tubo cuidadosamente y se agita enérgicamente de 10 a 20 veces o se puede colocar en el mezclador vórtex por 10 segundos. Se incuba a temperatura ambiente durante un total de 15 minutos. Entre cinco y diez minutos de iniciarse el periodo de incubación, se agita enérgicamente 10 a 20 veces o se coloca de nuevo en el mezclador vórtex como mínimo durante 10 segundos.46,54,55

***Preparación de las muestras extrapulmonares***

**Nódulos Linfáticos y Tejidos:**

Se debe cortar la muestra de tejido utilizando tijeras y pinzas estériles; se colocan en un homogeneizador o molino de tejidos. Seguidamente se añaden 2 ml de solución salina (PBS) y se coloca el tejido en el homogenizador hasta obtener una suspensión homogénea. Se deja reposar para que las partículas mayores sedimenten en el fondo, durante cinco a diez minutos. Se añade 0,7 ml del sobrenadante en un tubo cónico con tapa de rosca, asegurándose de que no se transfieran grumos de tejido. Se añade 1,4 ml del reactivo de muestra del GeneXpert MTB/Rif. Finalmente se inocula el cartucho con 2 ml o un poco más y se inicia la prueba.55

**Líquido céfalorraquídeo (LCR):**

-Muestras de LCR con más de 5 ml: Se transfiere a un tubo cónico y se centrifuga (3000g durante 15 minutos). Se decanta el sobrenadante en un recipiente con solución desinfectante. Se resuspende el sedimento hasta un volumen de 2 ml utilizando el reactivo de muestra del GeneXpert MTB/Rif y se inocula el cartucho con la muestra procesada para iniciar la prueba.

-Muestras de LCR con 1-5 ml (incluyendo muestras con sangre): Se añade igual volumen de reactivo de muestra del GeneXpert MTB/Rif. Se añade 2 ml en el cartucho y realiza la prueba.

-Muestras de LCR con 0,1-1 ml: Se añade 2 ml de reactivo de muestra de GeneXpert MTB/Rif. Se inocula 2 ml en el cartucho y se inicia la prueba.

-Muestras de LCR con menos de 0,1 ml: Es una muestra insuficiente para realizar GeneXpert MTB/Rif.55

***Preparación del cartucho GeneXpert MTB/Rif***

Se coloca una etiqueta en el lado izquierdo o derecho del cartucho. Se retira la tapa del cartucho GeneXpert MTB/Rif, se aspira la muestra licuada hasta la línea de 2 ml de la pipeta o justo por encima de ella y se vacía la pipeta en la cámara de la muestra del cartucho. Finalmente se vuelve a colocar la tapa en el cartucho. Se inserta en el módulo correspondiente y se da inicio a la prueba de acuerdo al protocolo establecido.46,54,55

***Fundamento molecular de la técnica***

Las cinco sondas utilizadas en la prueba GeneXpert MTB/Rif contienen un fluoróforo reportero que se encuentra apagado por acción del supresor. Cuando estas sondas encuentran su diana, la unión de ambas libera al fluoróforo de la proximidad del supresor con lo que se emite luz. El sistema óptico del equipo detecta la luminiscencia y el software interpreta el resultado. Cuando todas las sondas reconocen a su diana en la secuencia de la RRDR significa que el MTB está presente y no hay resistencia a rifampicina (no hay zonas del gen mutadas). En caso de que exista alguna mutación, algunas sondas no se unirán a su diana, pero otras sí lo harán, y esta situación significa que MTB está presente en la muestra y que tiene una resistencia genética a Rifampicina. Finalmente, si ninguna de las sondas se une a su diana, significa que no se detectan bacterias del complejo MTB. La elevada especificidad de las sondas por sus dianas permite que GeneXpert MTB/Rif detecte con una alta certeza la presencia de complejo MTB y la resistencia a Rifampicina en una muestra clínica. Los valores de sensibilidad dependen de la muestra utilizada y de la cantidad de bacilos presentes. Respecto a la sensibilidad analítica, se ha informado que el límite de detección del cartucho GeneXpert MTB/Rif corresponde a cinco copias de genoma de *M. tuberculosis*, y a 131 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro) en muestras de expectoración. En la actualidad se ha desarrollado una nueva prueba que se realiza en la misma plataforma del GeneXpert MTB/Rif y que se denomina GeneXpert MTB/Rif Ultra. Esta prueba mejora la sensibilidad para el diagnóstico de MTB logrando detectar hasta 16 UFC, y mejorando además la precisión de la detección de la resistencia a rifampicina.46,53

***Resultados e interpretaciones de GeneXpert MTB/Rif***

El sistema del instrumento GeneXpert MTB/Rif genera los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y los algoritmos de cálculo integrados. Es un examen de PCR semicuantitativa, por lo que los resultados se expresan de la siguiente manera:

**MTB detectado, Resistencia a RIF detectada**

- La muestra contiene la secuencia diana de MTB:

- Se ha detectado una mutación en el gen rpoβ que está dentro del intervalo válido para delta Ct.

- SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal de SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control.

- Comprobación de la sonda: PASS (CORRECTO). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.

**MTB detectado, Resistencia a RIF no detectada**

- La muestra contiene la secuencia diana de MTB.

- No se ha detectado ninguna mutación en el gen rpoβ.

- SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal de SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control.

- Comprobación de la sonda: PASS (CORRECTO). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.

**MTB detectado, Resistencia a RIF indeterminada**

- La muestra contiene la secuencia diana de MTB:

- No se pudo determinar la resistencia a RIF debido a una detección insuficiente de la señal.

- SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal de SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control.

- Comprobación de la sonda: PASS (CORRECTO). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.

**MTB no detectado**

- No se ha detectado la secuencia diana de MTB en la muestra.

- SPC: PASS (CORRECTO). El SPC cumplió los criterios de aceptación.

- Comprobación de la sonda: PASS (CORRECTO). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.

**Inválido**

- No se puede determinar la presencia o ausencia de MTB. El SPC no cumple los criterios de aceptación, la muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la PCR. Se debe repetir la prueba.

- MTB INVALID (MTB NO VÁLIDO): No se puede determinar la presencia o ausencia de ADN de MTB.

- SPC: FAIL (INCORRECTO). El resultado para la secuencia diana de MTB diana es negativo y el Ct del SPC no está dentro del intervalo válido.

- Comprobación de la sonda: PASS (CORRECTO). Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.

**Error**

- No se puede determinar la presencia o ausencia de MTB. Se debe repetir la muestra.

- MTB: NO RESULT (SIN RESULTADO)

- SPC: NO RESULT (SIN RESULTADO)

- Comprobación de la sonda: FAILL (INCORRECTO). Uno o todos los resultados de comprobación de la sonda han fallado.

Si la comprobación de la sonda es correcta, el error se debe al fallo de un componente del sistema.46,53-55

De acuerdo al valor del Ct, los resultados correspondientes a MTB detectado se informan de la siguiente manera:

-Alto: menos de 16 ciclos

-Medio: de 16 a 22 ciclos

-Bajo: de 23 a 28 ciclos

-Muy bajo: más de 28 ciclos49

***Ventajas del GeneXpert MTB/Rif***

Los resultados se obtienen en un plazo de menos de dos horas. Es capaz de detectar al mismo tiempo la presencia del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a la Rifampicina, que es el fármaco de elección para el tratamiento de la tuberculosis. La técnica presenta niveles de sensibilidad y especificidad elevados con respecto a los métodos de diagnóstico convencionales. Es una técnica sencilla que no requiere de personal altamente calificado, solamente adiestrado. Es un procedimiento de bajo riesgo, por lo que requiere condiciones mínimas de bioseguridad. Es mucho más sensible que la baciloscopia para el diagnóstico de la enfermedad, incluso en casos de coinfección TB/VIH. Con respecto al cultivo en medio sólido, la sensibilidad es similar.

***Desventajas del GeneXpert MTB/Rif***

GeneXpert MTB/Rif no es capaz de detectar micobacterias de especies diferentes a las del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (micobacterias no tuberculosas). Es una tecnología costosa y no es adecuada para llevar el seguimiento laboratorial de los pacientes enfermos. Detecta la resistencia a sólo un medicamento antituberculoso. Al ser una técnica de detección y amplificación de ácidos nucleicos, no discrimina la viabilidad de los bacilos tuberculosos. El equipo requiere de suministro estable e ininterrumpido de electricidad. Las muestras pulmonares diferentes del esputo y las extrapulmonares presentan menor sensibilidad.

**Resistencia a la Rifampicina**

La rifampicina es una ansamicina semisintética, introducida en 1968 y es uno de los medicamentos más importantes en el tratamiento de primera línea de TB y es un factor clave en la determinación de la efectividad del mismo, esto se debe a que más del 90% de cepas resistentes a Rifampicina, también son resistentes a isoniacida.56-59

***Mecanismo de acción de la Rifampicina***

La rifampicina posee acción bactericida y esterilizadora; actúa aún sobre bacilos que están metabolizando lentamente, mata a los persistentes y termina de esterilizar el esputo de los pacientes.56-60

La rifampicina se une a la ARN polimerasa de la micobacteria e interfiere durante el proceso de replicación y síntesis de ácido nucleico. La ARN polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades: a, ß, ß’ y s; codificadas por los genes rpoA, rpoB, rpoC y rpoD, respectivamente.62-65

Además de esta interferencia, se describe que induce la formación de radicales hidroxilo en las cepas sensibles, lo que contribuye a aumentar su poder bactericida.61

La rifampicina es muy activa frente al complejo *M. tuberculosis* con valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) entre 0,005 0,2mg/l, *M. kansasii, M. leprae* y *M. xenopi*. En el caso del complejo *Mycobacterium avium* las resistencias superan el 50%, y las micobacterias de crecimiento rápido suelen ser siempre resistentes. En el resto de especies la actividad es más variable como ocurre con *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans* y *Mycobacterium haemophilum*. En general, las cepas del complejo *M. tuberculosis* se consideran sensibles con CIM < 1 mg/l y la tasa de mutantes resistentes espontáneos es de ocho a diez. Por otro lado, este antimicrobiano también es activo frente a una amplia variedad de microorganismos no ácido-alcohol resistentes.56,57

***Metabolismo farmacológico de la Rifampicina***

La rifampicina se absorbe bien por vía oral y en ayunas, alcanzando en una a dos horas concentraciones séricas de 5-10 mg/l tras una dosis de 600 mg. La vida media es de unas 3 horas, que se acorta con los tratamientos prolongados, en cambio se alarga en caso de fallo hepático, pero no en caso de fallo renal. Este antibiótico es muy lipofílico, con un gran volumen de distribución, difundiendo rápidamente a pulmón, riñón, glándulas suprarrenales e hígado donde las concentraciones pueden superar a las séricas. Penetra poco en LCR (mejor en situación de meninges inflamadas, con un 50% respecto al nivel sérico) y llega bien al líquido pleural, peritoneal y sinovial.56,57

El metabolismo es hepático y se excreta por vía biliar (40%) y renal (30%). Sus efectos tóxicos incluyen hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales y reacciones de hipersensibilidad, entre otros. Este fármaco produce un color naranja en la orina, lágrimas y otros fluidos corporales. La rifampicina es un potente inductor de las enzimas microsomales hepáticas (citocromo P450-3A) lo que acelera el metabolismo de otros fármacos, en especial los inhibidores de la proteasa utilizados en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodefiiencia humana (VIH). Por ello en estos casos se sustituye por la rifabutina que tiene un efecto menor sobre estos fármacos.56,57,66

***Mecanismos de resistencia a la Rifampicina***

La resistencia a rifampicina aparece después de la resistencia a otros medicamentos antituberculosos, y es por esto que se ha convertido en un marcador de tuberculosis multidrogorresistente.59

Se ha demostrado que mutaciones en rpoB producen cambios conformacionales en la subunidad ß de la ARN polimerasa, disminuyendo la afinidad por rifampicina y otorgando resistencia al fármaco. Pese a que el gen rpoB tiene un tamaño de 3.534pb, el 96 o 97% de las mutaciones que causan resistencia a rifampicina están localizadas en una región de 81pb entre los codones 507–533, y consisten por lo general en mutaciones puntuales no sinónimas. De acuerdo con los resultados de diversos estudios, en el 40–70% de los aislados, se observaron mutaciones puntuales en el codón 531 Ser por Leu (TCG- TTG) o por Thr (AGC- ACA). Del 32–36% de las cepas estudiadas mostraron cambios en el codón 526 His; y del 7–9% en el codón 516 Asp. También se han reportado mutaciones o deleciones de menor frecuencia en otros codones como: 498, 511–518, 524–527, 456, 531, 533. En los últimos años se han observado algunos aislados resistentes cuya mutación no se localiza en la región de 81 pb, por lo cual se propone la existencia de mecanismos adicionales generadores de resistencia.58,62,67-69

Dadas las mutaciones en el gen *rpoB*, el fitness bacteriano se reduce debido a que la efectividad de la ARN polimerasa se ve afectada y por ello, la transcripción no se lleva a cabo de manera normal lo que genera alteraciones en el tiempo de duplicación, infectividad y patogenicidad. Sin embargo, se ha observado que el costo del fitness es mejorado parcial o completamente por mutaciones compensatorias.58,70

Estudios recientes han añadido más polémica al tema, al demostrar que la medición del fitnesspuede variar según el ensayo utilizado y, más aún, que pueden  
obtenerse distintos resultados si se comparan valores obtenidos *in vitro* con los obtenidos *in vivo*. Al mismo tiempo, los costos ocasionados por las mutaciones que confieren resistencia a drogas pueden ser minimizados por mutaciones compensatorias, sin pérdida de la resistencia y sin afectar mayormente la capacidad de crecimiento. Estas mutaciones pueden ser de costo mínimo para las células.70

Las cepas resistentes a rifampicina presentan resistencia cruzada a drogas químicamente relacionadas o con sitios de acción similares dentro de la célula, como rifapentina y parcialmente a rifabutina y rifalacina.62

***Pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos***

Las pruebas de sensibilidad pueden realizarse por métodos fenotípicos o genotípicos. Las primeras precisan micobacterias en fase de crecimiento activo en los medios de cultivo, por lo que los resultados se demoran un mínimo de dos a tres semanas si se utilizan medios líquidos, y hasta de cuatro a ocho semanas en el caso de los medios sólidos. Puede ser un tiempo excesivo en la decisión del tratamiento ideal que debe recibir el enfermo. Por el contrario, las pruebas moleculares permiten disponer de resultados en 24-48 horas, al detectar por técnicas de amplificación genética mutaciones en los genes que codifican la resistencia a fármacos antituberculosos.62,71

Existen diferentes métodos fenotípicos o asociados a cultivo bacteriano, entre los cuales se destacan los siguientes:

**Método de las proporciones BACTEC:** Este método descrito por Canneti y Groset, mide la proporción de colonias que han crecido en medios con concentraciones críticas de antibióticos, en relación con el crecimiento observado en un medio sin antibiótico. Dicho método es la base del sistema automatizado BACTEC, el cual consiste en el sembrado de los bacilos previamente cultivados en un medio líquido Middlebrook, rico en ácido palmítico con carbono.57,60,62

**Bactec MGIT 960:** El método del tubo indicador de crecimiento micobacteriano o Bactec MGIT 960s (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc) es un sistema para crecimiento y detección de *Mycobacterium* completamente automatizado; funciona mediante un sensor especial de fluorescencia sensible al consumo de O2, que permite monitorear el crecimiento microbiano, presenta una  
sensibilidad del 100% y una especificidad del 89,8%, para estreptomicina.57,60,62

**Microscopic Observation Drug Susceptibility assay (MODS):** Este método detecta la resistencia de *M. tuberculosis* a isoniacida y rifampicina, directamente de las muestras de esputo. Tomando como base que el crecimiento del bacilo es más rápido en medio líquido que en medio sólido, esta técnica consiste en examinar mediante un microscopio de luz invertida, placas de cultivo con medio Middlebrook 7H9 y el antibiótico a evaluar, inoculadas con muestras de esputo; detectando en un promedio de siete días la forma de cordón de las microcolonias características  
de TB.57,60,62

**Micobacteriófagos:**  Ofrece resultados fenotípicos en poco tiempo y a bajo costo. Las dos técnicas de mayor aceptación basadas en micobacteriófagos son la Phage-amplified Biological Assay (phaB, amplificación biológica de fagos) y la Luciferase Reporter Phages (LRP, identificación de fagos reporteros de luciferasa).57,60,62

**Métodos de óxido reducción: alamar azul, resazurina y actividad nitroreductasa:** El alamar azul es un método colorimétrico que se basa en la utilización del colorante alamar azul como indicador de óxido reducción; cuando hay presencia de células viables, dicha reacción se lleva a cabo y el medio de cultivo cambia de una coloración azul a rosa. El ensayo de micro valoración con resazurina (o REMA por sus siglas en inglés), es un método colorimétrico que permite, a partir de bacilos aislados de esputo, determinar drogorresistencia en un periodo de una semana. Consiste en la incorporación del indicador resazurina a medio de cultivo líquido con diferentes concentraciones de antibiótico, si el bacilo se mantiene vivo, se detecta un cambio de color azul a rosa, como resultado de la reducción del  
indicador. Otra técnica similar es nitroreductasa o) prueba de Griess. Se fundamentada en la actividad de la enzima nitroreductasa, que le confiere a *Mycobacterium tuberculosis* la capacidad para reducir el nitrito en nitrato al emplear NaNO3 en el medio de cultivo, detectando la resistencia mediante un cambio de color, que puede ir del rosa al violeta en función de la cantidad de bacilos.57,60,62

Los avances en la tecnología de diagnóstico, nos han llevado al borde de una escala global masiva en los esfuerzos para prevenir y controlar la tuberculosis multidrogorresistente. Aunque los métodos fenotípicos también han avanzado; por primera vez en la historia podemos detectar en dos horas cantidades de nanogramos de ADN bacteriano específico directamente en muestras de esputo en lugar de buscar bacterias acidorresistentes bajo un microscopio o cultivarlos.60,71

La aplicación de métodos de diagnóstico genotípicos ha sido posible, entre otras cosas, gracias a la secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, y a la identificación y caracterización de genes asociados a drogoresistencia. Estos métodos ofrecen la posibilidad de identificar mutaciones asociadas a tuberculosis drogorresistente de forma precisa y generar resultados a partir de 100 bacilos o menos por muestra.62

En todas las técnicas moleculares el primer paso es la extracción del material genético y la amplificación, mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR, de la región que contiene la(s) mutación(es) responsable(s) de la resistencia, para posteriormente identificarse mediante el empleo de alguno de los siguientes métodos:

-Secuenciación genómica

-Sistemas de detección por fluorescencia mediante PCR en tiempo real

-Polimorfismo conformacional de hebra sencilla por PCR (SSCP, Polymerase Chain reaction single stranded conformational polymorphism)

-Ensayo de prueba en línea (LiPA, Line probe assay)

-GenoType MTBDRplus

-Microdispositivos de ADN (DNA Microarray)57,62

Entre estas técnicas moleculares es necesario resaltar el GeneXpert MTB/Rif que puede detectar resistencia a rifampicina en un plazo de dos horas, con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 98%. Y también el Genotype MDRplus (Hain) o ensayo de prueba en línea (Line Probe Assay), que puede detectar simultáneamente mutaciones en los genes que codifican resistencia a Isoniacida (katG e inhA) y Rifampicina (rpoB) en un plazo de seis a 24 horas.71,72

La prueba GeneXpert MTB/Rif está revolucionando la detección y el diagnóstico de la tuberculosis en general y específicamente de la tuberculosis resistente a la Rifampicina. La principal ventaja del GeneXpert MTB/Rif se basa en ser un método integral, rápido y con una manipulación mínima. Este hecho ha permitido su difusión y su realización en múltiples laboratorios en los que la única prueba diagnóstica disponible era la microscopía.57,71

Los inconvenientes más importantes de GeneXpert MTB/Rif son que únicamente detecta la resistencia a la rifampicina que, a pesar de ser un buen marcador de tuberculosis multidrogorresistente, no es la resistencia más frecuente; y el elevado coste económico. Actualmente, hasta el año 2022 se mantiene un precio de 10 USD por cartucho para los países de bajos recursos económicos y con alta incidencia de tuberculosis. En los países de renta elevada el coste es de seis a siete veces superior.57,71

**Diseño metodológico**

**Contexto de la investigación.**

Se realizó un estudio descriptivo transversal en el Laboratorio Provincial de Microbiología y Química Sanitaria del CPHEM de Villa Clara en los años 2018 al 2022.

**Población y muestra.**

La población de estudio estuvo constituida por 710 muestras de pacientes sospechosos de tuberculosis, a las que se les realizó la técnica de GeneXpert MTB/Rif en el periodo enero 2018 – diciembre 2020.

**Métodos, técnicas y procedimientos.**

La información fue obtenida a partir de los libros de registro del Departamento de Micobacterias, para lo cual se utilizó una guía de observación documental confeccionada por el autor (Anexo 1). Los datos obtenidos fueron plasmados en una base de datos.

**Procedimientos de laboratorio.**

A las muestras recibidas en el laboratorio se les realizó la técnica de GeneXpert MTB/Rif según el Procedimientos Normativos de las Operaciones (PNO) establecido (Anexo 2). De ellas se les realizó también examen directo y cultivo (Anexos 3 y 4) a 296 muestras que fueron recibidas en cantidades suficientes para realizar los tres procedimientos.

**Operacionalización y conceptualización de las variables.**

**Positividad de GeneXpert MTB/Rif:** Variable cualitativa dicotómica. Se refiere a la evidencia o no de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* detectad*o*. Se consideraron:

* Si
* No

**Provincias de la región central:** Variable cualitativa politómica nominal. Se refiere a la división administrativa local en que se organiza la región central del país. Se consideraron:

* Cienfuegos
* Villa Clara
* Sancti Spíritus
* Ciego de Ávila
* Camagüey

**Tipo de muestra:** Variable cualitativa politómica nominal. Se refiere al material biológico obtenido de pacientes sospechosos de tuberculosis. Se consideraron:

* Esputo
* Material de biopsia
* Líquido céfalo raquídeo (LCR)
* Otros líquidos biológicos diferentes de sangre y orina (líquido pleural, líquido bronquial, líquido ascítico, líquido pericárdico, líquido sinovial, contenido gástrico)

**Grupos vulnerables:** Variable cualitativa politómica nominal. Se refiere a grupos de personas que reúnen características que los hacen susceptibles a padecer tuberculosis73. Se consideraron:

* Contacto con paciente TB
* VIH
* Recluso o ex recluso
* Previamente tratado
* Extranjero
* Intercambio personal de países alta carga TB
* Trabajador de la salud
* Niño
* Otras enfermedades asociadas
* Fumador
* Alcohólico
* Internamiento prolongado
* Otros

**Resultados de GeneXpert MTB/Rif:** Variable cualitativa politómica ordinal. Se refiere a los resultados emitidos de acuerdo a la detección y amplificación o no del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* y a la carga bacilar de la muestra. Se consideraron:

* TB detectado alto
* TB detectado medio
* TB detectado bajo
* TB detectado muy bajo
* TB no detectado

**Resultados del cultivo:** Variable cualitativa dicotómica. Se refiere al crecimiento o no de *Mycobacterium tuberculosis* en medios de cultivo sólidos. Se consideraron:

* Positivo
* Negativo

**Resultados de la baciloscopia:** Variable cualitativa dicotómica**.** Se refiere a la presencia o no de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en las muestras después de realizada la coloración de Ziehl-Neelsen. Se consideraron:

* Positivo
* Negativo

**Resistencia a Rifampicina:** Variable cualitativa politómica nominal. Se refiere a la detección o no de mutaciones en el gen gen rpoβ asociadas a resistencia a Rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis* mediante el GeneXpert MTB/Rif. Se consideraron:

* No detectada
* Detectada
* Indeterminada

**Procesamiento y análisis de los datos.**

Los datos correspondientes a cada variable fueron llevados a ficheros y procesados con la ayuda de los programas: SPSS, versión 22.0 para Windows, EPIDAT, versión 3,1 y Microsoft Excel versión 2016.

Como medidas de resumen para variables cualitativas se hizo uso de frecuencias absolutas y relativas (porciento).

Para probar la hipótesis nula (H0) de que existe homogeneidad en la distribución de los resultados del GeneXpert MTB/Rif entre los resultados positivos y negativos del cultivo y de la baciloscopia, se realizó la prueba de Chi cuadrado de Homogeneidad que resultó en un estadígrafo y su probabilidad (p) asociada. Se trabajó con una confiabilidad de 95 % (α=0,05), de manera que si p≤0,05, se rechazó H0 y se asumió que no existe homogeneidad (existe diferencia) entre los resultados positivos y negativos.

Para evaluar la eficacia del GeneXpert MTB/Rif como prueba diagnóstica, con relación al cultivo, como prueba de referencia, se determinaron los indicadores básicos: Sensibilidad y Especificidad; así como sus intervalos, con un nivel de confianza 95 %.

Los resultados del estudio se mostraron en texto y tablas.

**Consideraciones éticas del estudio.**

La investigación se realizó conforme a lo descrito en su protocolo de inicio y los datos registrados fueron empleados solamente con fines científicos acorde a los principios éticos de las investigaciones recogidas en la Declaración de Helsinki y revisiones posteriores.

La realización de este trabajo investigativo se justifica éticamente por el aporte de información necesaria que contribuirá a un mejor diagnóstico, manejo y tratamiento de las enfermedades infecciosas.

**Análisis de los resultados**

**Tabla 1:** Positividad del GeneXpert MTB/Rif en el Laboratorio de Microbiología y Química Sanitaria del CPHEM de Villa Clara, en el periodo enero 2018-diciembre 2020



**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

De un total de 710 muestras a las que se les realizó GeneXpert MTB/Rif, 131 resultaron positivas para un 18.5%.

**Tabla 2:** Positividad del GeneXpert MTB/Rif según provincias de la región central



**\*Por ciento calculado con relación al total de la fila**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

La provincia con mayor número de muestras procesadas fue Villa Clara con 484. Aunque el número de muestras procesadas en el resto de las provincias dista mucho al de Villa Clara, los mayores porcentajes de positividad correspondieron a Ciego de Ávila y Camagüey, con 53.8% y 32.0% respectivamente.

**Tabla 3:** Positividad del GeneXpert MTB/Rif según tipo de muestra



**\*Por ciento calculado con relación al total de la fila**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

El esputo fue el tipo de muestra predominante y con mayor por ciento de positividad con un 20.7%. A pesar de que el resto de las muestras fueron procesadas en menor número, obtuvieron porcentajes de positividad próximos al del esputo.

**Tabla 4:** Positividad del GeneXpert MTB/Rif según grupos vulnerables



**\*Por ciento calculado con relación al total de la fila**

**\*\*Pacientes no definidos en la indicación, por lo que no se toma esta categoría como predominante**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

La técnica se aplicó con mayor frecuencia en pacientes reclusos o ex reclusos y con otras enfermedades asociadas. Con respecto a la positividad, los grupos con mayor porcentaje fueron los previamente tratados con un 40.0%, seguido de los trabajadores de salud con un 28.0%, los reclusos o ex reclusos con un 27.6%, los alcohólicos con un 25.9% y los pacientes VIH positivos con un 24.5%.

**Tabla 5:** Resultados del GeneXpert MTB/Rif



**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

Predominó el resultado de TB no detectado con un 81.5%. En los casos donde existió resultado de TB detectado, predominaron el alto y medio con un 6.3% y 6.2% respectivamente.

**Tabla 6:** Resultados del GeneXpert MTB/Rif según los resultados del cultivo



**Chi cuadrado=193,615 p=0,000**

**\*Por ciento calculado con relación al total de la columna**

**\*\*TB detectado alto, medio, bajo y muy bajo**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

Se les realizó ambos métodos diagnósticos a 296 muestras; de ellas 58 resultaron positivas al cultivo, de las cuales 56 se corresponden con resultado de TB detectado en el GeneXpert MTB/Rif. De las muestras positivas al cultivo, 2 obtuvieron resultado de TB no detectado. De 238 muestras con cultivo negativo, 26 fueron diagnosticadas como positivas mediante la técnica GeneXpert MTB/Rif. De acuerdo al test estadístico usado, existe una relación de dependencia entre los resultados de ambas variables (p=0,000).

**Tabla 7:** Resultados del GeneXpert MTB/Rif según los resultados de la baciloscopia



**Chi cuadrado=206,355 p=0,000**

**\*Por ciento calculado con relación al total de la columna**

**\*\*TB detectado alto, medio, bajo y muy bajo**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

De las 296 muestras a las que se les realizó ambos métodos diagnósticos, 52 resultaron positivas a la baciloscopia, las cuales se corresponden con el resultado de TB detectado en el GeneXpert MTB/Rif. De 244 muestras negativas al examen directo, 214 se corresponden con TB no detectado para un 87.7%. De acuerdo al test estadístico usado, existe una relación de dependencia entre los resultados de ambas variables (p=0,000).

**Tabla 8:** Resultados del GeneXpert MTB/Rif según la resistencia a la Rifampicina



**\* Por ciento calculado con relación al total de la fila**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

Se detectó resistencia a la Rifampicina en 11 muestras (8.4%), con predominio en los TB detectado alto para un 15.6% del total de los detectados en esta categoría.

**Tabla 9:** Resistencia a la Rifampicina según provincias de la región central



**Chi cuadrado=20,742 p=0,02**

**\* Por ciento calculado con relación al total de la fila**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

El mayor por ciento de casos resistentes a la Rifampicina lo aportó la provincia de Camagüey con 7 (29.2%). Villa Clara, a pesar de ser la provincia con la mayor cifra de *Mycobacterium tuberculosis* detectado, sólo aportó el 4% de la resistencia al fármaco. De acuerdo al test estadístico usado, existe una relación de dependencia entre los resultados de ambas variables (p=0,02).

**Tabla 10:** Resistencia a la Rifampicina según grupos vulnerables



**\*Por ciento calculado con relación al total de la columna**

**\*\*Pacientes no definidos en la indicación, por lo que no se toma esta categoría como predominante**

**Fuente: Registro de pacientes del Laboratorio del CPHEM de Villa Clara.**

El grupo de los pacientes previamente tratados por tuberculosis mostró una mayor resistencia a la Rifampicina, con un 36.4%.

**Tabla 11:** Rendimiento del GeneXpert MTB/Rif para el diagnóstico de la tuberculosis



**Fuente: Tabla 6.**

Los indicadores de rendimiento mostraron un 96.6% de sensibilidad y un 89.1% de especificidad, para un intervalo de confianza de un 95%.

**Discusión de los resultados**

GeneXpert MTB/Rif es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real directamente sobre muestras clínicas, que permite la detección precoz del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y de la resistencia a la Rifampicina con niveles de sensibilidad y especificidad elevados en menos de dos horas; lo que contribuye en gran medida al diagnóstico temprano y oportuno de la tuberculosis y a su tratamiento. En el presente estudio se obtuvo una positividad para la técnica de GeneXpert MTB/Rif similar a la que reportan Alex Yasmir L.M et al74 en El Salvador en el año 2017, en un estudio en muestras pulmonares, donde obtienen una positividad de un 20.5.%. Patricio Vallejo V. et al75 en Chile en el 2015, en un estudio sobre el ensayo GeneXpert MTB/Rif en el diagnóstico de la tuberculosis, señalan porcentajes de positividad inferiores con un 8.0% de un total de 529 muestras estudiadas. GeneXpert MTB/Rif al ser una técnica de Biología Molecular, requiere un mayor rigor y cuidado con respecto a la selección de los casos, así como en la recolección, conservación y manejo de las muestras. Estos son factores que influyen directamente en la detección o no de *Mycobacterium tuberculosis*, independientemente de la endemicidad, incidencia o prevalencia de la enfermedad en cada país o región.

El empleo de la tecnología GeneXpert MTB/Rif en el diagnóstico de la tuberculosis, requiere de una mayor extensión a las comunidades y áreas de salud, con el fin de facilitar la accesibilidad de los pacientes sospechosos de la enfermedad, en búsqueda del diagnóstico precoz de la misma para su adecuado manejo y tratamiento. En Cuba, sólo tres provincias cuentan con la tecnología GeneXpert MTB/Rif, las cuales brindan servicio regional al resto de los territorios del país, por lo que se hace inminente la necesidad de ampliar el uso de la técnica en las demás provincias por cuestiones, fundamentalmente, de manejo, transporte y conservación de las muestras, que son factores que influyen directamente en los resultados de la técnica. En la presente investigación, Villa Clara fue la provincia con mayor número de muestras procesadas, pero con por cientos de positividad más bajos que Ciego de Ávila, Camagüey y Cienfuegos. Este resultado en correspondencia con la cercanía de Villa Clara al laboratorio, lo que facilita el acceso del personal de salud a los servicios del Laboratorio de Biología Molecular y sugiere exceso en la prioridad y selección de los pacientes para realizar la técnica de GeneXpert MTB/Rif. Ciego de Ávila y Camagüey fueron las provincias con mayores porcentajes de positividad, a pesar de la pequeña cifra de muestras procesadas. Según el Anuario Estadístico de Salud13, durante los años 2019 y 2020, la provincia de Ciego de Ávila mostró las tasas de incidencia de tuberculosis más elevadas de la región central del país, con valores de 9.4 y 11.4 por cada 100 mil habitantes respectivamente, lo que coincide con el presente estudio. Sin embargo, Camagüey obtuvo las menores tasas de incidencia de la región en ambos años. Villa Clara mostró tasas de incidencia de 6.3 y 6.6 por cada 100 mil habitantes.

La OMS ha publicado un listado de los tipos de muestras que pueden ser utilizadas por la tecnología GeneXpert MTB/Rif, el cual incluye valores de sensibilidad y especificidad para cada uno. De manera general, la técnica puede procesar muestras pulmonares, entre las que se destaca el esputo por su alta sensibilidad respecto a la detección del bacilo, aún en muestras paucibacilares. En cuanto a las muestras extrapulmonares, los valores de sensibilidad y especificidad varían de acuerdo a la localización y cantidad de las mismas. En el presente estudio el 82.9% de las muestras utilizadas correspondió al esputo, el cual obtuvo también la mayor positividad. Resultados similares han reportado otros autores como Darío B.N et al76 en México en el año 2018, en un estudio en muestras respiratorias y no respiratorias, donde obtienen que la mayoría de las muestras analizadas son de origen respiratorio, de las cuales el 62.5% son de esputo. Cindy Carolina Rocío V.M et al77 en Guatemala, en el 2018, en un trabajo de evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina, señalan al esputo como tipo de muestra predominante con un 27.7% de un total de 523 muestras estudiadas. Patricio Vallejo V. et al75 en el 2015 en Chile encuentran que, de un total de 529 muestras estudiadas por GeneXpert MTB/Rif, la mayoría son de origen respiratorio, con predominio del esputo con respecto a la positividad con un 76.7%. Otros estudios muestran resultados diferentes, como Luis Enrique N.C78 en Lima, Perú, en el año 2019, en un estudio sobre el valor diagnóstico de GeneXpert MTB/Rif en muestras de *Mycobacterium tuberculosis*, que encuentra al LCR como muestra predominante, seguido del lavado broncoalveolar y el esputo. Con respecto a la positividad, el lavado broncoalveolar aporta la mayor cifra con 201 muestras (21.0%) de 936. Claudia Cadavid et al79 en Medellín, Colombia, en el año 2021, en un estudio acerca de la contribución del uso de GeneXpert MTB/Rif y su costo-efectividad en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y la resistencia a rifampicina en comparación con métodos diagnósticos no moleculares, encuentran el lavado broncoalveolar como el tipo de muestra más procesada con 1198 de un total de 1574, y de mayor positividad con 152 para un 64.1%. En Cuba, en el año 2018, María Rosarys M.R et al80 en un estudio sobre el impacto del GeneXpert MTB/Rif para el diagnóstico de la tuberculosis en el país, obtienen 110 muestras positivas, de las cuales 108 (98.2%) son muestras respiratorias, en su mayoría esputo. Según un estudio realizado en Santiago de Cuba en 2022, por Dainer Rogelio A.S et al81, acerca del GeneXpert MTB/Rif como método de diagnóstico en la provincia, la mayoría de las muestras analizadas son de esputo (25 para 80.6%); resultados que coinciden con los de la presente investigación. El uso de GeneXpert permitió la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras diferentes al esputo con porcentajes de positividad muy próximos al de este. Esto resulta de gran valor para el diagnóstico de la tuberculosis, si se tiene en cuenta que dichas muestras presentan concentraciones reducidas de bacilos, lo que dificulta el diagnóstico mediante los métodos convencionales.

La tuberculosis a pesar de los avances actuales en su diagnóstico y tratamiento constituye aún un serio problema de salud, y se destaca como una de las primeras causas de mortalidad por enfermedades infecciosas a nivel mundial. La tuberculosis es una enfermedad reemergente que en Cuba se mantiene bajo un riguroso programa de prevención y control que, entre otros aspectos de vital importancia en el diagnóstico y manejo de la enfermedad, establece una serie de grupos vulnerables que demandan una mayor atención y seguimiento. El grupo vulnerable que aportó mayor número de muestras en la presente investigación fue el de los pacientes reclusos o ex reclusos. Varios autores han obtenido resultados diferentes como Fernando Javier R-M.L et al82 en un estudio acerca del perfil de resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a fármacos antituberculosos de primera línea y sus combinaciones, en Barranquilla, Colombia, en el año 2020, con respecto a los factores de riesgo asociados en un grupo de pacientes estudiados (2701), de los cuales el 98.4% padecen tuberculosis pulmonar, encuentran que el 5.78 % presenta infección concomitante con VIH. María Rosarys M.R et al27 en Cuba, en el 2019, en un estudio de evaluación del GeneXpert MTB/Rif para el diagnóstico de la tuberculosis y detección de resistencia a rifampicina en grupos vulnerables, encuentran que el mayor número de muestras estudiadas pertenecen a pacientes VIH/SIDA con 51 (62.2%), de las cuales 9 (17.6%) son positivas a la técnica. Donelia G.S et al83 en La Habana, Cuba, en un estudio de seguimiento de los contactos de casos de tuberculosis en el municipio de Boyeros en el año 2021, encuentran que, en relación a los grupos vulnerables, un 87.2 % son personas de unidades de salud con internamiento prolongado. En el presente trabajo los grupos de los previamente tratados, trabajadores de la salud y reclusos o ex reclusos mostraron los mayores porcentajes de positividad. A pesar de la exhaustiva revisión del tema en el ámbito nacional e internacional, no se encontraron estudios que demuestren la prevalencia de grupos vulnerables a padecer tuberculosis diagnosticados mediante la técnica de GeneXpert MTB/Rif, que permitan establecer una comparación más concreta con los resultados obtenidos. La autora considera que en Villa Clara el uso de GeneXpert MTB/Rif prioriza a los grupos vulnerables, fundamentalmente a los pacientes reclusos o ex reclusos, VIH positivos y pacientes previamente tratados. Esto explica que sean estos grupos los predominantes en el estudio y con mayores porcentajes de positividad.

GeneXpert MTB/Rif emite resultados a partir del reconocimiento de su diana en el gen de la región rpoβ mediante cinco sondas específicas, lo que confirma la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, a la vez que semicuantifica la carga bacilar en la muestra analizada de acuerdo al número de ciclos de amplificación del genoma. En el presente estudio los resultados difieren de los que muestran muestran J.Yang et al84 en un estudio de eficacia del GeneXpert MTB/Rif para el diagnóstico de la tuberculosis con esputo negativo o con escaso esputo en líquido de lavado broncoalveolar, en China en el 2021, donde obtienen de un total de 671 muestras estudiadas, 378 negativas (56.3%) y 293 positivas (43.7%). En cuanto a los resultados de TB detectado, muestran un predominio del bajo (44.7%) y muy bajo (37.2%). A pesar de la extensa revisión bibliográfica, no se encontraron otros trabajos que permitan establecer comparaciones. La autora considera que es necesario el uso de la técnica para el diagnóstico precoz y oportuno de los pacientes sospechosos de tuberculosis.

El cultivo constituye una herramienta básica en el diagnóstico de certeza de la tuberculosis dado su alto nivel de sensibilidad en comparación con otros métodos diagnósticos, razón por la cual se considera el método de oro o de referencia para la confirmación de la enfermedad. Sin embargo, requiere de varios factores que dificultan un diagnóstico precoz y retardan el inicio del tratamiento. El tiempo prolongado que requiere el crecimiento de MTB y los complejos procesos de pre tratamiento de las muestras figuran entre los principales inconvenientes del cultivo. La introducción de nuevos métodos moleculares de diagnóstico, como el GeneXpert MTB/Rif, ha permitido acortar el tiempo de espera de los resultados además de disminuir los riesgos de contaminación en el laboratorio. En la presente investigación GeneXpert MTB/Rif permitió detectar MTB en 26 muestras que resultaron negativas al cultivo, lo que demuestra la capacidad de la técnica para detectar el material genético del bacilo aún en pequeñas concentraciones. Esto hace de GeneXpert MTB/Rif un método de diagnóstico de gran utilidad en muestras paucibacilares y en condiciones de poca viabilidad bacilar. Además, factores relacionados con el manejo de las muestras, como el tiempo transcurrido entre la recolección y procesamiento de las mismas, así como las condiciones de transporte y conservación, pudieron estar relacionados con este resultado. Sin embargo, dos muestras que resultaron negativas al GeneXpert MTB/Rif, fueron positivas al cultivo, lo que demuestra el valor diagnóstico de éste como método de oro. De 296 muestras a las que se le realizaron ambos métodos, 58 fueron positivas al cultivo y al GeneXpert MTB/Rif (19.6%). Resultados similares reportan José O.J et al85 en Ecuador en el 2019, en un trabajo de validación e implementación de GeneXpert MTB/Rif para diagnóstico de tuberculosis, donde encuentran de un total de 1592 muestras procesadas, 403 positivas al cultivo y a GeneXpert MTB/Rif (25.3%). Además, obtienen 81 muestras negativas al cultivo que son positivas al GeneXpert MTB/Rif. Según un ensayo de rendimiento de la prueba GeneXpert MTB/Rif en muestras respiratorias realizado por Santiago Atehortúa et al86 en Medellín, Colombia en el 2015, de un total de 103 muestras estudiadas, 29 son positivas al cultivo y a GeneXpert MTB/Rif (28.1%). Un 5.6% de las muestras son positivas a la técnica con cultivo negativo. María Johanna J.S et al87 en un estudio referente a los hallazgos de GeneXpert MTB/Rif y cultivos en pacientes con tuberculosis drogoresistente, en Ecuador en el año 2020 y Darío B.N et al76, obtienen un 100% de concordancia entre los resultados del cultivo y el GeneXpert MTB/Rif.

A pesar de los avances alcanzados en el diagnóstico de la tuberculosis, la baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen continúa siendo la base del diagnóstico y seguimiento de la enfermedad en muchos países. Esto se debe a su sencillez, reproducibilidad en todos los ámbitos, bajo costo y rapidez en la obtención de los resultados. No obstante, ofrece niveles de sensibilidad muy reducidos en comparación con el resto de los métodos. De las 296 muestras que fueron procesadas mediante examen directo y GeneXpertMTB/Rif en la presente investigación, 52 (17.6%) fueron positivas a ambos métodos. De 244 muestras negativas a la baciloscopia, 30 (12.3%) obtuvieron resultado de TB detectado. Esto demuestra la mayor sensibilidad de la técnica de GeneXpert MTB/Rif respecto al examen directo convencional. Resultados similares reportan José O.J et al85 que obtienen de un total de 1592 muestras estudiadas, 390 (24.5%) positivas a la baciloscopia y al GeneXpert MTB/Rif. Estos autores reportan 27 muestras con examen directo positivo y TB no detectado, a diferencia de esta investigación que no encontró ninguna muestra positiva a la baciloscopia que resultara negativa a GeneXpert MTB/Rif. De igual forma Santiago Atehortúa et al86 obtienen 16 (15.5%) muestras positivas a la baciloscopia y al GeneXpert MTB/Rif, de un total de 103 estudiadas; y encuentran dos muestras positivas al examen directo con TB no detectado. Ana Laura M.B et al88 en un estudio sobre GeneXpert MTB/Rif para el diagnóstico de tuberculosis en condiciones programáticas en una región de alta endemicidad en México, en el 2019 encuentran 129 (47.4%) muestras positivas a ambos métodos, de un total de 272. En 9 (6.5%) muestras la baciloscopia es positiva y el GeneXpert MTB/Rif negativo.

La resistencia a la Rifampicina siempre se produce con posterioridad a la del resto de fármacos antituberculosos, por lo que se considera como alta probabilidad de multidrogoresistencia los casos en que sea detectada. De ahí la importancia de contar con métodos de detección o pruebas de susceptibilidad que permitan detectar la resistencia al fármaco en el menor tiempo posible antes de indicar el tratamiento a los pacientes diagnosticados con tuberculosis. Desde su implementación en Cuba, GeneXpert MTB/Rif ha contribuido en gran medida a la detección precoz de cepas de MTB resistentes a la Rifampicina, con una implicación directa en el adecuado manejo y tratamiento de la enfermedad en estos pacientes. En la presente investigación se obtuvieron resultados similares a los que encuentran Adrián Peñata et al50 en Medellín, Colombia, en el 2016, en un trabajo acerca del diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a Rifampicina con un método automatizado en tiempo real, donde obtienen 1 (2.6%) muestra con resistencia a Rifampicina detectada y 1 (2.6%) indeterminada. No concuerdan con estos resultados Yesenia Lorena A.G et al89 en un estudio de caracterización de casos de tuberculosis confirmada con GeneXpert MTB/Rif del Hospital Nacional San Juan de Dios de San Miguel en El Salvador en el año 2019, donde encuentran 15 (1.0%) muestras resistentes al fármaco y 21 (1.3%) con resistencia indeterminada, de un total de 1563. En el presente estudio se pudo constatar que la región central del país obtuvo cifras muy bajas de resistencia a la Rifampicina durante los años estudiados, aspecto favorable para el adecuado tratamiento y seguimiento de los pacientes.

Las muestras positivas a MTB con resistencia a Rifampicina detectada pertenecieron mayoritariamente a la provincia de Camagüey. No se encontraron referencias del tema en la revisión bibliográfica realizada. Es válido señalar la importancia de mantener un seguimiento minucioso de la enfermedad en la provincia de Camagüey, encaminado particularmente a la búsqueda de factores predisponentes que puedan propiciar la aparición de fármacoresitencia en los pacientes. La resistencia a la rifampicina representa un verdadero obstáculo en la terapéutica de los pacientes enfermos de tuberculosis, al ser éste uno de los fármacos de elección en estos casos.

La vigilancia de la fármacoresistencia en *Mycobacterium tuberculosis,* sobre todo en pacientes vulnerables, constituye una prioridad para el Programa Nacional de Control de la TB en Cuba en el actual contexto en que se avanza hacia a la eliminación de la enfermedad en el país. GeneXpert MTB/Rif ha marcado un paso de avance importante en el diagnóstico de MTB y su resistencia al fármaco en pacientes con factores de riesgo que los hacen susceptibles a padecer la enfermedad. En el presente estudio el grupo de los previamente tratados aportó el mayor porcentaje de muestras con resistencia a Rifampicina detectada con un 36.4%. En el ámbito mundial, la OMS11 reporta en el 2019 que el 17.7% de los casos previamente tratados presentan tuberculosis resistente a Rifampicina y tuberculosis multidrogoresistente. Más del 50% de los casos son pacientes previamente tratados con fármacos antituberculosos. Resultados similares reportan Zahoor D et al90 en el 2018 en La India, en un estudio de evaluación de la microscopía de frotis y GeneXpert MTB/Rif para el diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, donde encuentran de un total de 275 muestras procesadas, tres resistentes a Rifampicina pertenecientes a pacientes previamente tratados con fármacos antituberculosos. De igual manera Raúl M.O et al91 en Perú en el 2018, en un estudio acerca de la distribución geográfica y factores de riesgo de tuberculosis multidrogoresistente, obtienen de un total de 3602 pacientes estudiados, 134 (3.72%) con tuberculosis multidrogoresistente, cuya incidencia es mayor en paciente previamente tratados con una tasa de 4.71 por 100 mil habitantes. Gladys H.M92 en el 2020 en Perú, en un trabajo sobre las características clínicas, epidemiológicas y patrón de resistencia en pacientes con tuberculosis pulmonar drogoresistente en mayores de 15 años, obtiene que el 86.9% de los pacientes estudiados son previamente tratados. Dihadenys L.M et al93 en un estudio sobre la resistencia a fármacos antituberculosos en Cuba en el periodo 2015-2017, concluyen que la resistencia a la Rifampicina es 16 veces más frecuente en pacientes previamente tratados que en los casos nuevos. A partir de los resultados obtenidos y la bibliografía consultada se pudo concluir que el grupo de los previamente tratados, constituye realmente el más propenso a desarrollar fármacoresistencia, sobre todo en el caso de la Rifampicina.

En el presente trabajo GeneXpert MTB/Rif mostró una sensibilidad de un 96.6% y especificidad de un 89.1%. Lacayo de Santana A.C94 et al en un trabajo para demostrar la validez diagnóstica del GeneXpert MTB/Rif para *Mycobacterium tuberculosis* y prueba de resistencia a rifampicina, en El Salvador, en el 2021, obtienen como indicadores de rendimiento de la técnica, valores de sensibilidad de un 98% y de especificidad de un 96%. Gabriela Amaya et al95, en Uruguay en el 2020 en un estudio para la determinación del rendimiento del GeneXpert MTB/Rif en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en la edad pediátrica, obtienen valores de sensibilidad y especificidad de 80% y 99.5%, respectivamente. M. Saeed, S. Iram, S. Hussain et al96 en su estudio sobre el GeneXpert MTB/Rif como nueva herramienta para la detección rápida de resistencia a Rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*, en el año 2017 en Pakistán, encuentran una sensibilidad de 97.5% y especificidad de 98.8%. Cem Celik et al97 en el 2015 en Turquía, en un trabajo sobre la aplicabilidad del ensayo GeneXpert MTB/Rif en el diagnóstico de rutina de tuberculosis, encuentran una sensibilidad de 100% y especificidad de 99%. Riaz Hussain Shah et al98 en Pakistán en el año 2016, en un estudio acerca de la detección rápida de tuberculosis y resistencia a Rifampicina con el ensayo automatizado GeneXpert MTB/Rif, muestran una sensibilidad y especificidad de 91.15% y 100%, respectivamente. Prakash Shrestha et al99 en el 2018 en Nepal, en un estudio sobre el impacto programático de la implementación del GeneXpert MTB/Rif para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias de pacientes sospechosos de tuberculosis, obtienen un nivel de sensibilidad de la técnica de un 85.4% y de especificidad de un 81%. En Cuba, Lilian María M.C et al100 en un estudio sobre la aplicabilidad de la herramienta molecular GeneXpert MTB/Rif en el diagnóstico de tuberculosis en el 2020, obtienen una sensibilidad de 91.18% y especificidad de 95.02%. En la presente investigación GeneXpert MTB/Rif demostró ser una técnica de diagnóstico más sensible que específica, por lo que resultó ser el método adecuado para descartar la presencia de la enfermedad en los pacientes con diagnóstico negativo a la técnica.

**Conclusiones**

Ciego de Ávila y Camagüey fueron las provincias con mayores porcentajes de positividad. El esputo fue el tipo de muestra predominante y con mayor cifra de resultados positivos. El grupo de los previamente tratados aportó el mayor por ciento de positividad. Predominó el resultado de TB no detectado y en los casos donde existió resultado de TB detectado, predominaron el alto y medio. En las muestras analizadas por cultivo, baciloscopia y GeneXpert MTB/Rif, se demostró la relación entre los resultados obtenidos por los tres métodos. Se detectó un bajo por ciento de resistencia a Rifampicina en las muestras positivas a GeneXpert MTB/Rif. La mayoría de los casos resistentes al fármaco pertenecieron a la provincia de Camagüey y al grupo de los previamente tratados. Se obtuvieron indicadores de rendimiento adecuados para GeneXpert MTB/Rif.

**Referencias Bibliográficas**

1- Méndez Fleitas L, Carmona Denis Y, Escalona Robaina C, Moreno Peña L y Ortega Peñate JA. Comportamiento epidemiológico de la tuberculosis. Rev.Med.Electrón. [Internet]. 2018 [citado 2022 Ene 12]; 40(2): 335-345. Disponible en: http//scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1684-18242018000200010&lng=es.

2- Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett’s Principies and Practice of lnfectious Diseases. 8va ed. España: Elsevier; © 2016.

3- Martínez Castellanos AY. Diagnóstico molecular de Mycobacterium tuberculosis, M. bovis y M. bovis BCG mediante amplificación por

círculo rodante con sondas padlock. [Tesis de Maestría. Internet]: San Luis Potosí, 2014 [citado: 2022, 12 febrero]. Disponible en: <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/1533/1/TMIPICYTM3D52014.pdf>

4- Fajardo Dubón GE, Reyes Galo OM, Varela Valladares DE y Medina Ramírez KF. Tuberculosis pulmonar y métodos diagnósticos laboratoriales actuales. Rev. Fac. Cienc. Méd. [Internet]. 2018 [citado 2022 Ene 12];15(2): 35-44. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RFCM/pdf/2018/pdf/RFCMVol15-2-2018-6.pdf>

5- Lugones-Botell M, Ramírez-Bermúdez M, Pichs-García L y Miyar-Pieiga E. Apuntes históricos sobre la epidemiología, la clínica y la terapéutica de la tuberculosis en el mundo. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología [Internet]. 2020 [citado 2 Feb 2022]; 45 (2). Disponible en: <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/663>

6- Amorrosta Castillo I. Detección de la tuberculosis. Revisión Bibliográfica. [Tesis. Internet]: España: Universidad de Cantabria; 2021[citado: 2022, 10 febrero]. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/21998/AMORROSTA%20CASTILLO%2C%20IRAIDE.pdf?sequence=1>

7- González-Martín J. Microbiología de la tuberculosis. Semin Fund Esp Reumatol. [Internet]. 2014 [citado 2022 Feb 12];15(1): 25–33. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-seminarios-fundacion-espanola-reumatologia-274-articulo-microbiologia-tuberculosis-S1577356614000025#:~:text=en%20algunos%20pa%C3%ADses.-,M.,humanos%20son%20el%20hospedador%20preferente>.

8- Jaramillo-Grajales M, Torres-Villa RA, Pabón-Gelves E, Marín-Muñoz PA, Barrientos-Urdinola K, Montagut-Ferizzola YJ, et al. Diagnóstico de tuberculosis: desde lo tradicional hasta el desarrollo actual. Med. Lab. [Internet]. 2015 [citado 12 de febrero de 2022];21(7-8):311-32. Disponible en: <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/129>

9- Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Jawetz, Melnick, & Adelberg’s. Microbiología Médica.27th ed. Estados Unidos: McGraw-Hill Education; © 2016.

10- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 9na ed. España: Elsevier; © 2021.

11- Informe mundial sobre la tuberculosis 2020: sinopsis [Global tuberculosis report 2020: executive summary]. Ginebra: Organizacion Mundial de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/deed.es>).

12- Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275324479>.

13- Anuario estadístico de salud 2020. La Habana 2021; ISSN: versión electrónica 1561-4433. Disponible en: <http://www.who.int/classification/icd/icd10upsdates/en/>

14- Arévalo Barea AR, Alarcón Terán H y Arévalo Salazar DE. Métodos diagnósticos en Tuberculosis, lo convencional y los avances tecnológicos en el siglo XXI. Rev. Méd. La Paz [Internet]. 2015 [citado 2022 Feb 02]; 21(1): 75-85. Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582015000100011&lng=es>.

15- Arias MF y Herrera MT. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. Rev. chil. enferm. respir. [Internet]. 2016 [citado 2022 Feb 12]; 32(4): 254-259. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0717-73482016000400007&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482016000400007>.

16- Molina Cano A, Romero Candel G, Ortega Cerrato A y Pérez Martínez J. Actualización en el manejo de la tuberculosis. 1ra ed. España: Fundación BIOTYC; 2018.

17- Fuentes T. Aplicación de lineamientos para diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Revista ALERTA. [Internet]. 2018 [citado 2022 Feb 02]; 1(2). Disponible en: <https://doi.org/10.5377/alerta.v1i2.7136>

18- Flores Claudio HS. Actualización diagnóstica-microbiológica de la Tuberculosis pulmonar [Tesis. Internet]: Riobamba-Ecuador: Universidad Nacional de Chimborazo; 2020 [citado: 2022, 12 marzo]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/7294>

19- Leon N y Gustavo E. Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas de la tuberculosis [Tesis. Internet]: Machala: Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud; 2019 [citado: 2022, 10 marzo] Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/4>

20- Teran R y H. de Waard J. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. eJIFCC. [Internet]. 2015 [citado 2022 Mar 10]; 26(4): 310-325. Disponible en: <https://www.ifcc.org/media/334117/eJIFCC2015>

21- Peña C, Césped G, Wolff R, Álvarez V, Garay B, Medina P, et al. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar mediante fibrobroncoscopía en pacientes con VIH. Rev. chil. enferm. respir. [Internet]. 2014 [citado 2022 Mar 02]; 30(1): 46-53. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0717-73482014000100008&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482014000100008>.

22- Tucci P. Desarrollo de herramientas que contribuyan al diagnóstico de la infección activa por Mycobacterium tuberculosis. [Tesis de doctorado. Internet] Montevideo: Universidad de la República (Uruguay): Facultad de Ciencias; 2020 [citado: 2022, 12 marzo] 234 h., [p. v.]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/26054/1/uy24-19791.pdf>

23- Moure González R. Detección rápida de Mycobacterium tuberculosis complex y de la resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación. [Tesis de doctorado. Internet] Universidad de Barcelona (España). Facultad de Medicina. 2013 [citado: 2022, 12 marzo]. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/55153>

24- López-Romero W, Flores-Valdez M y Camacho-Villegas TA. Métodos actuales empleados para el diagnóstico de tuberculosis y su eficacia en diversos entornos clínicos. Sal Jal. [Internet]. 2019 [citado 2022 Mar 14]; 6(3):170-180. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2019/sj193e.pdf>

25- Diz Mellado OM. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de

enfermedades infecciosas. NPunto. [Internet]. 2020 [citado 2022 Mar 14]; 3(30): 88-111. Disponible en: <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>

26- Ortiz Marín DC y Aristizábal BH. Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis. MEDICINA U.P.B. [Internet]. 2013 [citado 2022 Mar 14]; 32(2): 144-150. Disponible en: <https://revistas.upb.edu.co/index.php/medicina/article/download/1531>

27- Martínez-Romero MR, Secretário-Chilemo T, Lemus-Molina D, Mederos‑Cuervo LM, Sardinas‑Aragon M, García‑Leon G, et al. Evaluación del Xpert MTB RIF para el diagnóstico de tuberculosis y detección de resistencia a rifampicina en grupos vulnerables. Neumol Cir Torax. [Internet]. 2019 [citado 2022 Mar 20]; 78(3):284-289. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=88977>

28- Asencios Solís L, Quispe Torres N y Vásquez Campos. Procedimientos para el control de la calidad externo de baciloscopía para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. 1ra ed. Lima. 2012. Disponible en: <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1124>

29- Lozano JA. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. OFFARM. [Internet]. 2002 [citado 2022 Mar 20]; 21(8): 102-110. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tuberculosis-patogenia-diagnostico-tratamiento-13035870>

30- Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: Manual de actualización de la baciloscopía/ Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas” -- Lima: ORAS - CONHU; 2018. 88 p.; ilus, tab. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-para-diagnostico-bacteriologico-tuberculosis-parte-1-manual-actualizacion>

31- Bonilla Poma WC, Jaramillo Salazar JC, Roca Mendoza RA y Borja Guzmán ME. Infección por Mycobacterium tuberculosis. Diagnóstico y tratamiento. RECIMUNDO [Internet]. 2021 [citado 15 mar.2022]; 5 (Especial 1): 82-0. Disponible en: <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/1377>

32- Latini S, Delfina M y Barrera L. Manual para el Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis: Normas Y Guía Técnica. Washington D.C., Estados Unidos de América: Pan American Health Organization [Internet]. 2008 [citado 9 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/782/9789275330135.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

33- Struthers K. Clinical Microbiology. 2th ed. México: El Manual Moderno, S.A de C.V. © 2018.

34- Manual de normas y procedimientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis 2016.- San José, Costa Rica: Grupo Técnico Nacional de Tuberculosis, 2016. 82 p.; Pdf. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/protocolos/tuberculosismanual.pdf>

35- Delgadillo J, Padilha C y Rodríguez Ortiz K. Los Pros y Contras de los métodos de métodos de diagnóstico microbiológico de tuberculosis. Facultad de Medicina. Universidad Nuestra Señora de la Paz. [Internet]. 2018 [citado 9 de marzo de 2022]; 1-10. Disponible en: <https://www.unslp.edu.bo/images/medicina/Articulo(2018).%20Los%20pros%20y%20contras%20de%20los%20metodos%20de%20diagnostico%20microbiologico%20de%20tuberculosis.pdf>

36- López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G y Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad. [Internet]. 2014 [citado 9 de marzo de 2022];3(1):10-18. Disponible en:

<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48632>

37- Solis Pancoati MR, Martínez Pérez EF, Reyna Téllez S, Sánchez Salas JL, Manzano Covarrubias AL y Morales Corona R. Laboratorio de Microbiología General Manual de Prácticas. Edición 2019. Universidad de las Américas Puebla. Disponible en: <https://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf>

38- Manual de normas técnicas en tuberculosis. /Ministerio de Salud. Coaut. La Paz: ABBASE. No.449 Editorial 2017. 87p.: ilus. Disponible en: <https://www.minsalud.gob.bo/images/Libros/Tuberculosis/Manual_de_Normas_TB_2017.pdf>

39- Kenneth JR, C. George R, Nafees A, W. Lawrence D, J. Plorde J. Sherris Medical Microbiology. 5ta ed. Estados Unidos: McGraw-Hill Companies, Inc. © 2010.

40- Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2: Cultivo /Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas” -- Lima: ORAS - CONHU; 2008. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/18616>

41- Grechen García L, Sardiña Aragón M, Martínez Romero MR, Mederos Cuervo L y Díaz R. Comparación de los resultados del cultivo utilizando dos métodos de decontaminación de esputo BAAR, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, IPK. revtecnologia. [Internet]. 2014 [citado 9 de marzo de 2022]. Disponible en: <http://www.revtecnologia.sld.cu/index.php/tec/article/download/257/310>

42- Schlossberg D. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial Infections. 7ma ed. USA: American Society for Microbiology. © 2017

43- Using the Xpert MTB/RIF assay to detect pulmonary and extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults and children. Expert Group Meeting Report. © World Health Organization 2013. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112659>

44- Ababa A. Implementation Guideline for GeneXpert MTB/RIF Assay in Ethiopia. ResearchGate. [Internet]. 2014 [citado 9 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/298385664>

45- Sanabria Delgado EV. Evaluación del desempeño de la prueba Xpert MTB/Rif para la detección de Tuberculosis en un Hospital Público de Bucaramanga. [Tesis de Maestría. Internet]. Bogotá D.C: Universidad CES- Facultad de Ciencias de la Salud. 2018 [citado 2022, 12 marzo]. Disponible en: <https://repository.urosario.edu.co/handle/10336/18047>

46- Guía de Procedimiento para detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la plataforma de GeneXpert MTB/RIF. Subunidad de Soporte al Diagnóstico- Patología Clínica. 2021. Disponible en: <https://www.insnsb.gob.pe/docs-trans/resoluciones/archivopdf.php?pdf=2022/RD%20N%C2%B0%20000005-2022-DG-INSNSB%20GU%C3%8DA%20PROCEDIMIENTO%20DETECCI%C3%93N%20MYCOBACTERIUM%20TUBERCULOSIS.pdf>

47- Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC and Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuber­culosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane Da­tabase Syst Rev. [Internet]. 2014 [citado 10 de abril de 2022]; 21;1-161. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24448973/#:~:text=Xpert%C2%AE%20MTB%2FRIF%20assay%20is%20an%20automated%20test%20that,MTB%2FRIF%20in%20early%202011>.

48- Manual de Algoritmos para el Diagnóstico de Tuberculosis/Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas” -- Lima: ORAS - CONHU; 2018. Organización y recursos del sistema de salud. 40 p.; ilus, tab. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=guias-9705&alias=48211-algorithms-for-the-diagnosis-of-tuberculosis-2018-1&Itemid=270&lang=es>

49- García P, Balcells M.E, Castillo C, Miranda C, Geoffroy E, Román JC. et al. Evaluación de la técnica Xpert® MTB/RIF para la detección de Mycobacterium tuberculosis complex en muestras extra-pulmonares. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2017 [citado 2022 Abr 03]; 34(4): 333-339. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0716-10182017000400333&lng=es.

<http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182017000400333>.

50- Peñata A, Salazar R, Castaño T, Bustamante J y Ospina S. Diagnóstico molecular de tuberculosis extrapulmonar y sensibilidad a rifampicina con un método automatizado en tiempo real. Biomédica [Internet]. 2016 [citado 2022 abril 03]; 36(Suppl 1): 78-89. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0120-41572016000500011&lng=en. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3088>.

51- Zamboni Berra T, Inomata Bruce AT, Mathias Alves Y, Vieira Ramos AC, Luciano Giacomet C y Alexandre Arcêncio R. Impacto de la prueba rápida molecular GeneXpert® MTB/RIF en la detección de tuberculosis: tendencias temporales y territorios vulnerables. Rev. Latino-Am. Enfermagem [Internet]. 2021 [citado 2022 abril 03]; 29: e3441. Disponible en: http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0104-11692021000100357&lng=es. Epub 19-Jul-2021. <https://doi.org/10.1590/1518.8345.4412.3441>.

52- Agredo F y Osorio L. Cobertura y fidelidad de la prueba Xpert MTB/RIF™ en un área de alta carga de tuberculosis pulmonar en Colombia. Biomed. [Internet]. 2020 [citado 2022 mayo 02]; 40(4): 626-640. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0120-41572020000400626&lng=en. Epub Dec 10, 2020. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5272>.

53- Manual Operativo: Implementación del GeneXpert MTB/Rif en el Programa de Tuberculosis/Programa de Control y Eliminación de la Tuberculosis. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile; 2017. Disponible en: <https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2018/02/2018.01.23_MANUAL-XPERT.pdf>

54- Manual de GeneXpert® MTB/RIF, GXMTB/RIF-US-10. Rev. G. Cepheid; © 2020: 301-1404-ES. Disponible en: <https://www.cepheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert-MTB-RIF-SPANISH-Package-Insert-301-1404-ES-Rev-G.pdf>

55- World Health Organization‎. Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational ‘how-to’; practical considerations. World Health Organization. 2014. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112469>

56- J. Jameson L, S. Fauci A, L. Kasper D, L. Hauser S, L. Longo D and Loscalzo J. Harrison: Principios de Medicina Interna, 20ma ed. España: McGraw-Hill; © 2016.

57- Alcaide Fernández de Vega F, Esteban Moreno J, González Martín J y Palacios Gutiérrez JJ. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. 56. Alcaide Fernández de Vega F (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).2016. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia56.pdf>

58- Toledo Cornejo AK. Análisis de la expresión de genes con mutaciones compensatorias a mutaciones en rpoB en cepas de Mycobacterium tuberculosis resistentes a rifampicina. [Tesis. Internet]. Lima-Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017 [citado 2022, 12 mayo]. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/1377>

59- Gómez-Tangarife VJ, Gómez-Restrepo AJ, Robledo-Restrepo J y Hernández-Sarmiento JM. Resistencia a Medicamentos en Mycobacterium tuberculosis: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos. Rev. salud pública [Internet]. 2018 [citado 2022 mayo 23]; 20(4): 491-497. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0124-00642018000400491&lng=en. <https://doi.org/10.15446/rsap.v20n4.50575>.

60- Guía Técnica para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 3: Prueba de sensibilidad /Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas” -- Lima: ORAS - CONHU; 2018.178 p.; ilus,tab. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/guia-tecnica-para-diagnostico-bacteriologico-tuberculosis-parte-3-pruebas-sensibilidad>

61- Rivero Pérez YF. Determinación de la susceptibilidad de Mycobacterium tuberculosis frente a drogas antituberculosas en Villa Clara. [Tesis de Maestría]. Santa Clara: Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas; 2018.

62- Cuevas-Córdoba B y Zenteno-Cuevas R. Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet]. 2010 [citado 2022 mayo 02]; 28(9):621–628. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X10000686>

63- Imán Izquierdo FJ. Relación entre resistencia a rifampicina por pruebas rápidas de sensibilidad y tb mdr por prueba de sensibilidad convencionales, Lima-Callao, 2013. [Tesis. Internet]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014 [citado 2022, 15 mayo]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3516>

64- Vera Ramírez KM, Dávila Morocho MJ, Gusqui Gusqui IM, Anguisaca Castillo KI, López Lalangui MA, Guartizaca Durán VA, et al. Mecanismos moleculares y manejo clínico de la tuberculosis resistente a fármacos: ¿Un enemigo invencible? AVFT. [Internet]. 2019 [citado 2022 mayo 02]; 38(2). Disponible en: <http://190.169.30.98/ojs/index.php/rev_aavft/article/view/16446>

65- Galarza M, Guio H, Reques J, Piscoya O y Rodríguez M. Diagnóstico molecular de tuberculosis multidrogorresistente en muestras de esputo mediante el análisis de curvas de melting. Rev. perú. med. exp. salud publica [Internet]. 2018 [citado 2022 mayo 03]; 35(3): 433-440. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1726-46342018000300009&lng=es. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3402>.

66- Peña M.C y Escobar S.N. Tuberculosis con resistencia a rifampicina en Chile. Rev. chil. enferm. respir. [Internet]. 2021 [citado 2022 mayo 03]; 37(1): 74-81. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0717-73482021000100074&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482021000100074>.

67- Viñuelas-Bayóna J, Asunción Vitoria M y Samper M. Diagnóstico rápido de la tuberculosis. Detección de mecanismos de resistencia. Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet]. 2017 [citado 2022 mayo 03]; 35(8):518–526. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-diagnostico-rapido-tuberculosis-deteccion-mecanismos-S0213005X17300678>

68- Bolado-Martínez E, Pérez-Mendoza A, Alegría-Morquecho FM, Candia-Plata MC, Aguayo-Verdugo MR y Álvarez-Hernández G. Mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina o isoniazida en aislamientos clínicos de M. tuberculosis de Sonora, México. Salud pública Méx [revista en la Internet]. 2012 [citado 2022 mayo 16]; 54(2): 167-170. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342012000200013&lng=es>.

69- Franco-Sotomayor G y León-Benítez M. Detección de genes asociados a resistencia para isoniacida y rifampicina en cepas de Mycobacterium tuberculosis en Ecuador. Revista científica INSPILIP. [Internet]. 2017 [citado 2022 mayo 03]; 1(2). Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-987413>

70- De la Iglesia A.I y Morbidoni Y H.R. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en Mycobacterium tuberculosis: nueva información sobre viejos conocidos. Rev. argent. microbiol. [Internet]. 2006 [citado 2022 mayo 12]; 38(2): 97-109. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412006000200012&lng=es>.

71- Cegielski J. P. Tuberculosis multidrogo resistente en la era final de la tuberculosis. Rev. perú. med. exp. salud publica [Internet]. 2018 [citado 2022 mayo 03]; 35(1): 110-117. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1726-46342018000100017&lng=es. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3618>.

72- A. Caminero J, A. Cayla J, García-García JM, García-Pérez FJ, J. Palacios J y Ruiz-Manzano J. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. Arch Bronconeumol. [Internet]. 2017 [citado 2022 mayo 03]; 53(9): 501–509. Disponible en: <https://www.archbronconeumol.org/es-diagnostico-tratamiento-tuberculosis-con-resistencia-articulo-S0300289617300509>

73- Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional y Normas de procedimientos para la Prevención y Control de la Tuberculosis en Cuba, La Habana, 2013.

74- López Miranda AY y Ramos Juárez RE. Evaluación de la sensibilidad y la especificidad del Gene XPERT MTB/Rif en la detección del Mycobacterium Tuberculosis en muestras pulmonares del Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch en el año 2013. [Tesis. Internet]. El Salvador: Universidad de El Salvador; 2017 [citado 2022, 1 junio]. Disponible en: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/16292>

75- Vallejo VP, Rodríguez de JC, Searle MA y Farga CV. Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev. chil. enferm. respir. [Internet]. 2015 [citado 2022, 1 junio]; 31(2): 127-131. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0717-73482015000200010&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482015000200010>.

76- Borraz-Noriega D, Robledo-Pascual JC, Torres-Pérez JA y Flores-Barrientos OI. Utilidad de la prueba de detección de ácidos nucleicos GeneXpert tuberculosis (MTB/RIF) en muestras respiratorias y no respiratorias en un hospital de referencia. Med. interna Méx. [revista en la Internet]. 2018 [citado 2022, 1 junio]; 34(3): 381-387. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0186-48662018000300005&lng=es. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i3.1994>.

77- Rocío Villalobos Morales CC, Soberanis López SM y BE Guzman Escobar. Evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del complejo Mycobacterium tuberculosis y su resistencia a la rifampicina. [Tesis. Internet]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2018 [citado 2022, 1 junio]. Disponible en:

<https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QB1219.pdf>

78- Nieves Córdova LE. Valor diagnóstico de Gene XPERT (MTB) / (Rif) en muestras de Mycobacterium tuberculosis realizado en un laboratorio privado Lima- Perú 2012-2018. [Tesis. Internet]. Lima-Perú: Universidad Privada San Juan Bautista; 2019. [citado 2022, 1 junio]. Disponible en: <http://repositorio.upsjb.edu.pe/handle/upsjb/2263>

79- Cadavid C, Realpe T, Mejía GI, Zapata E, Hernández M y Robledo J. Contribución del uso de XPERT MTB/RIF y su costo-efectividad en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y la resistencia a rifampicina: una comparación con métodos diagnósticos no moleculares. Infect. [Internet]. 2022 [citado 2022, 1 junio]; 26(2): 121-127. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0123-93922022000200121&lng=en. Epub Dec 12, 2021. <https://doi.org/10.22354/in.v26i2.1010>.

80- Martínez Romero MR, Sardiñas Aragón M, García León G, Mederos Cuervo LM, Lemus Molina D y Echemendía Font M. Impacto del XPERT MTB/Rif para el diagnóstico de la Tuberculosis en Cuba. Convención Internacional de Salud, Cuba Salud. [Internet]. 2018 [citado 2022, 1 junio]. Disponible en: <http://convencionsalud2018.sld.cu/index.php/connvencionsalud/2018/rt/metadata/251/2458#:~:text=El%20Xpert%20MTB%2F%20RIF%20permiti%C3%B3,como%20indicador%20de%20TB%20%E2%80%93%20MDR>.

81- Acosta-Sánchez D, Domínguez-Sánchez L, López-González J y Duarte-Grandales S. GeneXpert como método de diagnóstico de la tuberculosis en Santiago de Cuba. MEDISAN [revista en Internet]. 2022 [citado 2022, 1 junio]; 26(2): [aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/3406>

82- Ruíz-Martin Leyes FJ, Arzuza Ortega L, Guerra Sarmiento M y Maestre Serrano R. Perfil de resistencia del Mycobacterium tuberculosis a fármacos antituberculosos de primera línea y sus combinaciones. Rev cubana Med Trop [Internet]. 2020 [citado 2022, 1 junio]; 72(2): e525. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0375-07602020000200010&lng=es. Epub 20-Oct-2020.

83- Gámez Sánchez D, Gutiérrez Álvarez Y, Pérez Jiménez D, Dueñas Moreira O, Álvarez Toste M. Seguimiento de los contactos de casos de tuberculosis. Rev cubana Med Gen Integr [Internet]. 2021 [citado 2022, 1 junio]; 37(1): e1346. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0864-21252021000100013&lng=es. Epub 01-Abr-2021.

84- Yang J, Shen Y, Wang L, Ju L, Wu X, Wang P, et al. Efficacy of the Xpert Mycobacterium tuberculosis/rifampicin assay for diagnosing sputum-smear negative or sputum-scarce pulmonary tuberculosis in bronchoalveolar lavage fluid. International Journal of Infectious Diseases [Internet]. 2021 [citado 2022, 1 junio]; 107: 121–126. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.04.040>

85- Ortiz-Jiménez J, Franco-Sotomayor G y Ramos-Ramírez M. Validación e implementación de GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico de tuberculosis en Ecuador. Kasmera. [Internet]. 2019 [citado 2022, 1 junio]; 47(1):29-37. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/3730/373061540006/html/>

86- Atehortúa S, Ramírez F, Echeverri LM, Peñata A and Ospina S. Xpert MTB/RIF test performance assay in respiratory samples at real work settings in a developing country. Biomedica. [Internet]. 2015 [citado 2022, 1 junio]; 35(1):125-30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2330>

87- Jima-Sanchez MJ, Montúfar-Silva MR, Cevallos-Montalvo JP, Sánchez-Andino BM y García-Ríos CA. Hallazgos de baciloscopias, genexpert MTB/RIF y cultivos en pacientes con tuberculosis drogoresistente. Hospital Pablo Arturo Suárez. Pol. Con. [Internet]. 2020 [citado 2022, 1 junio]; 5(09): 927-936. Disponible en:  [http://dx.doi.org/10.23857/pc.v5i9.1740](https://doi.10.23857/pc.v5i9.1740)

88- Medina-Batalla AL, Kim-Morales D, Abrego-Fernández JA y Laniado-Laborín R. Xpert®MTB/RIF para el diagnóstico de tuberculosis en condiciones programáticas en una región de alta endemicidad en México. Neumol. cir. torax [revista en la Internet]. 2019 [citado 2022, 1 junio]; 78(2): 122-125. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0028-37462019000200122&lng=es. Epub 09-Dic-2020.

89- Argueta de Gutierrez YL, Contreras de Lazo OL, Escalante Campos EN, Sánchez Reyes RI y Viera Ascencio CE. “Caracterización de casos de tuberculosis confirmada con Gene XPERT del Hospital Nacional San Juan de Dios de San Miguel entre mayo 2016 a junio 2019”. [Tesis. Internet]. El Salvador: Universidad Dr. José Matías Delgado; 2019 [citado: 2022, 12 junio]. Disponible en: <https://www.lareferencia.info/vufind/Record/SV_8008f500afe7e91c4ab8d7066df78e78>

90- Zahoor D, Farhana A, Kanth F and Manzoor M. Evaluation of smear microscopy and geneXpert for the rapid diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in a tertiary care hospital in North India: a descriptive prospective study. Int J Res Med Sci. [Internet]. 2018 [citado: 2022, 12 junio]; 6(5):1756-1760. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20181774>

91- Montalvo-Otivo R, Ramírez-Breña M, Bruno-Huamán A, Damián Mucha M, Vilchez-Bravo S and Quisurco-Cárdenas M. Geographical distribution and risk factors for multidrug-resistant tuberculosis in central Peru. Rev. Fac. Med. [Internet]. 2020 [citado: 2022, 12 junio]; 68(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v68n2.71715>.

92- Heredia Mejía G. Características clínicas, epidemiológicas y patrón de resistencia en pacientes con tuberculosis pulmonar drogorresistente en mayores de 15 años atendidos en el Hospital II-2 Tarapoto en el período 2017- 2019. [Tesis. Internet]. Tarapoto- Perú: Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto; 2020 [citado: 2022, 12 junio]. Disponible en: <https://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/3718?show=full>

93- Lemus Molina D, Echemendía Font M, Díaz Rodríguez R, Rodríguez Estévez D, Martínez Rodríguez A, Suárez Álvarez L, et al. Resistencia a fármacos antituberculosos en Cuba, 2015-2017. Rev cubana Med Trop [Internet]. 2021 [citado: 2022, 12 junio]; 73(1): e590. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0375-07602021000100010&lng=es. Epub 01-Abr-2021.

94- Lacayo de Santana AC, Rodríguez Cruz PG, Pérez Aguilar ZO y Vásquez Cornejo C. Validez diagnóstica del GeneXpert para Mycobacterium Tuberculosis y prueba de resistencia a rifampicina. Alerta. [Internet]. 2021 [citado: 2022, 12 junio]; 4(3):176-180. Disponible en:  [http://dx.doi.org/10.5377/alerta.v4i3.8829](https://doi.10.5377/alerta.v4i3.8829)

95- Amaya G, Contrera M, Arrieta F, Montano A y Pírez C. Rendimiento del GeneXpert en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en la edad pediátrica. Arch. Pediatr. Urug. [Internet]. 2020 [citado: 2022, 12 junio]; 91(Suppl 2): 12-23. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1688-12492020000800012&lng=es. Epub 01-Dic-2020. <https://doi.org/10.31134/ap.91.s2.2>.

96- Saeed M, Iram S, Hussain S, Ahmed A, Akbar M and Aslam M. GeneXpert: A new tool for the rapid detection of rifampicin resistance in mycobacterium tuberculosis. J Pak Med Assoc. [Internet]. 2017 [citado: 2022, 12 junio]; 67(2):270-274. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28138184/>

97- Cem C, Mustafa Gökhan G, Mustafa Zahir B, Serdar B, Sefa

Levent O and Esra G. "Applicability of Xpert MTB/RIF assay for routine diagnosis of tuberculosis: a four-year single-center experience," Turkish Journal of Medical Sciences. [Internet]. 2015 [citado: 2022, 12 junio]; 45 (6). Disponible en: <https://dctubitak.researchcommons.org/medical/vol45/iss6/23>

98- Shah RH, Inayat N, Bouk GR, Akhtar M, Khooharo MA and Qayoom S. Rapid detection of tuberculosis and rifampicin resistance with automated genexpert MTB/RIF assay. Pak J Chest Med. [Internet]. 2016 [citado: 2022, 12 junio];

22(2): 61-64. Disponible en: <http://www.pjcm.net/index.php/pjcm/article/view/394>

99- Shrestha P, Khanal H, Dahal P and Dongol P. Programmatic Impact of Implementing GeneXpert MTB/ RIF Assay for the Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Respiratory Specimens from Pulmonary Tuberculosis Suspected Patients in Resource Limited Laboratory Settings of Eastern Nepal. Open Microbiol J. [Internet]. 2018 [citado: 2022, 12 junio]; 12:9-17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801812010009>

100- Mederos Cuervo LM, Martínez Romero MR, Sardiñas Aragón M, García León G, Pereira Gross EG y Díaz Rodríguez R. Aplicabilidad de la herramienta molecular GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico de la Tuberculosis. Rev. CENIC Cienc. Biol [Internet]. 2020 [citado: 2022, 12 junio]; 51(3): 173-180. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S2221-24502020000300173&lng=es. Epub 01-Dic-2020.

**Anexos**

**Anexo 1**

**Guía de observación documental**

1. Año de realización del GeneXpert MTB/Rif: 2018, 2019, 2020
2. Provincia de procedencia: Cienfuegos, Villa Clara, Sancti Spíritus, Ciego de Ávila, Camagüey
3. Clasificación del paciente según grupo vulnerable: contacto con paciente TB, VIH, recluso o ex recluso, previamente tratado, extranjero, intercambio personal de países alta carga TB, trabajador de la salud, niño, otras enfermedades asociadas, fumador, alcohólico, internamiento prolongado, otros
4. Tipo de muestra procesada: esputo, material de biopsia, LCR, otros líquidos corporales diferentes de sangre y orina (líquido pleural, líquido ascítico, líquido pericárdico, líquido sinovial, contenido gástrico)
5. Resultado del cultivo: positivo, negativo
6. Resultado de la baciloscopia: positivo, negativo
7. Resultado del GeneXpert MTB/Rif: TB detectado alto, TB detectado medio, TB detectado bajo, TB detectado muy bajo
8. Resistencia a la Rifampicina: detectada, no detectada, indeterminada

**Anexo 2**  
**PNO para detección de Mycobacterium tuberculosis y resistencia a**  
**Rifampicina por GeneXpert MTB/Rif**

**1. Objetivos:**

**1.1** Realizar el procesamiento de muestras pulmonares (esputo, lavado bronquial y líquidos pleurales) con el reactivo Xpert MTB/RIF e inocular la muestra ya procesada al cartucho Xpert MTB/RIF para posteriormente cargar el mismo al equipo GeneXpert.

**1.2** Realizar el procesamiento de muestras extrapulmonares (Biopsias de tejidos, líquido cefalorraquídeo) con el reactivo Xpert MTB/RIF e inocular la muestra ya procesada al cartucho Xpert MTB/RIF para posteriormente cargar el mismo al equipo GeneXpert.

**2. Alcance:** Es aplicable al laboratorio del CPHEM

**3. Términos y definiciones:** 3.1 BPL: Buenas prácticas de laboratorio 3.2 BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes 3.3 ZN: Ziehl-Neelsen. 3.4 TB: tuberculosis. 3.5 BAAR: bacilos ácido alcohol resistente 3.6. CSB: cabina de seguridad biológica. 3.7. LCR: Líquido cefalorraquídeo. 3.6. LJ: Löwenstein Jensen 3.7. RCF: relativa fuerza de la Centrífuga.

**4. Fundamento del método:**

**4.1** Permite la detección del ADN del complejo *M. tuberculosis* y al mismo tiempo la presencia de la mutación del gen *rpoB*, asociado con la resistencia de rifampicina, droga de primera línea del tratamiento antituberculoso.

**5. Responsabilidades:**

**5.1** Profesional o técnico de laboratorio después de haber leído el PNO y estar adiestrado en la ejecución de esta técnica.

**5.2** Los responsables de realizar esta técnica estarán previamente entrenados en BPL, tendrán pleno conocimiento de este procedimiento y estarán calificados para realizar el mismo.

**5.3** El responsable del laboratorio controlará y supervisará el desarrollo y ejecución de la técnica cada vez que se realice la preparación.

**6. Documentos de referencia:**

**6.1** Xpert MTB/RIF implementation manual. Technical and operational ‘how-to’: practical considerations. World Health Organization 2014. WHO/HTM/TB/2014.1.  
**6.2** Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB and rifampicin resistance in adults and children. Policy update. It is available at: [http://www.who.int/tb/laboratory/policy\_ statements/en/](http://www.who.int/tb/laboratory/policy_%20statements/en/)

**6.3** The full report of the Expert Group meeting is available at: [http://www.who.int/tb/laboratory/policy\_ statements/en/](http://www.who.int/tb/laboratory/policy_%20statements/en/)

**7. Medidas de seguridad:**

**7.1 Chequeo del personal:** al comenzar a trabajar en un laboratorio de TB: Rx de tórax y prueba de Mantoux; si es negativa esta última, vacunar con BCG. Realizar Rx de tórax y Mantoux cada año.

**7.2 Medidas generales:**

⮚ El local debe tener ventilación adecuada.

⮚ Disponer de baño de emergencia.

⮚ Cepillos de mano y detergentes.

⮚ Usar ropa sanitaria para trabajar (camisa, pantalón, gorro o turbante y tapa boca).

**7.3 Sobre las muestras recibidas:**

⮚ Los frascos se recibirán tapados, sin signos de contaminación exterior por la muestra y con su identificación (nombre y apellidos del paciente).  
⮚ Las indicaciones deberán llegar separadas de los frascos. Al terminar el procesamiento de las muestras, todos los frascos se deben autoclavear al igual que los materiales usados.

⮚ Las pipetas se colocarán en cubetas descartables para autoclavear.  
**7.4 Pipeteo del material y suspensiones bacterianas:**

⮚ En todos los casos deberán usarse pipeteadores automáticos y pipetas con margen de longitud amplio entre el cero y el extremo superior. En ausencia de dispositivos de pipeteo emplear peras de goma, cuyo uso es muy simple. Nunca debe usarse la boca.

⮚ Atención concentrada en la actividad que se está realizando.  
⮚ Usar pipetas adecuadas con margen de longitud amplio del cero al extremo superior.

⮚ Lograr amplia visibilidad de la columna aspirada.

⮚ La punta debe estar completamente entera.

⮚ Tapón de goma superior adecuadamente ajustado y completamente seco, evitando que se humedezca, flameando antes de usar.

⮚ Succión suave y controlada sobre la columna aspirada.

⮚ Evitar la formación de aerosoles que se producen por el choque de los chorros de agua, en la agitación de los frascos y tubos, en la centrifugación, etc. Es necesario tener en cuenta:

**-** No proyectar chorros de agua contra muestras y sus recipientes o contra animales y receptáculos infectados en necropsias y otra manipulación técnica o de limpieza).  
**-** Los frascos que se agitan para homogenizar o los tubos que se centrifugan, no deben destaparse de inmediato, sino después de algunos minutos de reposo.  
**7.5 Rotura de recipientes:**

⮚ Actuar de inmediato, antes de que se seque. El material derramado debe ser cubierto con algodón evitando que se disperse y luego echar sobre el algodón fenol 5% y dejar actuar. Debe limpiarse con un paño empapado en fenol toda la superficie sospechosa de haber sido salpicada, antes de que se seque.  
**7.6 Limpieza:**

⮚ La meseta de trabajo o la cabina de seguridad deben desinfectarse después de finalizada la jornada con un desinfectante adecuado. El piso debe limpiarse al menos una vez a la semana y nunca barrerse.

⮚ Esterilización: Todo el material contaminado, muestras y recipientes, etc., deben autoclavearse a 30 minutos a 121 o C.

⮚ El material que va directamente a la autoclave en los cubos o cubetas no deben trasegarse de un cubo o cubeta a otro, después de descartarse dentro de ellos.  
**8. Materiales y equipos:**

**8.1 Equipos y materiales.** - GSB tipo 2 y mechero de gas. - Equipo GeneXpert - Guantes estériles sin talco. - Tubos Corning (15 y 50 ml). - Gradilla para los tubos - Recipiente descartable para eliminar las pipetas usadas. - Cartuchos MTB RIF - Mortero estéril. - Tijeras o Bisturí estériles

**8.2 Materiales para registro de los resultados del GeneXpert.**  
**-** Libro de Registro de entrada y base de datos de datos de GeneXpert  
**-** Bolígrafo de color azul (para libro de registro de entrada al GeneXpert)  
**-** Computadora

**-** Impresora

**-** Tonel

**-** Hojas para imprimir los resultados

**9. Reactivos:**

**9.1** Reactivos MTB RIF

**10.Procedimientos:**

**10.1 Procesamiento de muestras pulmonares (esputos, lavados bronquiales**  
**y líquidos pleurales) para XPERT MTB / RIF y cultivo.**

▪ Dividir las muestras en 2 alícuotas: 1ml para procesamiento de GeneXpert y el resto de la muestra para procesamiento para cultivo (ver PNO procesamiento de la muestra para cultivo)

▪ Adicionar 2 ml del reactivo MTB RIF a 1 ml a la muestra.

▪ Dar Vortex unos segundos y dejar actuar por 10 minutos.

▪ Dar Vortex y dejar actuar por 5 minutos más.

▪ Con la pipeta estéril llevar el esputo tratado hasta la marca visible y transferir la muestra para el cartucho MTB RIF

**10.2 Procesamiento de muestras extrapulmonares (ganglios linfáticos y**  
**otros tejidos, LCR) para XPERT MTB / RIF y cultivo**

**10.2.1 Procesamiento de ganglios linfáticos y otros tejidos (colecciones no**  
**estériles para XPERT MTB / RIF y cultivo):**

• Cortar con un par de fórceps o pinzas estériles y tijeras la muestra de tejido en pequeños trozos en un mortero estéril.

• Agregar aproximadamente 2 ml de solución salina estéril.

• Desmenuzar o moler la solución de tejido y PBS con un mortero hasta obtener una suspensión homogénea.

• Con una pipeta estéril transferir la suspensión del tejido a un tubo de Corning 50 ml.

• Enumerar el cartucho Xpert MTB / RIF con el número de identificación de la muestra y transferir aproximadamente 0,7 ml de la muestra de tejido homogeneizado a un tubo Corning con tapa de rosca (15 ml) para ser utilizado para la prueba Xpert MTB/ RIF.

• Utilizar pipeta estéril para añadir un volumen doble del Reactivo Xpert MTB/ RIF (1,4 ml) a 0,7 ml muestra de tejido homogeneizado.

• Agitar vigorosamente 10-20 veces o vortex durante al menos 10 segundos.

• Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego agitar la muestra de nuevo con vigor durante otros 10-20 veces, o vórtex durante al menos 10 segundos.

• Incubar las muestras a temperatura ambiente durante otros 5 minutos.

• Transferir con pipeta estéril 2 ml de la muestra procesada al cartucho Xpert MTB RIF.  
**NOTA: Evite la transferencia de los grupos de tejidos que no han sido**  
**homogeneizados correctamente.**

• Cargar el cartucho en el instrumento GeneXpert siguiendo las instrucciones del fabricante (ver instructivo del GeneXpert).

**10.2.2 El procesamiento de LCR para diagnóstico por GENEXPERT.** El método de procesamiento para LCR en Xpert MTB / RIF depende del volumen disponible de la muestra para la prueba.

**SI HAY MÁS DE 5 ML DE LCR:** 1. Transferir las muestras a un tubo de centrífuga cónico, y centrifugar a 3000 g durante 15 minutos. 2. Decantar con cuidado el sobrenadante en un frasco para descartar muestras que contenga fenol 5% u otro desinfectante para micobacterias. 3. Resuspender el sedimento hasta un volumen final de 2 ml (por la adición del reactivo Xpert MTB / RIF). 4. Enumerar el cartucho Xpert/ MTB / RIF con el número de identificación de la muestra. 5. Con una pipeta estéril transferir 2 ml de la muestra de LCR concentrados al cartucho Xpert MTB/ RIF. 6. Cargar el cartucho en el instrumento GeneXpert siguiendo las instrucciones del fabricante (ver instructivo GeneXpert).

**SI HAY UNA CANTIDAD DE 1 - 5 ML DE LCR:** 1. Añadir un volumen igual de reactivo Xpert MTB / RIF a la muestra de LCR. 2. Añadir 2 ml de la mezcla de la muestra directamente al cartucho Xpert MTB/ RIF. 3. Cargar el cartucho en el instrumento GeneXpert siguiendo las instrucciones del fabricante. (Ver instructivo GeneXpert).  
**SI HAY 0,1 - 1ML DE LCR:** 1. Adicionar reactivo Xpert MTB / RIF a la muestra de LCR hasta llegar a un volumen final de 2 ml.

**NOTA: La sangre presente en el LCR y muestras de LCR xantocrómico pueden causar** **resultados falsos negativos de la Xpert MTB/ RIF.**

**NOTA: El LCR debe decantarse siempre en un gabinete de seguridad biológica.** 2. Añadir 2 ml de la mezcla de la muestra directamente al cartucho Xpert MTB/ RIF. 3. Cargar el cartucho al instrumento GeneXpert siguiendo las instrucciones del fabricante. (Ver instructivo GeneXpert).

**SI HAY MENOS DE 0,1 ML:** La muestra es insuficiente para probar el uso de la / ensayo Xpert MTB/ RIF.

**11.Consideraciones generales:** La OMS ha realizado recomendaciones acerca del uso del Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de las muestras extrapulmonares y la detección de resistencia a la Rifampicina:

**-** Xpert MTB / RIF se debe utilizar con preferencia a la microscopía y cultivo convencional como la prueba de diagnóstico inicial de las muestras de LCR de pacientes con sospecha de meningitis tuberculosa (recomendación fuerte dada la urgencia de diagnóstico rápido).

**-** Xpert MTB / RIF puede utilizarse como una prueba de reemplazo para la práctica habitual (incluyendo microscopía convencional, el cultivo, y la histopatología) para testar muestras no respiratorias específicas (ganglios linfáticos y otros tejidos) de pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar (recomendación condicional). Con el fin de llegar a un diagnóstico rápido utilizando muestras de LCR, Xpert MTB / RIF se debe utilizar preferentemente en lugar del cultivo si el volumen de la muestra es bajo o si los especímenes adicionales no se pueden obtener. Si un volumen suficiente de material está disponible, deben ser utilizados métodos de concentración para aumentar el rendimiento. Los individuos con sospecha de tuberculosis extrapulmonar, pero que han tenido un solo resultado negativo del Xpert MTB /RIF deben someterse a más pruebas de diagnóstico; el procesamiento de las muestras de tejido (ganglios linfáticos y otros tejidos) para Xpert MTB /RIF debe incluir una etapa de descontaminación para permitir que las muestras puedan ser cultivadas simultáneamente. El líquido pleural es un espécimen sub-óptimas para la confirmación bacteriana de la tuberculosis pleural mediante cualquier método. Es preferente una biopsia pleural para obtener mejores resultados. Estas recomendaciones no se aplican a los especímenes de heces fecales, orina o sangre, dada la falta de datos sobre la utilidad de la Xpert MTB /RIF en este tipo de muestras.

**Puntos importantes sobre los procedimientos del procesamiento de**  
**muestras:**  
✓ Todas las muestras deben ser procesadas tan pronto como sea posible, para obtener óptima la recuperación de *M. tuberculosis* en el cultivo. Mayores tiempos de transporte de muestras no deben afectar el uso del Xpert MTB / RIF.

✓ Asegúrese de que el cartucho / RIF Xpert MTB y cualquier medio de cultivo para inocular son etiquetados y enumerados correctamente y con claridad.

✓ Los tejidos deben ser procesadas dentro de una cabina de seguridad biológica, dado el riesgo de producir aerosoles durante el procesamiento de las muestras.

✓ Las muestras de LCR son paucibacilares y puede procesarse utilizando las mismas precauciones como los utilizados para el esputo, excepto cuando se concentran por centrifugación.

✓ Es importante la utilización de las buenas prácticas de laboratorio seguras, para evitar la contaminación por otras bacterias y, especialmente, para evitar la contaminación cruzada con bacilos de la tuberculosis de otros especímenes.

✓ Cuando es disponible un volumen suficiente de muestra, se debe realizar el cultivo simultáneamente con las pruebas de Xpert MTBR / RIF.

✓ El tiempo de exposición a los reactivos de descontaminación, para muestras requieren descontaminación, deben ser controladas estrictamente.

**Anexo 3**

**PNO para diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* por baciloscopia**

**1.Técnica:** Preparación de los frotis directos de esputo

**1.1.Fundamento:** La Tuberculosis pulmonar usualmente ocurre en el ápice de los pulmones, produciendo cavidades que pueden llegar a contener una gran población de bacilos de la tuberculosis, los cuales logran ser detectados mediante examen de frotis directo de la muestra de esputo. Para que el diagnóstico por microscopía directa sea positivo es preciso que la muestra de esputo contenga entre 5000 y 10000 bacilos por ml de muestra. Varios estudios han demostrado que, en promedio, mediante el examen de dos frotis por paciente se podría detectar más del 90% de los casos de tuberculosis infecciosa. El examen de esputo por microscopía es relativamente rápido, fácil y de bajo costo. La sensibilidad de la microscopía de frotis es baja en la tuberculosis extrapulmonar y en las enfermedades causadas por micobacterias que no son bacilos de la tuberculosis. Asimismo, es prácticamente imposible distinguir entre las distintas especies de micobacterias mediante la microscopía.

**1.2.Objetivo:** Preparación de un extendido con calidad, no ser ni muy fino ni muy grueso y homogéneamente distribuido sobre el portaobjetos, para favorecer la penetración del colorante de Fucsina fenicada, y por ende, la correcta coloración del bacilo de Koch u otra micobacterias.

**1.3.Material:**

Cabina de seguridad o mechero de gas.

Asa bacteriológica.

Portaobjetos.

Frasco alcohol arena.

Rotulador o lápiz diamante.

Frasco de muestra.

**1.4.Procedimiento:**

Rotule el portaobjetos, marcando en un extremo el número del paciente.

Transfiera una porción apropiada de la muestra al portaobjetos utilizando asa bacteriológica. Si la muestra contiene moco purulento opaco, grisáceo o amarillo, con gotas de sangre, utilícelo para la preparación del frotis.

Extienda la muestra sobre el portaobjetos mediante movimientos a todo lo largo y ancho del mismo, y sin tocar los bordes. No realice movimientos circulares.

Deje secar el extendido al aire durante 5 min. No utilice calor para el secado.

Fije el extendido pasando tres o cuatro veces el área del portaobjetos que no tiene el extendido por la llama azul del mechero de Bunsen. Evite recalentar. Deje enfriar antes de proceder a la tinción.

Elimine las partículas adhesivas de esputo del asa bacteriológica moviéndolas de arriba abajo en el frasco alcohol arena. Esterilice el asa en la llama azul o incolora del mechero de Bunsen hasta ponerla al rojo o en el incinerador de asas.

**1.5.Observaciones:**

Valor de los frotis de las muestras extrapulmonares.

Como ***Mycobacterium tuberculosis*** puede infectar casi cualquier órgano del cuerpo, el laboratorio podría recibir una variedad de muestras extrapulmonares, como líquidos corporales, tejidos, pus y orina. Las ventajas de la microscopía en este tipo de muestras son limitadas y se recomienda remitirlas para su cultivo.

**Lavados gástricos**

Deben evitarse los frotis directos pues los resultados pueden inducir a error. A menudo, los alimentos y el agua contienen bacilos acidorresistentes y por lo tanto llegan al estómago. No existe forma de diferenciar estos microorganismos de los bacilos de la tuberculosis mediante la microscopía. En consecuencia, debe desconfiarse de los frotis positivos.

**Hisopados laríngeos**

Los frotis directos son prácticamente inútiles. Un resultado negativo carece de significado y es mejor conservar el poco material disponible para el cultivo.

**Pus y aspirados espesos**

Los frotis directos de estas muestras deben ser muy delgados. Los frotis gruesos suelen deslizarse del portaobjetos y aunque pudieran mantenerse en él, puede ser difícil ver los bacilos acidorresistentes después de la tinción. Pueden surgir problemas si la muestra contiene mucha sangre ya que a veces ésta llega a producir artefactos de materiales acidorresistentes.

**Líquidos pleurales**

El líquido debe centrifugarse y el frotis debe prepararse con el sedimento. Además, el extendido debe ser delgado de lo contrario puede deslizarse del portaobjetos.

**Líquido cefalorraquídeo**

Los frotis de líquidos cefalorraquídeo rara vez son positivos y es preferible cultivar el sedimento de las muestras concentradas. Si se desea preparar un frotis, es preciso trazar dos marcas paralelas de aproximadamente 10 mm de largo y separadas por una distancia de 2 mm en un portaobjetos de vidrio limpio. Luego se recoge una cantidad de sedimento con un asa bacteriológica, se extiende entre estas marcas y se deja secar el frotis. A continuación, se vuelve a extender otra cantidad de sedimento sobre el primer frotis y se deja secar nuevamente. El procedimiento puede repetirse varias veces según la cantidad de sedimento disponible. De esta manera puede delimitarse perfectamente el área en la que deben buscarse los bacilos acidorresistentes. Se aconseja que el examen de los frotis sea realizado por dos microscopistas distintos. Los coágulos deben guardarse para efectuar un cultivo.

**Orina**

Los frotis de los sedimentos obtenidos por centrifugación de orina ofrecen resultados muy poco confiables y deberían evitarse. A veces, la orina contiene micobacterias que no son bacilos de la tuberculosis, ya sea en el momento de la micción o si las técnicas de toma de muestras son deficientes. Hay que ser muy cautos si se detectan bacilos acidorresistentes en la orina.

Antes de comenzar con la preparación de los frotis, el equipo y los materiales deben ubicarse de tal modo que permitan un flujo racional y seguro de las operaciones. Todos los procedimientos de preparación de los frotis deben normalizarse y la distribución de los materiales debe ser siempre la misma para lograr el máximo de seguridad.

El frotis directo de esputo puede realizarse utilizando palillos de madera. En dicho caso, los palillos deben tener de largo entre 6 y 8 pulgadas y uno de sus extremos con un ángulo entre 30º y 45º. Al descartarlo deberá hacerse en una solución desinfectante (fenol al 5%) y utilizar un nuevo palillo en la siguiente muestra.

**2.Técnica:** Tinción de Ziehl-Neelsen

**Fundamento:** Las micobacterias retienen la tinción primaria aún después de que el preparado se decolore con una solución alcohol-ácida. De ahí el término de acidorresistentes. Para facilitar el reconocimiento de los microorganismos acidorresistentes se emplea un método de contra tinción. Existen varios métodos para determinar el carácter acidorresistente de las micobacterias. Si se utiliza la Carbol Fucsina (Ziehl-Neelsen o Kinyoun), los microorganismos acidorresistentes aparecen de color rojo sobre un fondo azul.

**2.1.Objetivos:**

* Detectar la fuente principal de infección (los mayores excretores de bacilos).
* Confirmar el diagnóstico a partir del examen bacteriológico.
* Evaluar el resultado del tratamiento quimioterapéutico.

# **2.2.Reactivos:**

* Fucsina Básica Fenicada

*Solución #1*

Fucsina Básica..........................................................................3,0 g

Etanol de 95%..........................................................................100 ml

Disolver la fucsina básica en el etanol

*Solución #2*

Cristales de Fenol.......................................................................5,0 g

Agua destilada...........................................................................100 ml

Disolver los cristales de Fenol en el agua destilada (puede ser preciso calentar suavemente)

## Solución de trabajo

Combine 10 ml de la solución #1 con 90 ml de la solución #2 y guarde la solución resultante en un frasco de color ámbar. Rotule el frasco con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y de vencimiento. Almacene a temperatura ambiente durante seis a doce meses y filtre antes de usar.

* Solución decolorante

Etanol ácido clorhídrico al 3%

Ácido clorhídrico concentrado (calidad técnica) .......................... 3 ml

Etanol al 95%...............................................................................97 ml

Agregue cuidadosamente el ácido clorhídrico concentrado al etanol al 95%. No opere en modo inverso. Observará que la temperatura de la solución aumenta. Almacénela en un frasco color ámbar. Rotule al frasco con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y de vencimiento. Guarde a temperatura ambiente durante seis a doce meses.

*Si existiera carencia de alcohol, puede utilizarse una solución acuosa de ácido sulfúrico al 25% como agente decolorante. Esta se prepara del siguiente modo:*

Ácido sulfúrico concentrado al 25%

Ácido sulfúrico concentrado (calidad técnica) .............................. 25 ml

Agua destilada estéril....................................................................75 ml

Agregue cuidadosamente el ácido sulfúrico concentrado al agua. No opere en modo inverso. Observará que la temperatura de la solución aumenta. Almacene en un frasco color ámbar. Rotule la botella con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y de vencimiento. Guarde a temperatura ambiente durante seis a doce meses.

* Solución de colorante de contraste

Colorante Azul de Metileno al 0,3%

Cloruro de azul de metileno...........................................................0,3 g

Agua destilada.............................................................................100 ml

Disuelva el cloruro de azul de metileno en el agua destilada y almacene la solución en un frasco color ámbar. Rotule la botella con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y de vencimiento. Guarde a temperatura ambiente durante seis a doce meses.

# **2.3.Material:**

Portaobjetos con extendidos fijados.

Gradilla para tinción de láminas.

Cronómetro.

Hisopo metálico de flamear.

Agua corriente

**2.4.Procedimiento:**

Coloque los portaobjetos enumerados en una gradilla de tinción. Asegúrese que los portaobjetos no estén en contacto entre sí.

Cubra por completo el portaobjetos con carbol fucsina de Ziehl-Neelsen, filtrada antes de usar.

Caliente el portaobjetos suavemente hasta que comience a desprender vapor. Deje reposar durante 5 min. En ninguna circunstancia se debe permitir que la solución de colorante hierva y se seque.

Enjuague cada uno de los portaobjetos individualmente bajo un chorro de agua suave hasta eliminar todo el colorante libre.

Cubra por completo el portaobjetos con la solución alcohol-ácida. Deje actuar durante 2 minutos.

Enjuague el portaobjetos a fondo con agua. Escurra el exceso de agua. Si el frotis ha quedado con exceso de fucsina después de someterlo a la decoloración con la solución alcohol ácido, puede volver a decolorar por 2 minutos más.

Cubra por completo el portaobjetos con la solución colorante de contraste Azul de metileno. Deje actuar durante 45 segundos.

Enjuague el portaobjetos a fondo con agua. Escurra el exceso de agua. Deje secar el frotis al aire. No seque con papel absorbente.

**3.Técnica:** Observación microscópica.

**3.1.Objetivo:** Establecer si se encuentran o no bacilos ácido-alcohol resistentes en el extendido teñido; y si los hay, el número promedio aproximado por campo microscópico.

# **3.2.Reactivos:**

Aceite de Inmersión

## **3.3.Materiales:**

Microscopio con objetivo de inmersión (100X) y ocular de 8X o 10X.

Lámina con extendido fijado y teñido por el método de Ziehl-Neelsen.

Papel absorbente.

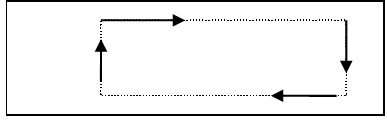
**3.4.Procedimiento:**

Coloque una gota de aceite de inmersión en un extremo del extendido teñido.

Acerque el lente objetivo con el tornillo macrométrico hasta tocar la superficie de la gota de aceite.

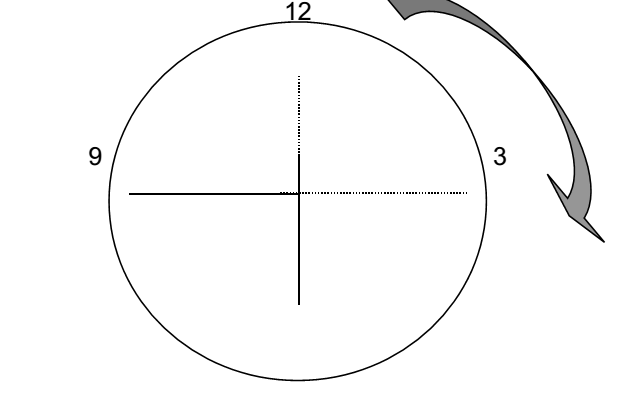
Enfoque el campo óptico ajustando con el tornillo micrométrico.

Realice la lectura de 300 campos ópticos útiles, describiendo una trayectoria como se muestra a continuación:



**3.5.Observaciones:**

Un campo microscópico se considera útil si en él se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucoides y células ciliadas). Los campos en que no se encuentran estos elementos no deben incluirse en la lectura. 2.- Para facilitar la lectura se recomienda dividir mentalmente en cuatro cuadrantes como la esfera de un reloj a cada campo microscópico útil examinado. Así, la lectura se inicia en el superior derecho y se continúa con los otros en el sentido de las manecillas del reloj. Debe observarse en superficie y en profundidad, utilizando constantemente el tornillo micrométrico.



***Características morfológicas de los bacilos acidorresistentes***

• Los bacilos acidorresistentes tienen entre 1 y 10 µm de largo y por lo general se observan como bacilos delgados, con forma de varilla, pero también pueden aparecer curvados o doblados.

• Con la coloración carbol fucsina los bacilos de la tuberculosis parecen varillas rojas finas, ligeramente curvas, más o menos granulosas, aisladas, apareadas o agrupadas, destacándose claramente contra el fondo azul.

• En algunas bacterias pueden observarse áreas intensamente coloreadas  
denominadas “cuentas” y áreas de coloración alternada de aspecto listado.

• Algunas micobacterias que no son bacilos de la tuberculosis pueden exhibir pleomorfismo, por lo que pueden aparecer como varillas alargadas o con formas cocoides. Además, poseen propiedades de tinción más uniformes.

• Los microorganismos que no son micobacterias pueden presentar distintos grados de ácidorresistencia. Entre estos microorganismos cabe mencionar ***Rhodococcus spp***., ***Nocardia spp***., ***Legionella spp***. y los quistes de ***Criptosporidio*** e ***Isospora spp***.

• La capacidad para retener colorantes acidorresistentes puede variar en las micobacterias que crecen en forma acelerada.

Para efectos de supervisión de la baciloscopia deben conservarse los frotis positivos durante un año y los negativos hasta recibir el resultado negativo del cultivo. Transcurrido ese tiempo es recomendable eliminar los frotis positivos.

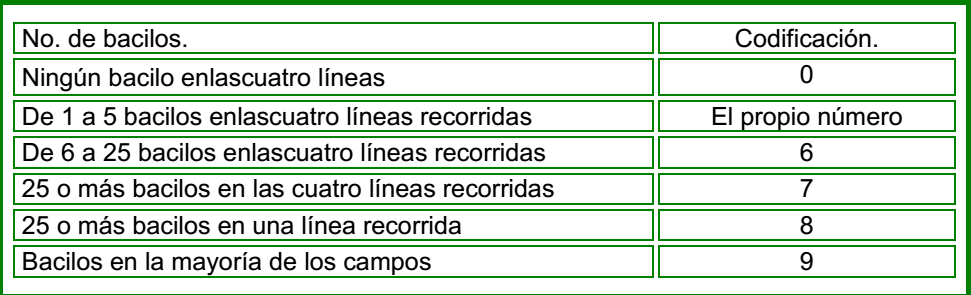
**4.Técnica:** Registro de resultado de baciloscopia.

**4.1.Fundamento:** El informe de baciloscopia no es sólo un resultado cualitativo (positivo o negativo) sino también cuantitativo. Esto último responde a que el número de BAAR encontrados en el frotis directo de una muestra es un índice de la capacidad infectiva del paciente y de la gravedad de la tuberculosis. Por ende, es preciso cuantificar los resultados. Sin embargo, existen sus excepciones sobre todo en aquellos casos de coinfección SIDA-TB, donde no se puede establecer tal asociación.  
**4.2.Material:**  
Modelo de resultado.

Libro de registro de muestras.

Libro de directos positivos

**4.3.Procedimiento:**



**4.4.Observaciones:**

Es necesario que el resultado a que el laboratorio arribe después de examinada una lámina sea reportado inmediatamente en el libro de muestras. Esto evitará confusiones.

En caso de resultar una lámina positiva, y después de ser evaluada por varios miembros del laboratorio, debe darse a conocer personalmente el resultado a la instancia que corresponda.

Notificar los resultados positivos en el libro de directos positivos.