

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**



**“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.”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**

**PRESENTADO POR:
ALEX YASMIR LÓPEZ MIRANDA
ROMARIO EDGARDO RAMOS JUÁREZ**

ASESOR: LIC. JOSÉ ALBERTO ARGUETA

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO 2017

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Autoridades Académicas

Rector

Msc. Roger Armando Arias

Vicerrector Académico

Dr. Manuel de Jesús Joya Abrego

Vicerrector Administrativo

Ing. Agr. Nelson Bernabé Granados Alvarado

FACULTAD DE MEDICINA

Decana

Dra. Maritza Mercedes Bonilla Dimas

Vicedecana

Licda. Nora Elizabeth Abrego de Amado

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

Directora

Licda. Dalide Ramos de Linares

LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO

Directora

Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a Dios por permitirnos culminar nuestra carrera y concluir con satisfacción este trabajo de investigación, por estar a nuestro lado en cada paso que damos, por fortalecer nuestros corazones e iluminar nuestra mente durante todo el periodo de estudio.

A nuestros familiares, especialmente a nuestros padres, por su inmenso apoyo y comprensión y por ser un pilar fundamental en nuestros proyectos.

A nuestros catedráticos que dejaron una huella imborrable en nuestro aprendizaje y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional, especialmente al Lic. José Alberto Argueta, asesor de nuestra investigación, quien con su conocimiento y paciencia nos guio de la mejor manera para la culminación de nuestro proyecto.

A nuestros compañeros por todos los momentos compartidos que quedaran en nuestros corazones.

A nuestra Alma Mater, Universidad de El Salvador, especialmente a la Facultad de Medicina por habernos forjado como buenos profesionales de la Salud.

Al Laboratorio Nacional de Referencia “Dr. Max Bloch”, por la oportunidad y apoyo que nos brindaron para el desarrollo de esta investigación.

Alex Yasmir López Miranda

Romario Edgardo Ramos Juárez

Índice

Introducción	ii
1. Planteamiento del problema	4
2. Justificación	6
3. Objetivos	7
4. Marco teórico	8
5. Diseño metodológico	62
6. Resultados	64
7. Discusión de los datos	66
8. Conclusiones	70
9. Recomendaciones	71
10. Referencias	72
11. Anexo	74

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) sigue constituyendo un importante problema de salud pública tanto a nivel nacional como a nivel mundial, es la principal causa de mortalidad en pacientes VIH positivos, por lo tanto el diagnóstico temprano de una TB activa se vuelve esencial para interrumpir su propagación. Tradicionalmente para el diagnóstico temprano de la TB se utiliza la baciloscopía por su rapidez, bajo costo y sencillez pero este método tiene baja sensibilidad y especificidad. Los cultivos son utilizados como prueba de diagnóstico para TB porque presentan una mayor sensibilidad y una mayor especificidad pero emiten resultados en días o meses.

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico de TB que son más sensibles y específicos que los métodos convencionales (baciloscopía y cultivo) además los resultados son reportados en horas. Por ejemplo el método Gene Xpert MTB/RIF. En El Salvador el Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch utiliza este método para el diagnóstico de TB en muestras pulmonares y extrapulmonares de pacientes que cumplen con los criterios del Programa Nacional de TB; por ser un método de gran utilidad vale la pena evaluar la sensibilidad y la especificidad que presenta en la población a la cual está dirigida.

El presente informe contiene una evaluación sobre 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. Contiene el principio en el cual se basa el método Gene Xpert MTB/RIF, los tipos de muestras que se pueden utilizar, a que pacientes se les indica la prueba, las cepas control que utiliza, el procedimiento para el cultivo de Löwenstein-Jensen, información acerca de la eficacia de una prueba diagnóstica, así como los procedimientos estadísticos necesarios para la evaluación.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En El Salvador para el año 2011, la tasa de morbilidad de tuberculosis (TB) fue de 28.0 x 100,000 habitantes y para el año 2013 se reportaron 2,176 casos de tuberculosis de todas las formas con una tasa de 34.6 x 100,000 habitantes; este incremento según el ministerio de salud pública y asistencia social, se debe a la búsqueda activa de los casos de TB en el interior del país.

Es de suma importancia detectar una TB activa y darle el debido tratamiento al paciente para evitar que se siga propagando el microorganismo. El laboratorio clínico tiene un papel decisivo en el diagnóstico de tuberculosis, sin embargo y debido a la baja sensibilidad de la baciloscopía y al lento crecimiento de las micobacterias (3 a 4 semanas) en el medio de cultivo sólido, se ha hecho indispensable la búsqueda de nuevos y rápidos métodos de diagnósticos. (TERAN, ROMMY 2015. 310)

Desde el inicio de los años noventa en países desarrollados se dispone de técnicas moleculares para una rápida detección e identificación del *Mycobacterium tuberculosis* y en El Salvador, el Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch desde el año 2012 tiene a su disposición el Gene Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de tuberculosis. El Gene Xpert MTB/RIF, es una prueba basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que da resultados en menos tiempo que los métodos convencionales. Fue aprobada para muestras pulmonares por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) y la Organización Mundial para la Salud (OMS), en el año 2010 recomiendan su uso en países subdesarrollados con altas tasas de morbilidad. El Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch llevó a cabo medidas de validación antes de su introducción como prueba diagnóstica, pero no se han realizado estudios sistemáticos para evaluar la sensibilidad y especificidad en muestras pulmonares.

Por ser un método prácticamente nuevo se desconoce la sensibilidad y la especificidad de la prueba, siendo este un problema porque se utiliza como prueba diagnóstica. Por lo que debería tener una buena confiabilidad para que el médico pueda dar un adecuado diagnóstico, pronóstico y tratamiento a los pacientes con una TB activa detectada por el

Gen Xpert MTB/RIF en todas las muestras pulmonares del Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch en el año 2013.

¿Cuál es la sensibilidad del Gene Xpert MTB/RIF en la detección del *Mycobacterium tuberculosis* de muestras pulmonares del Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch en el año 2013?

¿Cuál es la especificidad del Gene Xpert MTB/RIF en la detección del *Mycobacterium tuberculosis* de muestras pulmonares del Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch en el año 2013?

2. JUSTIFICACIÓN

Se realizó la investigación porque no se tenía conocimiento acerca de la sensibilidad y especificidad que presentaba el método Gene Xpert MTB/RIF en la detección del *Mycobacterium tuberculosis* en muestras pulmonares analizadas en el Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch en el año 2013.

Es importante realizar este tipo de investigaciones, porque proporcionan un mayor nivel de confianza para el profesional en laboratorio clínico y el médico que refiere esta prueba.

Además, es indispensable realizar este tipo de investigaciones para adquirir nuevos conocimiento sobre métodos automatizados para el diagnóstico de tuberculosis, y a la vez obtener una evaluación de la sensibilidad y especificidad que presenta el método 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.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

- ✚ Evaluar la sensibilidad y especificidad del Gene Xpert MTB/RIF en la detección del *Mycobacterium tuberculosis* de muestras pulmonares del Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch en el año 2013.

Objetivos específicos:

- ✚ Establecer la sensibilidad del Gene Xpert MTB/RIF en la detección del *Mycobacterium tuberculosis* de muestras pulmonares.
- ✚ Conocer la especificidad del Gene Xpert MTB/RIF en la no detección del *Mycobacterium tuberculosis* de muestras pulmonares.

4. MARCO TEÓRICO

I. GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es la enfermedad que mayor número de muertes ha ocasionado en toda la historia de la humanidad y sigue siendo la enfermedad infecciosa más importante, se calcula que en el mundo están infectados por *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium* unos 2 mil millones de habitantes y 3 millones mueren anualmente por complicaciones de esta enfermedad. El 98% de fallecidos se presenta en países en vías de desarrollo. Se considera que el humano es el único reservorio que condiciona que se produzca anualmente entre 8 y 10 millones de nuevos casos de la enfermedad.

En El Salvador en el año 2011 la tasa de morbilidad fue de 28 x 100,000 habitantes, y para el año 2013 se reportaron 2,176 casos de tuberculosis de todas las formas con una tasa de 34.6 x 100,000 habitantes. El virus de la inmunodeficiencia humana ha complicado la situación de la tuberculosis dificultando aún más su control, como también la de otras micobacterias que han tomado importancia como patógenos oportunistas causantes de micobacteriosis pulmonares y en otros sitios anatómicos.

El bacilo de la tuberculosis puede causar enfermedad en casi cualquier órgano y sistema del cuerpo; en los países donde la prevalencia de tuberculosis es elevada, más del 85% de los casos son pulmonares. El esputo es la muestra que máps frecuentemente se utiliza para el estudio bacteriológico de la tuberculosis pulmonar y si hay sospecha de enfermedades extra pulmonares, pero se observan síntomas respiratorios será preciso tomar muestras de esputo y otras como líquidos corporales, tejidos, pus, orina, entre otras. Las ventajas de la microscopía en estas muestras son muy limitadas y se recomienda remitirlas para cultivo. Las personas en riesgo de adquirir esta enfermedad son aquellos que tienen contacto estrecho con personas que tienen tuberculosis, personas infectadas con VIH, personas que se inyectan drogas ilícitas o usuarios de otras sustancias de alto riesgo identificadas localmente (usuarios de cocaína), residentes y empleados de ambientes cerrados de alto riesgo (privados de libertad, guarderías, instituciones mentales, albergues para personas sin hogar), trabajadores de salud que

atienden a personas de alto riesgo, niños de primera y segunda infancia expuestos a adultos pertenecientes a categorías de alto riesgo. Se recomienda que los programas locales o estatales de control de la tuberculosis tomen la dirección para determinar grupos que se deben investigar.

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos aerobios inmóviles y no esporulados con un tamaño de 0.3 a 0.6 x 1.4 micras. En algunos casos, estos bacilos forman filamentos ramificados; sin embargo, estos pueden romperse con facilidad. La pared celular es rica en lípidos, su superficie hidrofóbica confiere a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes y a las tinciones habituales de laboratorio. Cuando han sido teñidos, los bacilos tampoco se pueden decolorar con las soluciones ácidas, motivo por el que reciben el nombre de bacilos acidorresistentes. Debido a que la pared celular de las micobacterias es compleja y a que este grupo de microorganismos es exigente desde el punto de vista nutricional, la mayoría crece lentamente, se dividen cada 12 a 24 horas y se necesitan hasta 8 semanas antes de poder detectar el crecimiento en los cultivos de laboratorio.

En la actualidad se han identificado más de 130 especies de micobacterias, muchas de las cuales están asociadas a enfermedad en el ser humano. A pesar de la abundancia de especies; los grupos que causan la mayor parte de las infecciones en el ser humano son: *M. tuberculosis*, *M. leprae*, complejo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*.

M. tuberculosis: Es el agente causal más frecuente de enfermedad micobacteriana en el hombre, a menudo es el centro principal de las identificaciones definitivas; sin embargo varios parámetros que incluyen el análisis de extractos antigénicos, epítopes blanco de anticuerpos monoclonales y estudios de parentesco antigénico sugieren que *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. africanun*; representan una única especie, y actualmente se tratan bajo el término general “complejo *M. tuberculosis*”

M. bovis: Se ha incluido actualmente al complejo *M. tuberculosis*, pero tiene características fenotípicas por las que se puede diferenciar de las cepas clásicas de *M. tuberculosis* que incluyen las siguientes: La mayoría de las cepas son niacina negativas,

los nitratos no son reducidos a nitritos, no hay producción de pirazinamidas, no se desarrolla en medios que contienen hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (T₂H).

Las cepas clásicas tienen un ritmo de crecimiento muy lento y producen colonias de escaso crecimiento en medio de Löwenstein-Jensen, el desarrollo de la mayoría de las cepas es mejor en este medio que en Middlebrook 7H11. El medio más favorable para *M. bovis* contiene 0.4 % de piruvato, sin glicerol. Las colonias típicas son de baja altura, pequeñas y pueden tener aspecto liso o rugoso en medios con huevo.

Ciertas cepas de laboratorio de *M. tuberculosis*, conocidas como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) han sido utilizadas como vacunas en zonas altamente endémicas del mundo, se asemejan al *M. tuberculosis* por ser eugónica o de desarrollo más rápido, por tener un aspecto rugoso y gamuzado. Sin embargo, estas cepas siguen siendo T₂H positivas y esto puede servir para su diferenciación. La morfología microscópica de *M. bovis* en los frotis teñidos para acidorresistentes no es distintiva ya que tienden a ser un poco más largos, menos curvos y con menos color que el *M. tuberculosis*. (KONEMAN, ELMER W. 1999. Cap. 17)

Fisiología y estructura de las micobacterias

La estructura básica de la pared celular es característica de las bacterias grampositivas: una membrana citoplasmática interna cubierta por una gruesa capa de peptidoglucanos y carente de membrana externa, sin embargo, es más compleja.

En la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM). El lipoarabinomanano presenta una relación funcional con los liposacáridos "O" antigénicos presentes en otras bacterias. La capa de peptidoglucano forma el esqueleto básico al que se unen los arabinogalactanos, que son polisacáridos ramificados formados por D- arabinosa y D- galactosa. Los componentes lipídicos representan el 60% del peso de la pared celular. A lo largo de la pared celular se intercalan proteínas transportadoras y porinas, las cuales constituyen el 15% del peso de la misma. Las proteínas constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente frente a la infección. (JAWETZ, MCLNICK 2011.289-295)

Organización y secuencia del genoma

La secuenciación del genoma completo del *M. tuberculosis* H37Rv fue publicada en 1998 identificando 3974 genes (actualmente 4011). El genoma comprende 4,411,529 pares de bases (pb) con un contenido de Guanina más Citosina (G/C) de 65,6%, esto representa la segunda secuencia bacteriana más grande disponible después de la *Escherichia coli*. El hecho de que la proporción G/C sea elevada a lo largo de todo el genoma, de una forma homogénea, no concentrada en regiones puntuales, denota que se trata de un genoma que no ha recibido el impacto de la transferencia horizontal de islas de patogenia. No obstante, se observan regiones con una proporción en G/C superior a la media y que son secuencias pertenecientes a una gran familia de genes que incluyen PGRSs (polymorphic G+C-rich sequences).

Secuencias de inserción y profagos (parte del genoma de un virus atenuado)

Las secuencias de inserción (IS), son pequeños (<2,5 kilobases) segmentos de ADN que puede insertarse en una molécula blanco. Antes de que se completara la secuencia del *M. tuberculosis* H37Rv, se describieron cuatro elementos de IS en la micobacteria llamadas IS61109, IS108110, IS154711 y el elemento IS-like12. La mayoría de las secuencias de inserción del *M. tuberculosis* H37Rv, se han insertado en regiones intergénicas o no codificantes, a menudo cerca de las regiones del ARN de transferencia (ARNt).

En el genoma del H37Rv contiene 16 copias de secuencias de inserción IS6110, que ha sido utilizado en gran medida en el estudio de la epidemiología molecular de la TB y se han hallado seis copias de IS1081, el elemento más estable. Se han identificado nuevos elementos de inserción entre ellos las familias, IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256 y el ISL38. Otra familia encontrada es la de REP13E12 que está localizada a lo largo del genoma del *M. tuberculosis* y está presente solo en los miembros de este complejo. Se han encontrado al menos dos profagos en el genoma y su presencia puede explicar el por qué el *M. tuberculosis* muestra niveles persistentemente bajos de lisis en los cultivos.

Metabolismo en estado de latencia y estado de anaerobiosis

M. tuberculosis es un aerobio facultativo, del que se conocen varias rutas metabólicas de anaerobiosis, disponibles para que, al estar en fase de latencia, pueda habitar en un microambiente con escasa o nula concentración de oxígeno. Cuando se somete in vitro a bajas concentraciones de oxígeno, según el modelo de estudio de Wayne y Hayes, el *M. tuberculosis* presentaba una adaptación a estas condiciones de hipoxia, en dos fases que han sido denominadas, persistencia no replicativa 1 y 2 (NRP1 Y NRP2). La primera comienza cuando la concentración de oxígeno en el medio y en el ambiente es de 1% y 72% respectivamente y se caracteriza por la detección súbita de ADN pero no de ARN. Las bacterias en esta fase se hacen resistentes a isoniacida, rifampicina y ciprofloxacina. En el estadio NRP2, la concentración de oxígeno en el medio y en el aire es de 0.06% y 15% respectivamente, se caracteriza por la disminución inicial en la concentración global de ATP y se detiene el aumento del volumen celular.

En el estudio se ha encontrado que el sistema de transcripción de dos componentes dormancy survival regulator (dos/RS) 41, es el principal mediador de la respuesta a la hipoxia y controla la sobreexpresión de 52 genes y la represión de 19 genes.

El *M. tuberculosis* adapta su metabolismo al ambiente anaeróbico activando las vías de respiración del nitrato, así como la vía del glioxilato a través de la estimulación de las enzimas isocitrato liasa y glioxilato deshidrogenasa. Esta vía, permite al *M. tuberculosis* sintetizar carbohidratos a partir de ácidos grasos.

Genes implicados en la resistencia a fármacos

Resistencia a rifampicina

La rifampicina actúa como bactericida interfiriendo con la síntesis de ARN mensajero al unirse a la ARN polimerasa, que está compuesta por cuatro subunidades diferentes codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD1*. Las micobacterias desarrollan resistencia a rifampicina mediante mutaciones en una región definida de la subunidad β de la ARN polimerasa, que es codificada por el gen *rpoB*. Estudios comparativos de secuencias de *rpoB*, mostraron seis regiones altamente conservadas (regiones I a VI) y

en las cuales se han encontrado la mayoría de las mutaciones en el gen relacionadas con la resistencia a la rifampicina. Esta está determinada por mutaciones que incluyen deleciones, inserciones y sustituciones que están concentradas en una pequeña zona de un gen *rpoB* de *M. tuberculosis*, las cuales generalmente se localizan en un corto segmento que incluye los codones 507 a 533. Las más frecuentes son las mutaciones en codones para asparagina 516, histidina 526 y serina 531. (Gómez D., Fontalvo 2015.)

Secuencia de inserción específica del complejo MTB.

El elemento de inserción IS6110 se encuentra exclusivamente dentro del complejo MTB. Y debido a esta exclusividad, se ha convertido en una herramienta de diagnóstico importante en la identificación de especies del complejo MTB. Por otra parte, la presencia del elemento en múltiples copias, y en diferentes lugares en el genoma, ha proporcionado un excelente método por el cual las cepas pueden ser diferenciadas genótipicamente debido a estas características, el IS6110 se ha utilizado ampliamente para estudios epidemiológicos; se supone que la restricción de IS6110 al complejo MTB surge de la incapacidad de estas bacterias para intercambiar ADN.

La presencia de IS6110 indica que la transferencia lateral de genes ha ocurrido entre las especies de micobacterias, lo que sugiere que el pool de genes micobacterianos es mayor de lo que se sospechaba anteriormente. (Coros, Abbie 2002)

Patogenia e inmunidad

M. tuberculosis es un patógeno intracelular capaz de producir infecciones de por vida. En el periodo de exposición, *M. tuberculosis* ingresa por las vías aéreas superiores y las diminutas partículas infecciosas de menos de 25 micras alcanzan los alvéolos. Una vez en el interior de ellos, el sistema inmunitario del hospedador reacciona con la liberación de citocinas y linfocinas que estimulan a monocitos y macrófagos alveolares los cuales digieren a las micobacterias, a diferencia de la mayor parte de bacterias fagocitadas, *M. tuberculosis* impide la fusión del fagosoma con los lisosomas, una vez dentro de los macrófagos alveolares los bacilos comienzan a multiplicarse y algunos macrófagos pueden ser destruidos por el microorganismo, en tanto que otros macrófagos si destruirán

a las micobacterias. Después de uno a dos meses de la exposición aparecen en los pulmones las lesiones patógenas propias de la infección que pueden ser de dos tipos: Tipo exudativo y tipo productivo.

La lesión de tipo exudativo consiste en una reacción inflamatoria aguda, con líquido de edema, presencia de polimorfonucleares y más tarde de monocitos alrededor de los bacilos tuberculosos. La lesión en cuestión se identifica en particular en tejido pulmonar, en donde se asemeja al cuadro de neumonía bacteriana. Puede desaparecer por resolución porque el exudado en su totalidad es absorbido, puede originar necrosis masiva de tejido o transformarse en un segundo tipo de lesión (productiva). En la fase exudativa, se torna positiva la prueba de tuberculina. La lesión de tipo productiva es la lesión de tipo exudativa totalmente desarrollada, que es un granuloma crónico, comprende tres zonas: 1) una zona central de grandes células gigantes multinucleadas que contienen bacilos tuberculosos; 2) una zona media de células epitelioides pálidas dispuestas a menudo en forma radiada, y 3) una zona periférica de fibroblastos, linfocitos y monocitos. (KONEMAN, ELMER W. 1999. Cap. 17)

II. RECIENTES AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN EL LABORATORIO CLÍNICO.

El laboratorio tiene un papel decisivo en el diagnóstico de tuberculosis (TB) así como en la identificación y determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes drogas (DST, del inglés, Drug Sensitivity Testing). El diagnóstico de laboratorio basado solo en microscopía y cultivo, ha sido utilizado por largo tiempo, sin embargo, y debido al lento crecimiento de las micobacterias (3 a 4 semanas), se ha hecho indispensable la búsqueda de nuevos y rápidos métodos de diagnóstico. Desde el inicio de los años noventa se dispone de técnicas moleculares para una rápida detección, identificación y DST de *M. tuberculosis*.

Los laboratorios tienen un rol central en el diagnóstico de TB, es así que reforzar su desempeño y capacidad es prioritario para el control de esta enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de TB en la mayoría de laboratorios se hace por los llamados métodos

convencionales y la mayoría de casos de TB son diagnosticados por baciloscopía. La baciloscopía tiene una sensibilidad cerca del 60-70% de los casos de TB. Adicionalmente, alrededor del 25% de todos los casos de TB son extrapulmonares y para el diagnóstico de ésta presentación de TB la examinación del esputo no sería aplicable, afectando la detección de estos casos. La implementación del cultivo para el diagnóstico puede mejorar la tasa de detección de TB en un laboratorio en alrededor de un 30% a 40%. El cultivo detecta casos con baja carga micobacteriana y también se solicita en casos en riesgo de ser TB resistentes para evaluar su sensibilidad a diferentes drogas (DST), o en caso donde se sospecha que la enfermedad se debe a otro miembro del género *Mycobacterium*. Estos dos métodos de laboratorio, la baciloscopía y el cultivo, son todavía los “Gold standars” para el diagnóstico de TB, siendo el cultivo el método más sensible. Sin embargo, debido al lento crecimiento de las micobacterias, los resultados pueden tardar 3 a 4 semanas, es así que nuevas y rápidas técnicas de diagnóstico son requeridas para mejorar el diagnóstico de TB y el manejo del paciente. Desde los inicios de los noventas, nuevas técnicas de laboratorio para el diagnóstico de TB y las pruebas de sensibilidad a drogas han sido desarrolladas, basadas en el uso de medios de cultivos líquidos, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, nucleic acid amplification tests), hibridación de ADN y técnicas para la detección de mutaciones y detección de antígenos y anticuerpos. (TERAN, ROMMY 2015. 311)

Mejoras en la baciloscopía para el diagnóstico de TB

La examinación microscópica de muestras de esputos, ha sido la base de la detección de casos de TB por más de 100 años y todavía es el método principal en los sitios con presupuestos limitados, en donde el diagnóstico de TB, se basa únicamente en la coloración de Ziehl Neelsen y la observación del frotis con el microscópico óptico. Este procedimiento detecta solamente alrededor del 60-70% de los casos de TB. Una alternativa es el uso del microscopio de fluorescencia, que puede ser 10% más sensible que el microscopio óptico, debido a que el bacilo fluorescente puede ser visto a un aumento más bajo y el frotis puede ser examinado en solamente el 25% del tiempo que toma examinarlo con el microscopio óptico. Sin embargo, ha sido difícil de implementar este microscopio en el diagnóstico de TB debido al alto costo asociado con la compra de

un microscopio con una lámpara de vapor de mercurio, la necesidad de reemplazar frecuentemente la lámpara de UV, la cual dura solamente 200-300h, y la necesidad de un cuarto oscuro para la lectura de las placas. El desarrollo reciente de la tecnología dio lugar al microscopio de fluorescencia, el mismo sistema de iluminación basado en la luz emitida por un diodo (LED) con un tiempo de vida útil de hasta diez mil horas, lo cual resulta en la microscopía de fluorescencia LED. Es así que microscopios fluorescentes LED relativamente económicos están disponibles. La organización mundial para la salud (OMS) ha evaluado la eficacia de la microscopía LED, y los resultados mostraron que el diagnóstico con este microscopio fue aún más sensible (alrededor de 105) que con el microscopio óptico. Basándose en estas consideraciones, la OMS recomienda que la microscopía convencional y fluorescente sean reemplazadas por la microscopía LED. (TERAN, ROMMY 2015. 311)

El cultivo en medio líquido para el diagnóstico de tuberculosis.

El Gold Standard para el diagnóstico de TB es todavía el aislamiento de *M. tuberculosis* en un medio de cultivo. El cultivo provee además aislados para la identificación (basadas en pruebas bioquímicas y moleculares) y para el DST. Hasta inicios de los noventa el cultivo era usualmente hecho en medio sólido basado en huevo como el Löwenstein Jensen y el medio Stonebrink. Una desventaja en estos medios sólidos es el lento crecimiento de la bacteria, que puede tomar al menos de 2 a 4 semanas o a veces más, antes de que el cultivo dé positivo.

Los medios líquidos tienen una incrementada sensibilidad para el crecimiento de *M. tuberculosis* (hasta un 20% de incremento en la positividad) y un reducido tiempo de detención (10-14 días versus 2-4 semanas). El inconveniente es la tasa de contaminación del medio líquido, el cual parece ser más alto en comparación con el sólido. La OMS recomienda el uso del medio sólido convencional junto con el medio líquido para el aislamiento primario de micobacterias. El medio líquido consiste en caldo de Middlebrook 7H9 suplementado con el 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y para evitar la contaminación con otros microorganismos, se agrega PANTA (una mezcla de antibióticos; polimixina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina). En la actualidad, se dispone también de sistemas de cultivo elaborados que están disponibles

comercialmente. Estos van desde botellas simples y tubos tales como MGIT (BD Diagnostic Systems, USA), Septi-ChekAFB (BD, USA) y MB redox (Biotest Diagnostics, USA) hasta sistemas semi-automatizados (BACTEc 460TB) y totalmente automatizados (BACTEC 900 MB), BACTEC MGIT 960 (BD, USA), ESP Culture SystemII y MB/ BACT ALERT 3D System.(TERAN, ROMMY 2015. 311,312).

III. HERRAMIENTAS BASADAS EN EL ADN PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB

Desde los inicios de los años noventa, varias metodologías han sido publicadas para la detección de *M. tuberculosis* con la reacción en cadena de polimerasa (PCR), usando cebadores oligonucleótidos para amplificar un fragmento de ADN específico para este microorganismo. Estos NAATs pueden arrojar resultados en 3 -6 horas e incluyen a aquellos comerciales y a los “hechos en casa”, basados en un protocolo desarrollado en un laboratorio no-comercial. Cada NAATs usa un método diferente para amplificar regiones específicas del ácido nucléico del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Varios NAATs comerciales y la FDA han aprobado el uso de algunos de ellos para muestra respiratorias solamente. Estos kits incluyen el Gen Probe Amplified *M. tuberculosis* Direct test (AMTD), el roche Amolicor MTB test, el Cobas Amplicor test, el Abbott LCxtet, y el Bd- ProbeTec (SDA) test. Ninguno de esto ha sido aprobado para la detección directa de *M. tuberculosis* de muestras pulmonares. Aunque toda esta tecnología es rápida y ha demostrado excelente especificidad, su desempeño puede variar y todavía su sensibilidad no iguala a la de los métodos basados en cultivo, especialmente para las muestras con baciloscopía negativas. Un meta-análisis reciente que analizaba la exactitud de los métodos comerciales NAATs, mostró 125 estudios que analizaban muestras con frotis positivos y determinó que había un alto grado de variabilidad en la exactitud entre los estudios. Este análisis concluye que existe la necesidad de mejorar la exactitud de los NAATs, particularmente la sensibilidad y que NAATs comerciales no pueden ser recomendados para reemplazar el cultivo y la microscopía para el diagnóstico de TB pulmonar. (TERAN, ROMMY 2015. 313)

EL Xpert MTB/RIF test para el diagnóstico de TB resistente a drogas.

Los métodos NAATs disponibles para la detección de ADN de *M. tuberculosis*, incluyen procesamientos de la muestra de esputo y extracción de ADN como dos pasos separados. El Xpert MTB/RIF integra el procesamiento del esputo, extracción de ADN y amplificación en un solo paso de preparación de la muestra.

Este método automatizado basado en cartuchos detecta directamente del esputo y en menos de dos horas simultáneamente el complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina. La tecnología se basa en la plataforma Gene Xpert. Esta plataforma posibilita la detección de resistencia a la rifampicina a través de la detección de mutaciones en el gen *rpoB*. El sistema cerrado de esta tecnología, disminuye el riesgo de contaminación y no son necesarias instalaciones de bioseguridad especiales. Una revisión sobre la precisión de este método y que incluye 27 estudios, concluye que en comparación con la microscopía, el Xpert MTB/RIF incrementa la detección de TB entre casos confirmados por el cultivo en un 23%. Para la detección de la resistencia a rifampicina, el Xpert MTB/RIF muestra una sensibilidad acumulada de 95% y una especificidad acumulada de 98%.

La OMS recomendó en diciembre del 2010, el uso del Xpert MTB/RIF y en la actualidad, está promoviendo la introducción global de esta tecnología. Con la facilidad de proporcionar el acceso a esta tecnología, el sector público de ciertos países que pueden adquirir los cartuchos a precios significativamente reducidos. Hasta el 31 de diciembre de 2014, cerca de 4,000 GenXpert MTB/RIF instrumentos y más de 10 millones de cartuchos MTB/RIF han sido adquiridos por el sector público de 116 de los 145 países elegidos para acceder a este beneficio. (TERAN, ROMMY 2015. 314)

IV. DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR A TRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES PCR (REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA).

La reacción en cadena de polimerasa (PCR), es una herramienta de biología molecular ampliamente utilizada y que permite reproducir múltiples copias de una región de ADN, al usar una enzima ADN polimerasa. La eficiencia de este método ha hecho que sea

aplicado en diversos estudios que hacen parte de la investigación biológica básica del diagnóstico de muchas enfermedades y de la genética evolutiva. La prueba de PCR fue ideada y aprobada por primera vez por Kary Mullis en 1983 prueba por la cual recibió el premio nobel de química en 1993.

El principio de la PCR se basa en el hecho de que pequeñas regiones de DNA pueden ser específicamente amplificadas en grandes cantidades de manera in vitro, bajo condiciones metodológicas controladas y que a través de los años han sido modificadas y estandarizadas con el fin de optimizar la aplicabilidad de sus resultados en diferentes estudios genéticos y moleculares.

La PCR permite la síntesis específica y exponencial de una región determinada de DNA a partir de dos fragmentos de DNA específicamente diseñados los cuales hacen parte de los extremos terminales de la molécula de DNA que se desea amplificar. Las reacciones de PCR son altamente específicas, especificidad dada por la hibridación correcta de las secuencias específicas de iniciadores complementarios a la región blanco que va a ser amplificada.

Los iniciadores de la PCR incluyen secuencias de oligonucleótidos específicas, los cuales son diseñados para hibridar en cualquiera de las cadenas paralelas o anti paralelas de la región objetivo de DNA a amplificar, dichas secuencias deben ser complementarias a los extremos terminales de la región de DNA.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (DNA o DNAc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio, una solución amortiguadora o buffer y H₂O destilada.

Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se componen la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

Los equipos donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de

la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina), que es complementaria con la base de otra cadena de tal forma que el ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad de las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice. La carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfato.

En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco.

La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperaturas muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperatura.

Los primers o iniciadores son secuencias de oligonucleótidos que seleccionan y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a está.

Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada sentido y otra antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa.

El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (Ph= 8). También se usan otros buffers de composición distinta.

El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM.

El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleídos.

Etapas principales de la PCR.

Desnaturalización:

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 grados centígrados durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de guanina-citosina es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento entre estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso

Hibridación:

En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado primers, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima; esta generalmente oscila entre los 50-60 grados centígrados. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión:

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La

extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis de ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 grados centígrados, ya que a esa temperatura la enzima Taq polimerasa es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases.

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.

PCR en tiempo real.

El objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

El principio de la técnica se basa en la PCR de punto final, solo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR de punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco.

Precisamente, estas últimas dos características representan una gran ventaja de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. Actualmente la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos, aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado.

Los compuestos químicos que utiliza la PCR en tiempo real son: La enzima Taq polimerasa, dNTP's, magnesio, buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados. (Karp, Gerald. 2005. Cap.18)

V. HOJA DE RUTA PARA INCORPORAR EL XPERT MTB/RIF COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE LA TUBERCULOSIS.

Los métodos convencionales de laboratorio son lentos y engorrosos, por lo que las iniciativas actuales de investigación y desarrollo en esta materia se centran en métodos nuevos que propicien la detección rápida del *M. tuberculosis*.

Con financiamiento de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. y la Fundación Bill y Melinda Gates, la Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores (FIND) se ha asociado con la empresa Cepheid, Inc. (Sunnyvale, California, EE.UU.) y la Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey (UMDNJ, Newark, NJ, EE.UU.) con el fin de crear un método automatizado de diagnóstico específico de tuberculosis mediante la amplificación del ácido nucleico en un cartucho (Xpert MTB/RIF) basado en la plataforma Multi-enfermedades de Gene Xpert, actualmente único en su simplificación de prueba molecular dado que ha logrado integrar y automatizar en su totalidad los pasos de preparación, amplificación y detección requeridos en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para un amplio espectro de enfermedades. El Xpert MTB/RIF detecta el *M. tuberculosis* así como mutaciones que confieren resistencia a la rifampicina (RIF) directamente a partir del esputo mediante un proceso que brinda resultados en 100 minutos.

Acerca de la base de evidencia

Mediante el proceso GRADE, la OMS examinó los datos provenientes de los trabajos científicos publicados, los estudios multicéntricos de validación y demostración en laboratorios coordinados por FIND y los datos inéditos de estudios monocéntricos generados por investigadores.

Los resultados de los estudios analíticos demostraron que el Xpert MTB/RIF tiene sensibilidad analítica de cinco copias de genoma de ADN purificado y 131UFC/ml de *M. tuberculosis* agregadas al esputo. Las balizas moleculares que detectan el gen *rpoB* abarcan todas las mutaciones encontradas en más del 99.5% de todas las cepas resistentes a la rifampicina.

No se observa ninguna reactividad cruzada con las micobacterias no tuberculosas y se detectaron correctamente tanto la tuberculosis como la resistencia a la rifampicina en presencia de ADN no tuberculoso o de cepas sensibles y resistentes mezcladas. El procedimiento de inoculación y el de las muestras con el método Xpert no generaron aerosoles infecciosos detectables. Los resultados obtenidos mediante estudios clínicos comparativos de validación, en los que participaron 1730 personas con diagnóstico presuntivo de tuberculosis o tuberculosis multirresistente que fueron incorporadas en cuatro cohortes en entornos bien diversos, demostraron que una única prueba directa con Xpert MTB/RIF logró detectar 92.2% de los casos de cultivo positivo. La sensibilidad de la única prueba con Xpert MTB/RIF efectuado a los pacientes que tenían una baciloscopía negativa o un cultivo positivo fue de 72.5% y aumentó a 90.2% cuando se analizaron tres muestras. La especificidad del Xpert MTB/RIF fue de 99%. Además, este permitió detectar la resistencia a la rifampicina con una sensibilidad de 99.1% y descartarla con un especificidad de 100%.

Los resultados de los estudios de demostración, en los que participaron 6673 personas que fueron incorporadas en seis cohortes en entornos bien diferentes, confirmaron lo siguiente:

Se conservó la exactitud de la prueba, dado que una única prueba con Xpert MTB/RIF efectuada directamente con esputo logró detectar 99% de los casos que habían tenido una baciloscopía positiva y 80% de aquellos con baciloscopía negativa. La sensibilidad general de una única prueba con Xpert MTB/RIF directo en los casos de cultivo positivo fue de 91% en comparación, y la sensibilidad de una baciloscopía directa fue de 59.5%. La coinfección por el VIH disminuyó sustancialmente la sensibilidad de la microscopía (a 47%), pero no tuvo una influencia significativa en la eficacia del Xpert MTB/RIF. La detección de la resistencia a la rifampicina registró una sensibilidad de 95.1% y una especificidad de 98,4%.

El tiempo promedio transcurrido hasta la detección fue menos de 1 día con el Xpert MTB/RIF, 1 día con la microscopía, 17 días con el cultivo en medio líquido y más de 30 días con el cultivo en medio sólido. La detección de resistencia a la rifampicina tomó

menos de 1 día con el Xpert MTB/RIF y un promedio de 75 días con la prueba de sensibilidad a medicamentos fenotípica. Cuando no se utilizaron los resultados del Xpert MTB/RIF para iniciar el tratamiento, los pacientes con baciloscopía negativa comenzaron el tratamiento después de 58 días en promedio, mientras los que utilizaron el Xpert MTB/RIF, comenzaron tratamiento después de 4 días en promedio.

Los aspectos operativos evaluados confirman la solidez del Xpert MTB/RIF en diversas condiciones de temperatura y humedad, la necesidad de capacitación mínima para los miembros del personal y el alto grado de satisfacción de los usuarios. El almacenamiento de los cartuchos en entornos de gran volumen fue motivo de preocupación dada la falta de espacio suficiente. Se generó una cantidad considerablemente mayor de desechos que cuando se utiliza la microscopía. El Xpert MTB/RIF depende de una fuente de energía eléctrica ininterrumpida y estable y exige una validación anual, condiciones que pueden ser problemáticas en entornos rurales.

Los resultados de 12 estudios de evaluación monocéntricos con diseño y poblaciones de estudio diferentes reportaron sensibilidad para detección de la tuberculosis entre 70% y 100% en pacientes con cultivo positivo y en alrededor de 60% en los que tenían una baciloscopía negativa.

La especificidad varió entre 91% y 100%. La sensibilidad bruta agrupada de la detección de tuberculosis fue de 92.5% y la especificidad bruta agrupada fue de 98%. La sensibilidad y especificidad promedio para rifampicina rondaron 98% y 99%, respectivamente. (OMS, “Hoja de ruta para incorporar el Xpert MTB/RIF”, 2010”).

ACERCA DEL GRUPO DE EXPERTOS DE LA OMS Y DE LAS RECOMENDACIONES DEL GRUPO ASESOR TÉCNICO Y ESTRATÉGICO SOBRE TUBERCULOSIS (STAG-TB)

El proceso de síntesis de la evidencia emprendido en la OMS confirmó que ésta es sólida para respaldar el uso generalizado del Xpert MTB-RIF para detectar la tuberculosis y la

resistencia a la rifampicina. Por consiguiente, el grupo de expertos, tras la reunión celebrada el 1 de septiembre del 2010, recomendó que:

- ✓ Debe usarse el Xpert MTB/RIF como primera prueba diagnóstica a las personas con sospecha de tuberculosis multirresistente o tuberculosis asociada al VIH (recomendación fuerte).
- ✓ Puede utilizarse el Xpert MTB/RIF como prueba de seguimiento de la microscopía en los entornos donde la multirresistencia y/o el VIH es de menor preocupación, especialmente en muestras con baciloscopía negativa (recomendación condicional, que reconoce implicaciones de recursos importantes).
- ✓ El Xpert MTB/RIF es apropiado para los niveles distritales y sub-distritales, fuera de los entornos convencionales de laboratorio, a diferencia del cultivo y la prueba de sensibilidad a medicamentos convencionales que solo son apropiados a nivel nacional o regional en los laboratorios de referencia.
- ✓ La tecnología del Xpert MTB/RIF no elimina la necesidad de efectuar baciloscopía, cultivo y pruebas de sensibilidad a medicamentos convencionales, que son necesarios para hacer seguimiento al tratamiento y detectar farmacorresistencia a medicamentos distintos de la rifampicina.
- ✓ Para lograr una implementación apropiada del Xpert MTB/RIF, deben estar dadas varias condiciones operativas: un suministro eléctrico estable, seguridad contra robos, personal capacitado, espacio suficiente de almacenamiento, calibración anual del instrumento a cargo de un técnico especializado y precauciones de bioseguridad similares a las necesarias para la microscopía directa de esputo.
- ✓ Una consideración esencial es la necesidad de acceso rápido al tratamiento y cuidado de todos los pacientes con tuberculosis y tuberculosis multirresistente que serán detectados con rapidez tras la implementación del Xpert MTB/RIF en algoritmos de diagnóstico y de tamizaje.

VI. GENE XPERT MTB/RIF

USO PREVISTO

La prueba Xpert MTB/RIF se realiza en el GENE XPERT INSTRUMENT SYSTEM, es cualitativa, anidada a una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real in vitro detecta ADN del complejo *M. tuberculosis* a partir de muestras de esputo en bruto o en sedimento de esputo concentrado. En muestras donde el complejo *M. tuberculosis* es detectado el Xpert MTB/RIF también detecta la resistencia a rifampicina asociada a mutaciones en el gen *rpoB*. El ensayo Xpert MTB/RIF está destinado para su uso con muestras de pacientes en los que existe la sospecha clínica de la tuberculosis (TB) y que no han recibido tratamiento antituberculoso, o menos de tres días de tratamiento. Esta prueba está diseñada como una ayuda en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar cuando se utiliza junto con los hallazgos clínicos y de laboratorio.

Un resultado del Xpert MTB/RIF "NO MTB DETECTADO" de una o dos muestras de esputo es altamente predictiva de la ausencia de bacilos del complejo *M. tuberculosis* y puede ser utilizado como una ayuda en la decisión para el diagnóstico del paciente. Las evaluaciones clínicas y de laboratorio y los resultados Xpert MTB/RIF no deben ser la única base para el control de infecciones.

El Xpert MTB/RIF siempre debe ser utilizado en conjunción con cultivo de micobacterias para controlar el riesgo de falsos negativos y recuperar los organismos cuando el complejo MTB está presente para su posterior caracterización y pruebas de sensibilidad a los medicamentos. Las muestras de esputo para cultivo de TB, la microscopía de frotis AFB, y la prueba Xpert MTB/RIF deben seguir las recomendaciones de los CDC con respecto a los métodos de recolección y el marco de tiempo entre la recolección de las muestras. El Xpert MTB/RIF no proporciona una confirmación de susceptibilidad a rifampicina ya que en los mecanismos de resistencia a rifampicina que tienen estas micobacterias pueden existir otros mecanismos de resistencia que los detectados por este dispositivo que pueden estar asociados con una falta de respuesta clínica al tratamiento. Las muestras en las que se detecta el complejo MTB y la resistencia a rifampicina por medio de la detección de mutaciones en el gen *rpoB* deben ser

confirmados por un laboratorio de referencia y si la presencia de rifampicina-resistente asociada a las mutaciones del gen *rpoB* se confirma, las muestras también deben ser examinadas para buscar la presencia de mutaciones genéticas asociadas con resistencia a otros fármacos.

El Xpert MTB/RIF sólo debe realizarse en laboratorios que siguen las prácticas de seguridad de acuerdo con la publicación de los CDC/NIH, bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos y las regulaciones estatales o locales aplicables.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El Xpert MTB/RIF es una prueba de diagnóstico *in vitro* automatizada anidada que utilizando una PCR en tiempo real detecta el complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a rifampicina. Los cebadores en esta prueba amplifican una porción del gen *rpoB* que contiene el ADN del núcleo en su par de base 81. Las sondas están diseñadas para diferenciar entre la secuencia de tipo salvaje conservadas y las mutaciones en la región del núcleo que están asociadas con la resistencia a RIF. El Gene Xpert integra la purificación de la muestra, la amplificación de ácido nucleico, y la detección de la secuencia diana mediante una PCR transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real y una PCR en tiempo real.

El sistema consiste en un instrumento, el ordenador personal y el software precargado para la realización de pruebas y la visualización de los resultados. Los sistemas requieren el uso de un solo cartucho desechable Gene Xpert que sujetan los reactivos de RT-PCR y PCR y alojan los procesos de RT-PCR y PCR. Debido a que los cartuchos son autónomos la contaminación cruzada entre las muestras se reduce al mínimo.

El Xpert MTB / RIF incluye reactivos para la detección del complejo MTB y la resistencia a rifampicina de muestras de esputo en crudo y en los sedimentos de esputo concentradas. También se incluye un control de procesamiento de la muestra (SPC) y una comprobación de sonda de control (PCC) en el cartucho. El SPC está presente para el procesamiento adecuado de las bacterias diana y para vigilar la presencia de inhibidores de la reacción de PCR. La sonda Check Control (PCC) verifica la rehidratación del reactivo, el llenado del tubo donde se da la PCR en el cartucho y sondea la integridad

y la estabilidad del colorante. El Xpert MTB/RIF detecta simultáneamente el complejo MTB y la resistencia a RIF mediante la amplificación específica de una secuencia del gen *rpoB*, que se sondeó con cinco balizas moleculares (sondas A - E) para las mutaciones dentro de la rifampicina resistencia región determinante (RRDR). Cada baliza molecular se marca con un fluoróforo diferente. El máximo válido ciclo umbral o (Ct) es de 39.0 para las sondas A, B y C y 36.0 para las sondas D y E las cuales se fijan para el análisis de datos del Xpert MTB / RIF.

RESULTADOS POSIBLES DEL GENE XPERT.

- ✓ **MTB DETECTADO:** Es notificado cuando al menos dos sondas dan lugar a valores de Ct dentro del rango válido y un delta Ct min (la más pequeña diferencia Ct entre cualquier par de sondas) menor a 2,0.
- ✓ **RESISTENCIA A RIF NO DETECTADO:** Se informa si el delta Ct máximo (la diferencia entre la sonda Ct adelantadas y más) es menor o igual a 4.0.
- ✓ **RESISTENCIA A RIF DETECTADO:** Se informó si el delta Ct máximo es mayor a 4,0.
- ✓ **RESISTENCIA A RIF INDETERMINADO:** Se da solo si se cumplen las dos condiciones siguientes:
 1. El valor Ct de cualquier sonda excede el máximo válido Ct (o es cero, es decir, sin cruce de umbral).
 2. El valor más antiguo *rpoB* Ct es mayor que:[(Ct máximo válido de la sonda en la condición 1) - (delta Ct máximo de corte de 4.0)].
- ✓ **MTB NO DETECTADO:** Es notificado cuando hay sólo una o ninguna sonda positiva.

NOTA: Todos los ajustes del ensayo se incluyen como cálculos automáticos en el protocolo Xpert MTB / RIF y no pueden ser modificados por el usuario.

REACTIVOS

El kit Xpert MTB/RIF contiene suficientes reactivos para procesar 10 muestras y muestras de control de calidad.

El kit contiene:

- ✓ EN EL CORDON 1 (LIOFILIZADO): Polimerasa, dNTP (trifosfatos de desoxinucleósidos), suero de albúmina bovina (BSA) y la sonda. Dos por cartucho.
- ✓ EN EL CORDON 2, (LIOFILIZADO): Los cebadores, albúmina de suero bovino y sonda. Dos por cartucho.
- ✓ EN EL CORDON 3, (LIOFILIZADO): Control de procesamiento de muestra (SPC), 6000 esporas no infecciosas de *B. globigii*. Uno por cartucho.
- ✓ REACTIVO 1: Buffer tris, surfactantes y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). 4 ml por cartucho.
- ✓ REACTIVO 2: Buffer tris, surfactantes y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). 4 ml por cartucho.
- ✓ REACTIVO MUESTRA: Hidróxido de sodio y alcohol isopropílico. 8 ml por frasco.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

- Guardar los cartuchos y reactivos de la prueba Xpert MTB / RIF de 2 a 28 ° C.
- No utilizar los reactivos o cartuchos que han superado la fecha de caducidad.

- El cartucho es estable hasta 6 semanas a 2-45 ° C, después de abrir la bolsa.
- No abra un cartucho hasta que esté listo para probar.
- Si se utiliza un instrumento Gene Xpert, iniciar la prueba dentro de las cuatro horas de la adición de la muestra tratadas con reactivo al cartucho.
- Si utiliza un sistema Gene Xpert Infinity, asegúrese de comenzar la prueba y poner el cartucho en el transportador dentro de los 30 minutos de la adición de la muestra con reactivo al cartucho.
- No utilice los reactivos que se han vuelto turbios o están decolorados.

(Cepheid innovation, “XPert MTB/RIF”)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- ✓ Tratar todas las muestras biológicas, incluyendo los cartuchos usados, como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Debido a que es a menudo imposible saber qué muestras pueden ser infecciosas, todas las muestras biológicas deben ser tratadas con la norma de precauciones.
- ✓ Use guantes protectores desechables, batas de laboratorio, y protección para los ojos al manipular muestras y reactivos. Lavarse las manos bien después de manipular las muestras y los reactivos de la prueba.
- ✓ Siga los procedimientos de seguridad de su institución para trabajar con productos químicos y manejo de muestras biológicas.
- ✓ La preparación del digerido, decontaminado y sedimentos de esputo concentrados, y procedimientos en el Xpert MTB/RIF deben realizarse utilizando un nivel 2 de bioseguridad.
- ✓ Para la detección de los miembros del complejo de *M. tuberculosis* utilice solo los métodos de decontaminación recomendados y avalados por el CDC. Esta prueba

solo se puede utilizar con muestras de esputo en crudo o sedimentos preparados a partir de esputo inducido o expectorado.

- ✓ No sustituya los reactivos del Xpert MTB/RIF con otros reactivos.
- ✓ No abra la tapa del cartucho Xpert MTB/RIF excepto cuando se añada la muestra tratada con el reactivo de la muestra.
- ✓ No utilice un cartucho si aparece mojada o si la junta de la tapa parece haberse roto.
- ✓ No utilice un cartucho que se ha caído o se ha sacudido.
- ✓ No utilice un cartucho que tiene un tubo de reacción dañado.
- ✓ No vuelva a utilizar los cartuchos usados.

VOLUMEN REQUERIDO

- ✚ Para un test: 0.5 ml si la muestra es sedimento de esputo.
- ✚ Para un test: si la muestra es esputo sin centrifugar, la muestra requerida es de 1 ml.
- ✚ Pero el mínimo total de volumen que se debe aceptar es de 1 ml cuando es sedimento y 2 ml cuando es esputo.(Cepheid innovation, "XPRT MTB/RIF")

Control de calidad

Cada prueba incluye un control de procesamiento de la muestra (SPC) y la comprobación correcta de sonda control (PCC).El SPC contiene esporas no infecciosas en la forma de una torta de esporas en seco que se incluye en cada cartucho para verificar el procesamiento adecuado del MTB (*M. tuberculosis*).

El SPC comprueba que se han producido las condiciones para la lisis del MTB si los organismos están presentes y verifica que el procesamiento de la muestra sea adecuada. Además, este control detecta espécimen asociados a inhibición de la PCR en tiempo real y actúa como un SPC control.

El dispositivo interno debe ser positivo en una muestra de MTB-negativa y pueden ser negativas o positivas en una muestra positiva. El SPC pasa si cumple con los criterios de aceptación validados.

Comprobación de sonda de control (PCC, CC1, CC2). Antes del inicio de la primera y segunda reacción del ensayo de PCR anidada, el Gene Xpert System instrument, mide la señal de fluorescencia de las sondas QC1 y QC2 (reacción1), el rpoB y sondas SPC (reacción 2) para monitorear la rehidratación, el llenado de tubos de reacción, la sonda integrada y la estabilidad del colorante. El PCC pasa si cumple con los criterios de aceptación asignada.

SUSTANCIAS POTENCIALMENTE INTERFERENTES EN EL XPERT MTB/RIF		
SUSTANCIA	INGREDIENTE ACTIVO	[CONC] PROBADA
AC. Gástrico	A un Ph= 3-4	100% V/V
Antibiótico antimicótico	Nistatina oral	20% V/V
Glóbulos blancos	Plasma y leucocitos	100% V/V
Drogas antituberculosis	Streptomycin	25µg/ml
	Etambutol	5-50µg/ml
	Isoniazida	50µg/ml
Spray Nasal	Fenilefrina 0.5%	25-100%
Mucina	Mucina 5%	5% W/V

Fuente: Cepheid innovation, “XPRT MTB/RIF”

Interpretación de resultados

El sistema de instrumento Gene Xpert genera los resultados de las señales fluorescentes medidas y algoritmos de cálculo incrustados. Los resultados se pueden ver en la ventana de vista de resultados. Ver anexo (1)

Limitaciones

- El rendimiento del Xpert MTB/RIF se evaluó usando esputos inducidos o expectorados. Las pruebas de otras muestras clínicas (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, aspirado gástrico, heces, tejidos, orina) no ha sido evaluada y puede alterar el rendimiento del ensayo.
- Sedimentos de esputo concentrados utilizados durante la evaluación del rendimiento del Xpert MTB/RIF se prepararon siguiendo los procedimientos de acidificación y neutralización recomendados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). El uso de otros métodos de preparación de sedimentos puede alterar el rendimiento de la prueba.
- El Xpert MTB/RIF no está indicado para su uso con muestras de esputo de pacientes que están siendo tratados con fármacos antituberculosos, ya sea para determinar la curación bacteriológica o para monitorizar la respuesta al tratamiento.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de aislar el complejo MTB a partir de la muestra de esputo. El Xpert MTB/RIF debe ser utilizado en conjunción con cultivo de micobacterias para controlar el riesgo de resultados negativos falsos y recuperar el organismo para una caracterización adicional y pruebas de sensibilidad.
- Una prueba positiva no indica necesariamente la presencia de organismos viables.
- El Xpert MTB/RIF no hace diferencia entre las especies del complejo MTB (es decir, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae*). Y de otras especies en estudio *M. canetti*, *M. pinnipedi*, *M. mungiy* *M. orygis*. Además, el cultivo debe ser realizado para determinar si hay micobacterias distintas a las que conforman el complejo MTB.
- Las pruebas adicionales para determinar la presencia de mutaciones asociadas con la resistencia a otros fármacos para el tratamiento de TB debe ser realizado aunque el Xpert MTB/RIF también lo detecte.
- Debido a que la detección del complejo MTB depende del número de organismos presentes en la muestra, resultados precisos dependen de: Una recolección adecuada de las muestras, manipulación y el almacenamiento.

- Resultados erróneos de la prueba se pueden producir por: Una recolección indebida de las muestras, el no seguir el procedimiento de recolección de muestra recomendado, manipulación o problemas de almacenamiento, error técnico, confusión de muestras, o una concentración insuficiente del material de partida. El cumplimiento y cuidado de las instrucciones de este inserto es necesario para evitar resultados erróneos.
- El rendimiento del Xpert MTB/RIF no ha sido evaluada con muestras de pacientes pediátricos.
- La realización de la prueba Xpert MTB/RIF depende de la competencia del operador y la adhesión a los procedimientos de ensayo. Errores en el procedimiento del ensayo pueden causar resultados positivos falsos o negativos falsos. Todos los operadores de dispositivos deben tener una formación adecuada del uso del dispositivo.
- Un profesional de la salud capacitado debe interpretar los resultados del ensayo conjuntamente con el historial médico del paciente, los signos clínicos, síntomas y los resultados de otras pruebas de diagnóstico.
- Interferencia en el ensayo se puede observar en presencia de lidocaina (> 20% v/v), mucina (> 1.5% w/v), etambutol (> 5 mg/ml), guaifenesina (> 2.5 mg/ml), fenilefrina (> 25% v/v), o aceite de árbol de té (> 0.008% v/v).
- Los estudios demostraron que *M. scrofulaceum* cuando se prueba a una concentración de 108UFC/ml produjo un resultado falso positivo en el Xpert MTB/RIF.

RAZONES PARA REPETIR UNA PRUEBA:

INVÁLIDO: Este resultado indica que la SPC (control interno) falló. La PCR fue inhibida por los inhibidores de PCR (pus, sangre o partículas de comida).

ERROR: 5006/5007/5008: Estos resultados indican que el control de verificación de la sonda ha fallado: esto está vinculado principalmente a la viscosidad y/o volumen de esputo; el tubo de reacción se llenó incorrectamente, o detectó un problema de integridad sonda.

ERROR 2008: Presión supera la presión máxima permitida o falló del módulo Gene Xpert. Si esto sucede al azar, esto es principalmente ligado a la viscosidad de la muestra.

NO RESULTADO: Indica que se recogieron datos insuficientes. Por ejemplo, la prueba en curso se ha detenido voluntariamente o debido a un fallo eléctrico.

CEPAS PARA EL CONTROL DEL EQUIPO.

CONTROL EXTERNO POSITIVO: ATCC 27290 BCG.

CONTROL EXTERNO NEGATIVO:

- ATCC 2500M. *avium*
- ATCC 35776 *M. intracelular*,
- ATCC 2278 *M. xenopii*.
- ATCC 35776 *M. kansasii*.

(CEPHEID Indira Soundiran, 2012)

VII. DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS POR CULTIVO

Es el método bacteriológico más sensible y específico para detectar la presencia de micobacterias y en particular el *M. tuberculosis* en una muestra determinada ya sean pulmonares o extra pulmonares.

Componentes del medio de cultivo Löwenstein-Jensen:

- Fosfato mono potásico como sales, 2.4 g
- Sulfato de magnesio como sales 7 H₂O, 0.24 g
- Citrato de magnesio, 0.6 g
- L- Asparagina (fuente de nitrógeno), 3.60 g
- Glicerol como fuente de carbono y energía (grado reactivo), 12ml.
- Agua destilada como diluyente, 600ml.
- Huevos enteros son la fuente de proteínas y ácidos grasos, 1000ml.

- Verde de malaquita 2% solución recién preparada como inhibidor e indicador, 20 ml.
- Glicerina, 12 ml.

Preparación del medio LJ:

- 1) Disolver las sales en 600 ml de agua destilada. Calentar suavemente el líquido hasta la disolución total.
- 2) Agregar el glicerol y esterilizar en autoclave durante 15 min a 120 grados centígrados y dejar enfriar.
- 3) Los huevos deben ser frescos, preferentemente de granja, limpiarlos cuidadosamente con un algodón, agua y jabón y dejarlos durante 20 min en remojo en un recipiente con agua jabonosa. Enjuagarlos con agua corriente, colocarlos en un beaker y limpiarlos con algodón embebido con alcohol al 70%.
- 4) Con las manos cuidadosamente lavadas, quebrar los huevos uno por vez en un pequeño vaso estéril y observar la yema de cada uno, que debe ser firme y conservar la forma redonda, sin aplastarse ni romperse. Vaciar los huevos en un vaso graduado hasta completar un litro.
- 5) Verter los huevos en un vaso de licuadora y mezclarlos a baja velocidad durante algunos segundos. Todo el material debe estar estéril.
- 6) Filtrar la mezcla a través de un embudo cubierto con cuatro capas de gasa en un Erlenmeyer de 4000 ml.
- 7) Agregar la solución estéril de sales, L- Asparagina y glicerol, mezclar y agregar inmediatamente la solución acuosa de verde de malaquita al 2%.

- 8) Mezclar bien agitando manualmente el Erlenmeyer y dejar reposar para que las burbujas de aire contenidas en el medio asciendan a la superficie y se eliminen.

Distribución del medio.

Un procedimiento práctico para repartir el medio de cultivo recién preparado, es insertar en la boca del Erlenmeyer un dispositivo para distribuir, que consiste en un tapón de hule con perforaciones para dos tubos de vidrio, uno para filtrar y que llega hasta el fondo y el otro que solo penetra 1 cm en su boca y dará salida al medio. Este dispositivo debe estar firmemente fijado con cinta adhesiva. La parte externa de este tubo de vidrio se conecta con una manguera de hule que esta provista de una pinza Möhr.

Una vez insertado el dispositivo estéril, se procede a invertir el Erlenmeyer colocando el anillo de un soporte metálico y utilizando la pinza Möhr se distribuye el medio en forma estéril en cantidad de 5 a 7 ml para cada tubo de 20 x 150 mm que deben estar estériles. Se colocan los tubos en el coagulador. Esta inclinación debe ser un ángulo tal que permita al medio que forme en el tubo un bisel de hasta por lo menos 3cm. el coagulador debe haberse encendido previamente hasta lograr una temperatura de 85 grados. La coagulación debe hacerse durante 50 min. Terminada la coagulación llevar los tubos a la estufa a 37 grados dejándolos con los tapones ligeramente flojos durante 48 horas para controlar su esterilidad y permitir que se elimine el agua de condensación, transcurrido ese lapso ajustar bien los tapones y se guardarán en bolsas plásticas cerradas para evitar la desecación y refrigerar.

Hacer su control de esterilidad en una estufa a 37 grados dejándolos con los tapones flojos durante 48 horas.

Proceso de decontaminación:

Los objetivos del tratamiento previo al cultivo son: homogeneizar la muestra especialmente el esputo a fin de liberar al bacilo del mucus, material celular y tejido en los que está incluido.

Eliminar flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras destinadas a la investigación de *M. tuberculosis*. Los homogenizantes y decontaminantes permiten la licuefacción del mucus y la fibrina; destruyen los gérmenes asociados y conservan la viabilidad del *M. tuberculosis*.

Método de Petroff

- Colocar las muestras en línea horizontal sobre la mesa de trabajo cada operador no deberá procesar más de 12 muestras por vez.
- Poner en una gradilla igual cantidad de tubos estériles con tapón de rosca numeradas en la misma secuencia que los que contienen las muestras.
- Colocar en cada tubo 2ml de hidróxido de sodio al 4% con rojo fenol incorporado y agregar un volumen de muestra o de suspensión obtenida por macerado, igual al volumen de hidróxido de sodio al 4%. Es aconsejable utilizar goteros de diámetros de 3mm aproximadamente y una longitud de 280mm provistos de goteros de hule.
- En el caso de muestras centrifugadas emplear todo el sedimento, mezclar los tubos en un vortex cada 5 minutos por 20 segundos hasta completar 20 minutos.
- Acidificar con ácido clorhídrico 1N hasta obtener un viraje de color amarillo y luego neutralizar con hidróxido de sodio al 2% hasta obtener un viraje de color rojo que fue el original.
- Centrifugar a 3000 RPM durante 15 minutos, durante este procedimiento se producen aerosoles, por lo que se debe de cuidar la forma muy especial de cerrar herméticamente los tubos y la centrífuga.

- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante en un dispositivo que contenga fenol al 5% y por último agregar al sedimento 5 gotas de agua estéril.

Siembra del medio de cultivo.

- ✓ Colocar sobre la mesa de trabajo 2 gradillas: en uno poner los tubos con las muestras ya neutralizadas (el número correlativo debe ser claramente visible en cada tubo) y en la otra, colocar el número de tubos necesarios con medio de cultivo identificados con los números de cada una de las muestras.
- ✓ Es muy importante no utilizar el orificio de la izquierda de cada gradilla, para poder colocar en él, durante la siembra el tubo ya utilizado. De esta manera el orificio vacío se va desplazando hacia la derecha y actúa como punto de separación entre los tubos ya procesados y los pendientes a procesar. Si algún tubo contiene agua de condensación, esta debe ser eliminada antes de sembrar. La técnica de siembra debe ser minuciosa para la seguridad del operador, para no confundir las muestras y así evitar la contaminación de los tubos con gérmenes del ambiente.
- ✓ Con un gotero tomar aproximadamente 1 ml del producto ya neutralizado y sembrar de 3 a 4 gotas en cada tubo de medio de cultivo, dejando escurrir el inóculo sobre la superficie del medio.
- ✓ Una vez los medios de cultivos sembrados con el inóculo, colocarlos sobre una bandeja de fondo inclinado, para que el líquido cubra toda la superficie del medio.
- ✓ Incubar, dejando floja la tapa de cada tubo para que pueda evaporarse la parte líquida de la siembra.
- ✓ Los tubos se mantienen en posición inclinada hasta el término del periodo de observación.
- ✓ La incubación de los tubos sembrados debe hacerse a una temperatura que se mantenga en el rango de 35 a 37 grados centígrados. Por lo tanto es necesario controlar periódicamente esta temperatura.

Revisión periódica de los cultivos:

- Después de 48 horas revisar los tubos y si se ha evaporado el líquido, ajustar la tapa, a fin de impedir la desecación del medio durante el tiempo de incubación.
- Establecer si algún medio está contaminado o alterado por mala neutralización de la muestra.
- En los tubos alcalinizados el medio adquiere un color blanco amarillento y los acidificados toman un color verde azulado oscuro.
- El desarrollo de colonias antes de las 48 horas es indicativo de contaminación por flora secundaria.
- En algunos casos el medio puede estar licuado por acción de algunos gérmenes proteolíticos.
- Las revisiones posteriores son hechas cada 7 días hasta los 60 días.
- Se formarán los cultivos que hayan resultado positivos y los resultados negativos solo se podrán informar después de una incubación de 60 días.
- Si en las revisiones aparecen cultivos contaminados, se eliminarán solo aquellos en los que la contaminación haya cubierto la mayor parte de la superficie del medio y se conservará para posterior observación los que mantienen la mayor parte del medio libre. La contaminación tardía no excluye la presencia de *M. tuberculosis* por lo que es conveniente hacer un extendido con material de la superficie del medio de los tubos que se desechen por esta razón y colorear por Ziehl Neelsen.

Morfología de las colonias

Los medios sólidos evidencian el desarrollo de las micobacterias con cierto retardo con relación a los líquidos, pero en cuanto se detecta el desarrollo es posible diferenciar las colonias con características de *M. tuberculosis* con lo que, si se tiene experiencia, es posible orientar con mucho acierto si se ha aislado el bacilo de la tuberculosis.

Las colonias de *M. tuberculosis* son habitualmente color crema, rugosas, sin pigmentación y secas si se ha absorbido bien el medio la humedad propia de la muestra y las soluciones utilizadas para procesarla.

Las colonias de *M. bovis* y algunas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniazida son más planas y lisas. Cuando el medio de cultivo está muy húmedo, las colonias de cualquier micobacteria aparecen lisas. Entonces si las colonias desarrollan lentamente, no tienen pigmentación, son lisas, pequeñas o brillantes, se presenta la duda acerca de si lo que se ha aislado es una micobacteria ambiental.

Sin duda alguna es una micobacteria ambiental si se detectan BAAR con algún tipo de pigmentación (desde ligeramente amarilla hasta anaranjada fuerte) o con abundante desarrollo en medios a base de huevos durante la primera semana de incubación. Muy excepcionalmente *M. tuberculosis* puede aparecer tan precozmente si el inóculo es muy alto.

Si se sospecha el diagnóstico de micobacteriosis, la identificación debe ser proseguida con todos los aislamientos obtenidos con distintas muestras del paciente.

Informe de resultados:

Tanto el informe de cultivo como el de la baciloscopía no solo deben de ser cualitativos si no también semicuantitativos para lo cual se recomienda emplear la escala siguiente:

Negativo	No se observan colonias
No	Número total de colonias si hay menos de 20
+	20 a 100 colonias
++	Colonias separadas más de 100
+++	Colonias confluentes
C	Cultivo contaminado

Todo resultado positivo debe ser informado inmediatamente al encargado del programa de control de la tuberculosis del establecimiento de salud.(Departamento de microbiología 2014.)

PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

Para un laboratorista experimentado, la morfología macro y microscópica de las colonias, de lento desarrollo, con bacilos que se agrupan en cuerdas, pueden indicar con mucho acierto la presencia del bacilo de la tuberculosis en un cultivo positivo. Sin embargo la identificación certera de *M. tuberculosis* se alcanza mediante las pruebas bioquímicas que se presentan a continuación.

Prueba de niacina: La niacina (ácido nicotínico) juega un rol vital en las reacciones de óxido - reducción que ocurren durante el metabolismo de todas las micobacterias. Aunque todas ellas producen niacina, la mayoría lo hace en cantidad moderada y la emplea en la síntesis de otras moléculas.

Solo *M. tuberculosis* la produce muy activamente y la acumula en gran cantidad porque no puede procesarla posteriormente.

La acumulación de niacina puede ponerse en evidencia con mayor seguridad luego de 3-4 semanas de la aparición de las colonias y cuando el desarrollo es abundante (más de 50 colonias). **Lectura:** La reacción positiva identifica la presencia de niacina en alta concentración en el medio de cultivo y se visualiza con coloración amarilla. *M. tuberculosis* da un resultado positivo y *M. bovis* y micobacterias ambientales dan resultado negativo; no se observa pigmentación.

Inhibición de catalasa a 68 grados centígrados.

La catalasa es una enzima que tienen los microorganismos para defenderse, detoxificando los compuestos superoxigenados generados por las células del hospedador o durante la respiración. La catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua más oxígeno. La actividad de catalasa de *M.*

tuberculosis y *M. bovis* resulta inhibida a 68 grados centígrados. El resto de las micobacterias (con la única excepción de *M. gastri* que es muy poco frecuente) conservan la actividad de catalasa después del calentamiento a esta temperatura. La actividad de la catalasa junto con la acumulación de niacina, una característica muy útil para diferenciar *M. tuberculosis* del resto de las micobacterias.

Reducción de nitrato:

Aun cuando *M. tuberculosis* prefiere el amonio y la asparagina, puede utilizar el nitrato y nitrito como fuente de nitrógeno. Tiene una enzima unida a la membrana celular que rápida y activamente reduce el nitrato a nitrito. Esta actividad enzimática es muy estable y otorga una herramienta que ayuda a la identificación de distintas especies. En particular *M. tuberculosis* y algunas micobacterias ambientales que tienen actividad de nitrato reductasa mientras que *M. bovis* no debido a mutaciones que determinan la inactividad de los genes que la codifican.

Se puede hacer esta prueba de hasta tres semanas de desarrollo,

Los resultados positivos: se observan de color rosa esto indica que se ha reducido el nitrato.

Los resultados dudosos: presentan un color rosa muy tenue pero superior al del control negativo. En este caso repetir la prueba con reactivos recientemente preparados y con cultivos frescos.

Los resultados negativos: no presentan color.

(OPS, 2008 “Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis”)

VIII. EFICACIA DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA

Una de las características fundamentales de una prueba diagnóstica es su poder discriminatorio, y éste, tiene relación con la variabilidad de la prueba, la reproducibilidad de los hallazgos, y la variabilidad de la población sana, o la determinación de los rangos

de valores normales de la prueba en cuestión en esa población. Los criterios de evaluación de una prueba diagnóstica (PD) que con mayor frecuencia se utilizan son sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Estos, proporcionan información acerca de la capacidad de discriminación de la prueba, son de utilidad para comparar el estado de una prueba diagnóstica, debieran permitir obtener los mismos resultados cuando se aplica en diferentes grados de enfermedad, y constituyen marcadores de la proporción de enfermos y no enfermos que son clasificados correctamente.

Mención aparte requiere el concepto de “estándar de referencia”, que representa la prueba diagnóstica más cercana a la veracidad del fenómeno en estudio, de la que se puede disponer en un momento determinado; y que será utilizada para comparar con las características de la PD en estudio. Para calcular sensibilidad, especificidad y valores predictivos de una PD se deben seguir los siguientes pasos:

1. Definir el estándar de referencia o “Gold Standard”, es decir cuál es hasta el momento del estudio, la mejor alternativa diagnóstica existente para estudiar una determinada enfermedad o evento de interés en términos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos; por ende la mejor opción para identificar sujetos con y sin dicha enfermedad o evento de interés.
2. Escoger dos grupos de sujetos a estudio. Uno que presente la enfermedad o evento de interés (idealmente en distintos estados evolutivos de la enfermedad en estudio) y otro que no lo tenga, definido esto por el estándar de referencia. Es decir, a ambos grupos se les ha de aplicar el estándar de referencia y la PD en evaluación.
3. Categorizar a los individuos en estudio como positivos o negativos para la enfermedad o evento de interés en estudio, según la prueba diagnóstica en evaluación; es decir, clasificar cada paciente como enfermo o libre de la enfermedad en estudio.
4. Aplicar la definición de sensibilidad y especificidad, y finalmente calcular los valores correspondientes, para lo cual es necesario construir tablas de 2 x 2 ó de contingencia (Figuras 1 y 2).

FIGURA 1.		
	Estado respecto a la enfermedad según el estándar de referencia	
Resultado de la prueba en estudio	Presente	Ausente
Positivo	a (enfermos con prueba +)	b (no enfermos con prueba +)
Negativo	c (enfermos con prueba -)	d (no enfermos con prueba -)

Figura 1. Tabla de contingencia o de 2 x 2 primaria en la que se explica la generación posterior de las celdas con las que se generan los cálculos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

FIGURA 2.		
	Estado respecto a la enfermedad según el estándar de referencia	
Resultado de la prueba en estudio	Enfermo	Sano
Positivo	Verdadero positivo (VP)	Falso negativo (FN)
Negativo	Falso positivo (FP)	Verdadero negativo (VN)

Figura 2. Tabla de contingencia o de 2 x 2 en la que se explica la generación de los conceptos de VP, VN, FP y FN.

FIGURA 3.

FÓRMULAS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS CÁLCULOS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALORES PREDICTIVOS Y RAZONES DE PROBABILIDAD

Sensibilidad $= \frac{a}{a+c}$	Especificidad $= \frac{d}{b+d}$
VPP $= \frac{a}{a+b}$	VPP $= \frac{d}{c+d}$
RPP $= \frac{\text{Sensibilidad}}{1-\text{Especificidad}}$	RPN $= \frac{1-\text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$

VALIDEZ DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Es el grado en que una prueba diagnóstica mide lo que se supone que debe medir. Se puede aclarar a través de la siguiente pregunta: ¿con qué frecuencia el resultado de una prueba diagnóstica es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos?

Sensibilidad

La sensibilidad corresponde a la proporción de aquellos sujetos que, teniendo la enfermedad o evento de interés en estudio definida por el estándar de referencia, ésta es identificada por la prueba diagnóstica en evaluación; es decir se relaciona con el concepto de “positividad para enfermedad o evento de interés”. La sensibilidad, responde a la pregunta: ¿si el paciente tiene realmente la enfermedad, cuál es la probabilidad de que la prueba empleada sea positiva? Dicho de otra forma, la sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como positivo

respecto a la condición que estudia la prueba, razón por la que también es denominada fracción de verdaderos positivos (FVP). De ello se desprende que para calcular la sensibilidad de una prueba diagnóstica se ha de dividir el número de enfermos con prueba positiva por la sumatoria de los enfermos con prueba positiva y los enfermos con prueba negativa; es decir $a / (a + c)$; o $VP / VP + FN$. Ver figuras 1 y 2. De lo anteriormente expuesto, se puede resumir que una prueba diagnóstica de alta sensibilidad es útil en contextos clínicos donde el hecho de no diagnosticar genera más problemas que el exceso de diagnóstico. Es el caso de tamizaje o “screening”, que se realiza aplicando una PD que otorgue resultados válidos y confiables, que sea de bajo costo, de fácil realización y mínima incomodidad para el usuario.

Especificidad

Por su parte, la especificidad corresponde a la proporción de sujetos libres de la enfermedad o evento de interés en estudio, definida por el estándar de referencia, a los que la prueba diagnóstica en evaluación identifica como no enfermos o sin el evento de interés en estudio; es decir se relaciona con el concepto de “negatividad para enfermedad”. La especificidad responde a la pregunta: si el paciente no tiene la enfermedad, ¿cuál es la probabilidad de que la prueba sea negativa? Dicho de otra forma, la especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo. Es igual al resultado de restar a uno la fracción de falsos positivos (FFP).

De ello se desprende que para calcular la especificidad de una prueba diagnóstica se ha de dividir el número de sujetos “no enfermos” con prueba positiva por la sumatoria de los sujetos “no enfermos” con prueba positiva y los sujetos “no enfermos” con prueba negativa; es decir $d / (b + d)$; o $VN / FP + VN$. Ver figuras 1 y 2. De lo anteriormente expuesto, se puede deducir que una PD de alta especificidad es útil para confirmar o descartar una enfermedad o evento de interés. Un ejemplo es la utilización de pruebas más sofisticadas o “pruebas de confirmación”; cuya principal aplicación es confirmar o descartar una enfermedad, debido a las implicancias diagnósticas de ésta. Como se entenderá entonces, existe una estrecha relación entre sensibilidad y especificidad. Ésta, generalmente es de tipo inversa, es decir que, para cada resultado específico de una PD

expresado en una escala de tipo continuo, la sensibilidad puede incrementarse solamente a expensas de la especificidad. Otra forma de describirlo es a través de las denominadas curvas ROC (“receiver operator characteristic”).(MANTEROLA D. CARLOS 2009. 710,711)

La seguridad de una prueba diagnóstica los valores predictivos.

Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba diagnóstica; sin embargo, carecen de utilidad en la práctica clínica. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Sin embargo, cuando a un paciente se le realiza alguna prueba, el médico carece de información “a priori” acerca de su verdadero diagnóstico, y más bien la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo o negativo en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo o “no enfermo”? Así pues, resulta obvio que hasta el momento sólo se ha abordado el problema en una dirección. Por medio de la estimación de los valores predictivos completaremos esta información.

Valor predictivo positivo

El valor predictivo positivo (VPP) de una prueba diagnóstica corresponde a la proporción de individuos con una prueba positiva para una enfermedad o evento de interés determinado, que están realmente enfermos de ella. El VPP de una prueba se puede explicar con el siguiente escenario: si el resultado de una PD es positivo ¿qué probabilidad tiene el paciente de presentar la enfermedad en estudio? Dicho de otra manera, el VPP de una PD se define por la proporción de resultados positivos de la prueba diagnóstica en quienes la enfermedad está presente (confirmada por el estándar de referencia); o, por la probabilidad de que un paciente sea un VP teniendo el resultado de la PD positiva; o, por la probabilidad de tener la enfermedad dado que el resultado de la PD fue positiva.

De esto se desprende que para calcular el VPP de una PD se ha de dividir el número enfermos con prueba positiva por la sumatoria de los enfermos con prueba positiva y los

sujetos “no enfermos” con prueba positiva; es decir $a / (a + b)$; o $VP / VP + FP$. Ver figuras 2 y 3.

Valor predictivo negativo

Por su parte, el valor predictivo negativo (VPN) de una prueba diagnóstica corresponde a la proporción de individuos con una prueba negativa para una determinada enfermedad o evento de interés en estudio, que no tienen la enfermedad o evento de interés. Así, este concepto se podría explicar con el siguiente escenario: si el resultado de una prueba es negativo, ¿cuál es la probabilidad que tiene el paciente de no presentar la enfermedad en estudio? Dicho de otra manera, el VPN de una PD se define por la proporción de personas con resultados negativos de la PD en quienes la enfermedad está ausente; por la probabilidad de que el paciente sea un VN teniendo una PD negativa; y por la probabilidad de que la enfermedad esté ausente dado un resultado negativo de la PD. De lo anteriormente expuesto, se puede colegir que para calcular el VPN de una PD se ha de dividir el número enfermos con prueba negativa por la sumatoria de los enfermos con prueba negativa y los sujetos “no enfermos” con prueba negativa; es decir $d / (c + d)$; o $VN / FN + VN$. Ver figuras 2 y 3. Es importante entonces recalcar que al igual que para el VPP, el VPN también depende de la sensibilidad y especificidad de la PD y de la prevalencia del fenómeno en evaluación en la población en estudio.

La influencia de la prevalencia de la enfermedad o evento de interés en estudio en el comportamiento de una prueba diagnóstica.

Los valores de sensibilidad y especificidad, a pesar de definir completamente la validez de la PD, presentan la desventaja de que no proporcionan información relevante a la hora de tomar una decisión clínica ante un determinado resultado de la prueba. Sin embargo, tienen la ventaja adicional de que son propiedades intrínsecas a la PD y definen su validez independientemente de cuál sea la prevalencia de la enfermedad en la población a la cual se aplica (probabilidad pretest o probabilidad estimada antes de la aplicación de la PD).

Por el contrario, el concepto de valor predictivo, a pesar de ser de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico, presenta la limitación que depende en gran medida de lo frecuente que sea la enfermedad o el evento de interés a diagnosticar en la población objeto de estudio.

Es decir, cuando la prevalencia de una enfermedad o evento de interés es baja, un resultado negativo permitirá descartar la enfermedad con mayor seguridad, siendo así el VPN mayor. Por el contrario, un resultado positivo no permitirá confirmar el diagnóstico, resultando en un bajo VPP.

Las razones de probabilidad.

Queda claro entonces cómo la prevalencia del evento de interés en estudio puede influir en los valores predictivos de una PD. Por lo tanto, éstas, no pueden ser utilizadas como índices a la hora de comparar dos métodos diagnósticos diferentes, ni tampoco a la hora de extrapolar los resultados de otros estudios en datos propios de cada clínico o de un centro en particular. Por ello, resulta necesario determinar otros índices de valoración que sean a la vez clínicamente útiles y no dependan de la prevalencia de la enfermedad en la población a estudiar. Así, además de los conceptos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, se suele hablar del concepto de razón de probabilidad, de verosimilitud o cociente de probabilidades; o “likelihood ratios”. Estos, miden cuánto más probable es un resultado concreto (positivo o negativo) según la presencia o ausencia de enfermedad. Calcular las razones de probabilidad permite conocer mayor precisión en la información de una PD. Mediante la combinación de la sensibilidad y especificidad de una PD se pueden obtener resultados más confiables sobre la validez de esta.

La razón de probabilidad puede ser positiva o negativa. La razón de probabilidad nos indica cuánto más probable es un resultado determinado de una PD en un paciente con una enfermedad dada comparado con un paciente sin la enfermedad o evento de interés. La razón de probabilidad ofrece la ventaja de relacionar la sensibilidad y la especificidad de una prueba en un solo índice. Además, pueden obtenerse razones de probabilidad según varios niveles de una nueva medida y no es necesario expresar la información de forma dicotómica, como resultado de normal o anormal o bien positivo y negativo. Por

último, al igual que sucede con la sensibilidad y la especificidad, no varía con la prevalencia. Esto permite utilizarlas como índices de comparación entre diferentes pruebas para un mismo diagnóstico y se mantienen constantes, aunque la prevalencia de la enfermedad varíe en los sujetos en quienes se aplica la prueba.

Por otra parte, la razón de probabilidad es particularmente útil para el clínico debido a que le permite un mejor entendimiento de los resultados de una prueba ya que puede entender con qué fuerza el resultado positivo de una PD indica la presencia real de la enfermedad y la fuerza de un resultado negativo para descartar la enfermedad. En otras palabras, la razón de probabilidades nos indicará, como el resultado de una prueba hará cambiar la probabilidad pre-test a la probabilidad post-test de la enfermedad.

Razón de probabilidad positiva

La razón de probabilidad positiva (RPP) o “likelihood ratio positivo” de una PD describe la probabilidad de tener la enfermedad en oposición a no tenerla, teniendo un resultado positivo de la prueba en estudio.

Corresponde a la relación entre el porcentaje de enfermos que presentan una prueba diagnóstica positiva y el porcentaje de “no enfermos” que presentan una prueba diagnóstica positiva. Se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes enfermos entre la probabilidad de un resultado positivo entre los sanos. Es, en definitiva, el cociente entre la fracción de VP (sensibilidad) y la fracción de FP (1-especificidad); o la relación entre la sensibilidad y el complemento de la especificidad.

Razón de probabilidad negativa

La razón de probabilidad negativa (RPN) o “likelihood ratio negativo” de una PD describe la probabilidad de no tener la enfermedad en oposición a tenerla, teniendo un resultado negativo de la prueba en evaluación.

Corresponde a la relación entre el porcentaje de enfermos que presentan una PD negativa y el porcentaje de no enfermos que presentan una PD negativa. Se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de enfermedad entre la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Es decir, corresponde al

cociente entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad); o en otras palabras, constituye la relación entre el complemento de la sensibilidad y la especificidad (Figura 3).

CURVAS ROC (RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC)

La limitación principal del enfoque hasta ahora expuesto consiste en que habitualmente se piensa en que las PD nos dan una respuesta de tipo dicotómico, es decir positiva o negativa. Esta situación obviamente dejaría al margen a una gran cantidad de PD cuyos resultados se miden en una escala continua o, al menos, discreta ordinal. Por ejemplo, las evaluaciones de función renal y hepática a través de la exactitud de la creatinina, la bilirrubina y las transaminasas respectivamente; o de inmunohistoquímica, en que los resultados se expresan en porcentajes de presencia de la reacción.

Entonces, la generalización a estas situaciones se consigue mediante la elección de “puntos de corte” que permitan una clasificación dicotómica de los valores de la prueba según sean superiores o inferiores al valor elegido. La diferencia esencial con el caso más simple es que ahora contaremos con algo más que un único par de valores de sensibilidad y especificidad que definan la exactitud de la prueba; sino que con un conjunto de pares correspondientes cada uno a un nivel de decisión distinto. Este procedimiento constituye la esencia del análisis ROC, una metodología desarrollada en el seno de la teoría de la decisión en la década de los 50.

De este modo, mediante la representación de los pares (1-especificidad y sensibilidad) obtenidos al considerar todos los posibles “puntos de corte” de la PD, la curva ROC nos proporciona una representación global de la exactitud diagnóstica. La curva ROC es necesariamente creciente, propiedad que refleja el compromiso existente entre sensibilidad y especificidad: si se modifica el valor de corte para obtener mayor sensibilidad, sólo puede hacerse a expensas de disminuir al mismo tiempo la especificidad. Si la prueba no permitiera discriminar entre grupos, la curva ROC sería la diagonal que une los vértices inferior izquierdo y superior derecho. La exactitud de la prueba aumenta a medida que la curva se desplaza desde la diagonal hacia el vértice

superior izquierdo. Si la discriminación fuera perfecta (100% de sensibilidad y 100% de especificidad) pasaría por dicho punto.

Una curva ROC se construye a partir de los métodos no paramétricos. Estos se caracterizan por no hacer ninguna suposición sobre la distribución de los resultados de la PD. El más simple de estos métodos es el que suele conocerse como empírico, que consiste simplemente en representar todos los pares; es decir todos los pares (1-especificidad y sensibilidad) para todos los posibles “puntos de corte” que se puedan considerar con la muestra particular de la que se disponga. Desde un punto de vista técnico, este método sustituye las funciones de distribución teórica por una estimación no paramétrica de ellas.

No obstante, ello se puede construir también aplicando métodos paramétricos, que se basan en postular un determinado tipo de distribución para la variable de decisión en las dos poblaciones en estudio. El modelo más frecuentemente utilizado es el binormal, que supone la normalidad de las variables tanto en la población enferma como en la “no enferma”; pero existen otros modelos posibles que surgen al considerar distintas distribuciones, similares a la normal como la logística (modelo bilogístico) o la exponencial negativa. El problema ahora se reduce a estimar los parámetros de cada distribución por un método estadísticamente adecuado; en general el método de máxima verosimilitud. Se obtiene así una curva ROC suave, pero puede ocurrir una sustancial falta de ajuste si los supuestos distribucionales resultan ser erróneos. Por ello, si se va a emplear este método debe previamente someterse la hipótesis sobre la naturaleza de las distribuciones a un contraste de significación. En base a los párrafos anteriores se desprenden algunos conceptos que es necesario aclarar.

1. El área bajo la curva ROC que corresponde al área bajo la curva (ABC) y que se puede emplear como un índice conveniente de la exactitud global de la PD: la exactitud máxima correspondería a un valor de ABC de 1 y la mínima a uno de 0,5 (si fuera menor de 0,5 debería invertirse el criterio de positividad de la prueba).

2. Elección del “punto de corte”. Para ello es imprescindible un conocimiento detallado de los riesgos y beneficios de las decisiones médicas derivadas del resultado de la PD.

Un enfoque sencillo que utiliza la razón de costes de un resultado FP frente a un FN, lo que requiere calcular el siguiente coeficiente: donde “P” representa a la prevalencia de la enfermedad o evento de interés; o sea el costo de tener un falso positivo, versus el costo de un falso negativo. El valor de corte óptimo se determina hallando el punto de la curva ROC con la siguiente propiedad: la tangente a la curva en ese punto tiene una pendiente “m” En consecuencia, las curvas ROC son útiles para: conocer el rendimiento global de una PD (área bajo la curva), comparar dos PD o dos puntos de corte de una misma; comparar dos curvas o dos puntos sobre una curva; y elegir el “punto de corte” apropiado para un determinado paciente. Sin embargo, tienen limitaciones, las que dicen relación con que sólo contemplan dos estados clínicos posibles: enfermo y “no enfermo”; y no sirven para situaciones en que se trata de discernir entre más de dos enfermedades o eventos de interés. (MANTEROLA D. CARLOS 2009. 712,713)

Criterios a considerar en la valoración de una prueba diagnóstica (PD)

Características de la población. La sensibilidad o especificidad de una prueba dependen de las características de la población estudiada. Si se altera o cambia la población en estudio, cambiarán también estos índices. Los datos informados de sensibilidad y especificidad, que son evaluados en poblaciones con una tasa significativa de enfermedad, pueden no ser aplicables en otras poblaciones diferentes en las que se utilice la prueba. Para que este criterio se cumpla, el artículo debe contener información sobre los siguientes aspectos: género y edad de los sujetos en evaluación, resumen de los síntomas clínicos iniciales o estadio de la enfermedad, y criterios de elección para los sujetos que son enrolados en el estudio.

Subgrupos adecuados. La sensibilidad y la especificidad pueden representar valores promedios para una población determinada. A menos que el problema para el cual se utiliza la prueba haya sido definido con mucha precisión, aquellas pueden variar en diferentes subgrupos poblacionales. Para que la prueba pueda ser utilizada con éxito deberían tenerse en cuenta distintos niveles de precisión según los distintos subgrupos existentes en la población estudiada. Este criterio se cumple cuando se informa sobre la precisión de la prueba en relación con cualquier subgrupo demográfico o clínico (por ejemplo en sujetos sintomáticos y sujetos asintomáticos).

Sesgo de selección. Puede producirse cuando los sujetos con los resultados positivos o negativos de una prueba son derivados de forma preferente para verificar el diagnóstico mediante otra prueba considerada el estándar de referencia. Para que este criterio se cumpla, todos los sujetos deberían de haber sido asignados para recibir tanto la prueba diagnóstica en estudio como el estándar de referencia a través de un procedimiento directo o mediante el seguimiento clínico.

Sesgo de medición. Podría introducirse si la PD o el estándar de referencia se realizan sin tomar precauciones para garantizar la objetividad de su interpretación (similar al enmascaramiento utilizado en los ensayos clínicos para tratamiento). Se puede obviar si la PD en evaluación y el estándar de referencia son interpretadas de forma separada y enmascarada por personas independientes que desconocen los resultados de una y otra.

Precisión de los resultados.

La precisión de la sensibilidad y la especificidad depende del número de pacientes evaluados. Igual que otras medidas, el resultado estimado debe tener los intervalos de confianza o el error estándar reportados independientemente de la magnitud encontrada.

Presentación de resultados indeterminados.

No todos las PD dan lugar a un sí o un no como respuesta, a veces dan lugar a resultados equívocos o indeterminados. La frecuencia de resultados indeterminados limitará la aplicabilidad de la prueba o la hará más cara si da lugar a otros procedimientos diagnósticos posteriores. La frecuencia de resultados indefinidos y el modo en el que se usan en el cálculo de la precisión de la prueba constituyen una información de importancia crítica para conocer la eficacia de la misma. Para que este criterio se cumpla el trabajo debe reflejar de forma apropiada todos los resultados positivos, negativos o indeterminados generados durante el estudio, así como si los resultados indeterminados se incluyeron o excluyeron al calcular los indicadores de precisión de la prueba.

Reproducibilidad de la prueba.

Las pruebas no siempre dan el mismo resultado, por motivos relacionados con la variabilidad de éstas o de la interpretación del observador. Los motivos y el impacto de

este asunto deben ser tenidos en cuenta. Para que se cumpla este criterio en pruebas que requieren interpretación del observador, al menos algunas de las pruebas deberían ser evaluadas con alguna medida que resuma la variabilidad inter observador. Para pruebas sin interpretación del observador, el criterio se cumple cuando se refleja una media que resuma la variabilidad del instrumento. (MANTEROLA D. CARLOS 2009. 714,715)

IX. EL ÍNDICE KAPPA

La medición es una actividad omnipresente tanto en la práctica como en la investigación clínica. Como ejemplos se pueden citar desde actividades relativamente simples, como registrar la presión arterial mediante un esfigmomanómetro, hasta actividades más complejas, como determinar la carga viral mediante una sofisticada técnica de laboratorio, pasando por la evaluación de la calidad de vida mediante un cuestionario diseñado al efecto.

Estos procesos de medición están siempre amenazados por diversos errores que condicionan la calidad tanto de la investigación como de las decisiones clínicas que se apoyan en dichas mediciones. Por ello es aconsejable que el clínico conozca algunos fundamentos de la teoría de la medida, en particular los índices usados en la evaluación de los errores de medición. Básicamente hay que considerar dos tipos de errores: el error debido a la precisión limitada del instrumento, que atenta a la reproducibilidad de la medición introduciendo un error aleatorio, y el debido a la validez, también limitada, que introduce un error sistemático.

De modo esquemático se puede decir que la validez tiene que ver con la cuestión de si el instrumento mide lo que debe medir, mientras que la precisión tiene que ver con cuánto se aproxima la medida al valor real de la magnitud. En ambos casos es siempre una cuestión de grado, pues no existen instrumentos infinitamente precisos y válidos: hay sólo instrumentos más precisos y/o válidos que otros.

En cuanto a la reproducibilidad, llamada también concordancia, se distingue entre la reproducibilidad del mismo instrumento en dos instantes de tiempo diferentes y se habla de concordancia o consistencia interna o intraobservador (Por ejemplo, un radiólogo ¿clasifica igual la misma radiografía estudiada hoy y 2 meses después?), y la reproducibilidad del mismo instrumento usado en diferentes condiciones (por ejemplo, dos radiólogos diferentes ¿clasifican del mismo modo la misma radiografía?), se habla entonces de concordancia o consistencia externa o interobservador.

Tabla 1.			
Radiólogo A			
Radiólogo B	Neumonía	No neumonía	Total
Neumonía	4 a	6 B	r = a + b = 10
No	10 c	80 d	s = c + d = 90
Total	t = a + c = 14	u = b + d = 86	n = a + b + c + d = 100

Este ejemplo es útil también para resaltar que en clínica el término “instrumento de medida” se suele usar en sentido amplio; aquí no es sólo el aparato de rayos usado para obtener la imagen, sino el conjunto formado por el aparato y el observador que la interpreta. El procedimiento para evaluar la reproducibilidad de un instrumento consiste en comparar entre sí distintas medidas de un mismo objeto y evaluar su grado de acuerdo (cuanto más se parezcan estas medidas entre sí, más preciso es el instrumento). En el ejemplo anterior habría que comparar los resultados de la evaluación de una serie de radiografías por el mismo radiólogo en dos instantes de tiempo (concordancia interna) o por dos radiólogos diferentes (concordancia externa).

La manera de expresar los resultados de esta comparación depende del tipo de variable implicada; en el caso de una variable binaria (tipo sí o no; por ejemplo, enfermo o no enfermo) el índice más sencillo es la proporción de acuerdos observados. Supongamos que en un estudio para evaluar la concordancia entre dos radiólogos que interpretan

radiografías de tórax, clasificando cada una como neumonía sí o no, ofrece los resultados de la tabla 1.

La proporción de acuerdo observado es $P_o = (80 + 4)/100 = 0,84$. Este índice es muy intuitivo y fácilmente interpretable: tomará valores entre 0 (total desacuerdo) y 1 (máximo acuerdo). Sin embargo, como indicador de reproducibilidad tiene el inconveniente de que, aun en el caso de que los dos observadores clasifiquen con criterios independientes (por ejemplo, un radiólogo con todo su leal saber y entender y el otro tirando un dado al aire), se produciría un cierto grado de acuerdo por azar. Puede haber coincidencia en el resultado sin que exista nada más que el puro azar, no el mismo criterio en la decisión. Es deseable que un índice de concordancia tenga en cuenta este hecho y que, de algún modo, indique el grado de acuerdo que existe por encima del esperado por azar. En este sentido Cohen propuso el denominado índice kappa (κ), que definió como:

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Siendo P_o la proporción de acuerdos observados y P_e la proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los observadores, es decir, de acuerdos por azar. A partir de la tabla 1, $P_o = (a + d)/N$ y $P_e = (rt + su)/N^2$. La interpretación de este índice se facilita mediante su representación gráfica.

En la figura 1 se observa que el índice K representa la proporción de concordancia observada más allá del azar, respecto de la máxima concordancia posible más allá del azar.

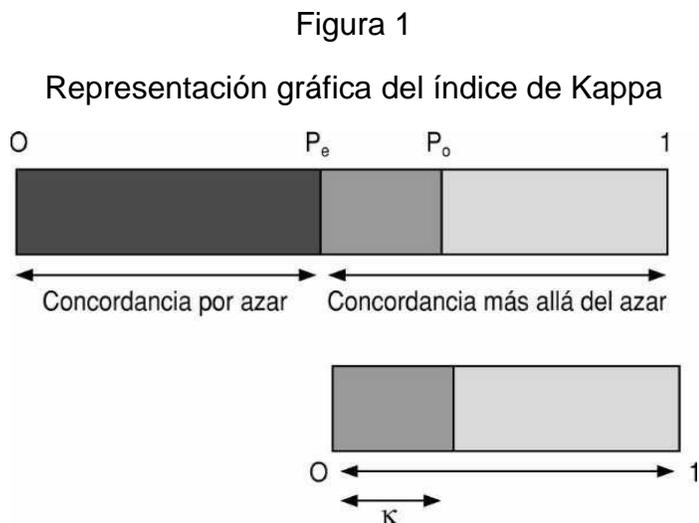
En el ejemplo:

$$P_e = \frac{14 \times 10 + 86 \times 90}{100^2} = 0,788$$

Y por lo tanto

$$K = \frac{0,84 - 0,788}{1 - 0,788} = 0,245$$

Es decir, el grado de acuerdo, una vez corregido el debido al azar, es mucho más modesto (24,5%) que lo que indicaba el 84% de acuerdo “crudo”. Landis y Koch propusieron, y desde entonces ha sido ampliamente usada, la escala de valoración del índice κ que figura en la tabla 2.



Desde la propuesta inicial de Cohen el índice K ha sido progresivamente generalizado a clasificaciones multinomiales (con más de dos categorías), ordinales, a más de dos observadores, a diseños incompletos y a todas estas situaciones combinadas, generalizaciones que suponen una mayor complejidad en el cálculo pero que mantienen la misma interpretación.

Esta interpretación está dificultada por algunos efectos poco intuitivos. En primer lugar, el índice K depende de la prevalencia del carácter observado: Cuanto más cerca esté de 0 ó de 1, menor es el índice κ para igual proporción de acuerdos observados. En segundo lugar, depende de la simetría de los totales marginales: en igualdad de acuerdos observados, cuanto menor sea la diferencia entre las prevalencias observadas por cada observador, menor es el índice κ . El pequeño valor de κ para los datos de la tabla 1 se matiza a la luz de estos efectos: estamos en la peor de las situaciones posibles: baja

prevalencia y similar para ambos observadores (0,14 para el radiólogo A y 0,10 para el B). (ABRAIRA V. 2000. 247,248).

Kappa (κ)	Grado de acuerdo
< 0,00	Sin acuerdo
0,00-0,20	Insignificante
0,21-0,40	Mediano
0,41-0,60	Moderado
0,61-0,80	Sustancial
0,81-1,00	Casi perfecto

5. Diseño metodológico

Tipo de estudio

✚ Sincrónico, retrospectivo, descriptivo y documental

Población y muestra

Fue conformada por todos los resultados de las muestras pulmonares que se les indicó el método Gene Xpert MTB/RIF, del Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch en el año 2013.

Fuente de obtención de datos

Con ayuda de la coordinadora en Laboratorio Clínico de la Universidad de El Salvador se realizó una carta dirigida a la jefatura del Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch específicamente a la Licda. Guadalupe Hidalgo de Guzmán, coordinadora del Laboratorio Nacional de Referencia y laboratorios de vigilancia en salud, solicitando la autorización para la obtención de datos de muestras pulmonares que se les realizó Gene Xpert MTB/RIF y cultivo sólido de Löwenstein-Jensen en el año 2013; después de unas semanas se nos comunicó que los datos serían autorizados para utilizarlos en la investigación, los datos que fueron entregados y posteriormente se guardaron en un dispositivo USB.

Procesamiento de datos

Una vez obtenidos los resultados para facilitar el manejo de los mismos se estableció un único criterio de inclusión: solamente aquellas muestras que se les realizó Gene Xpert MTB/RIF, cultivo sólido de Löwenstein Jensen y que tenían ambos resultados ya sea positivos o negativos fueron de interés para la investigación. Se excluyeron todas aquellas muestras que tenían inconclusos sus resultados y todo resultado que pudiera generar confusión como por ejemplo: resultados con errores en el caso del Gene Xpert y contaminación para el cultivo.

De 1038 muestras pulmonares analizadas en el año 2013, solamente 478 muestras tenían resultados de Gene Xpert y cultivo que cumplían con el criterio de inclusión antes mencionado.

Para obtener la sensibilidad y la especificidad del Gene Xpert MTB/RIF y cultivo sólido de Löwenstein Jensen, se analizaron los resultados reportados por ambas pruebas estableciéndose los verdaderos positivos; verdaderos negativos; falsos positivos y falsos negativos de cada una.

Luego se utilizaron tablas de contingencia 2 x 2 que contaron con cuatro secciones a, b, c y d respectivamente.

Luego de tener todos los resultados plasmados en el cuadro, se procedió a la utilización de las fórmulas para evaluar la sensibilidad y la especificidad del método en estudio.

Para obtener la sensibilidad utilizamos:

Número de verdaderos positivos entre la sumatoria de verdaderos positivos y falsos negativos.

$$\text{Sensibilidad} = a / a + c$$

Para obtener la especificidad utilizamos:

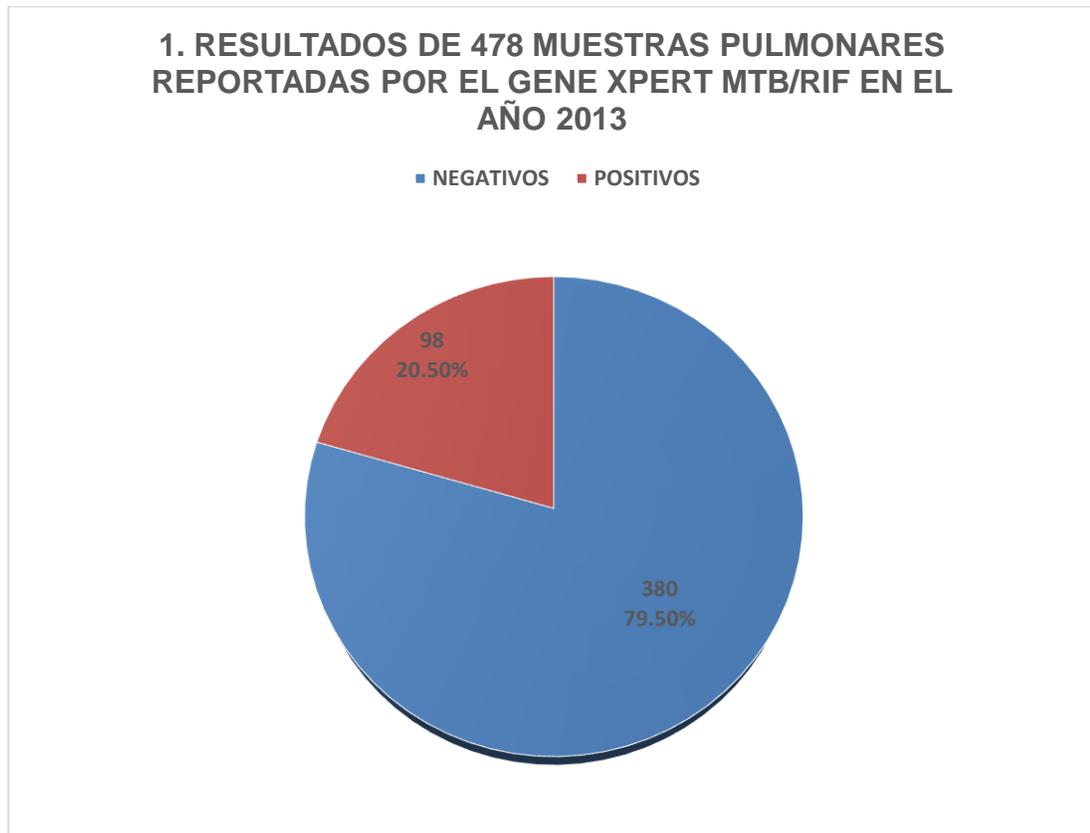
Número de verdaderos negativos entre la sumatoria de falsos positivos y verdaderos negativos.

$$\text{Especificidad} = d / b + d.$$

6. RESULTADOS

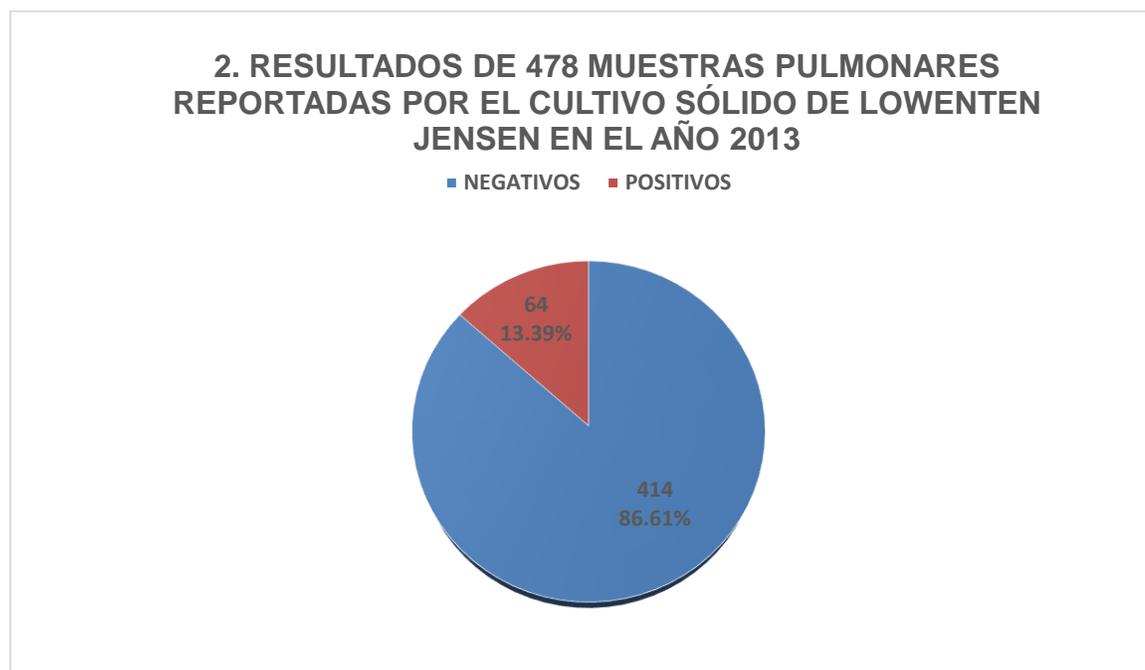
En el Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch de enero a diciembre del año 2013 se procesaron 1038 muestras pulmonares por el método de Gene Xpert MTB/RIF y cultivo sólido de Löwenstein Jensen, de las cuales solo 478 cumplieron con los criterios de inclusión de la investigación.

De los 478 resultados de las muestras que se les realizó Gene Xpert MTB/RIF, 98 (20.50 %) fueron positivas al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y 380 (79.50%) fueron negativas. Ver gráfico N°1.



Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch 2013.

De los 478 resultados reportados por el cultivo sólido de Löwenstein Jensen, 64 (13.39%) de las muestras fueron positivas y 414 (86.61%) negativas a micobacterias. Ver gráfico N°2



Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch 2013.

Cuadro I. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de 478 casos probables de tuberculosis pulmonar		
	Xpert MTB/RIF	Cultivo de Löwenstein Jensen
Sensibilidad	90.74%	59.25%
Especificidad	100%	100%
Valor predictivo positivo	100%	100%
Valor predictivo negativo	97.36%	89.37%

En el cuadro N° 1 se presenta la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos del Gene Xpert MTB/RIF y cultivo sólido de Löwenstein Jensen. Obtenidos al establecer los verdaderos positivos o verdaderos enfermos, los falso negativos, falsos positivos y verdaderos negativos o no enfermos.

Discusión de los datos

Por los métodos de Gene Xpert MTB/RIF y cultivo sólido de Löwenstein Jensen, se logró detectar 108 (22.59%) pacientes enfermos o “verdaderos positivos” y 370 (77.41%) pacientes no enfermos o “verdaderos negativos”. El aporte de los 108 verdaderos positivos se logró analizando los resultados de ambas pruebas diagnósticas, se incluyeron: 54 resultados positivos reportados en ambas pruebas donde se detectó y aisló *Mycobacterium tuberculosis*, 44 resultados positivos reportados por el Gene Xpert MTB/RIF y 10 aislamientos reportados por el cultivo sólido de Löwenstein Jensen no pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, pero relacionadas a enfermedad en pacientes inmunocomprometidos.

De 108 verdaderos positivos, el Gene Xpert MTB/RIF detectó 98 casos a *Mycobacterium tuberculosis*, presentando una sensibilidad de 90.74%, un 31.49% más sensible que el cultivo sólido de Löwenstein Jensen que reportó 64 positivos mostrando una sensibilidad de 59.25%.

Es significativa la diferencia de sensibilidad que mostraron ambos métodos diagnósticos; de lo cual se pueden hacer siguientes consideraciones: El Gene Xpert es automatizado, estandarizado, se basa en una PCR en tiempo real detectando DNA únicamente del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y utiliza un sistema cerrado de menor manipulación; en cambio el cultivo es preparado de forma casera, tiene mayor probabilidad de contaminación por exceso de manipulación del personal que lo elabora, la cantidad de micronutrientes no son cuantificados en cada lote de cultivo y de igual forma al proceso de decontaminación que se someten las muestras al no ejecutarse correctamente los bacilos pierden su capacidad de reproducirse provocando una mayor frecuencia de resultados negativos.

Se puede estimar según los porcentajes de la investigación en cuanto a sensibilidad, por cada 100 pacientes con tuberculosis, por el método Gene Xpert se detectarían 91 pacientes positivos a TB, y reportaría 9 negativos estando positivos, por otra parte el medio sólido de Löwenstein Jensen solo detectaría 59 pacientes positivos y el restante los reportara negativos estando positivos, presentando un problema ya que todos los

pacientes reportados como negativos estando positivos propagarían el *Mycobacterium tuberculosis* a otras personas, lo cual aumenta la morbilidad permitiendo que el control de esta enfermedad sea más difícil.

De 370 verdaderos negativos el Gene Xpert reportó 380 negativos y el cultivo reportó 414 negativos, ambas pruebas detectaron falsos negativos 10 y 44 respectivamente, la especificidad presentada por ambas pruebas fue de 100% ya que reportaron como negativas todas las muestras en las que no estaba presente el *Mycobacterium tuberculosis*, lo que significa un alto poder de confirmación para verdaderos negativos, el valor predictivo positivo para el Gene Xpert y el cultivo fue de 100%, si un paciente le detecta *Mycobacterium tuberculosis* el cultivo o el Gene Xpert MTB/RIF, tiene la sintomatología y alta sospecha de TB; es 100% seguro que ese paciente tiene TB según los valores predictivos positivos presentados por ambas pruebas. El valor predictivo negativo para el Gene Xpert fue de 97.36% y para el cultivo fue de 89.37% significa que, si un paciente el cultivo da un resultado negativo, en un 10.63% ese resultado no es confiable para el profesional en laboratorio, pero con el Gene Xpert es solamente del 2.64%. El profesional debe tener en cuenta que los valores predictivos dependen de lo frecuente que sea la enfermedad, se puede reportar con mayor seguridad un resultado negativo donde la enfermedad es menos frecuente, pero si un resultado es negativo en un país donde la tuberculosis es muy frecuente; el resultado se debe confirmar con un método de mayor sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad y especificidad obtenida del Gene Xpert de 90.74% y 100% respectivamente, es similar a otras investigaciones, el autor Vallejo V. Patricio realizó una investigación con el tema “Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis” los resultados obtenidos fueron: sensibilidad para detectar en la expectoración o en lavado bronco- alveolar el bacilo de Koch fue de 93.94%, utilizando el cultivo como “*gold standard*”,(Vallejo V., Patricio 2015).

También los autores Barriga y Solis en el año 2014 publicaron la investigación científica con el tema “Evaluación de la prueba Gene Xpert MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la resistencia a rifampicina en muestras extrapulmonares” encontrándose una sensibilidad de 73.2%, especificidad de 100%, valor predictivo

positivo de 100% y valor predictivo negativo de 95.6%. El cultivo reportó 27 aislamientos de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium kansasii*, estas micobacterias no las reporto el Gene Xpert MTB/RIF, por lo tanto, si no se hubiesen incluido como falsos positivos del Gene Xpert, su sensibilidad correspondería al 100%, ya que los 27 aislamientos por cultivo (26.7%) no pertenecen al complejo MTB. (Barriga Angulo, Gustavo. Solís Trejo M. 2014).

Los autores Gilli y Sequeira realizaron una investigación con el tema “Estudio comparativo de medios líquidos y sólidos en el diagnóstico de micobacterias” En la cual se compararon los medio 7H9 de Middlebrook y sistema M-GIT con los medios clásicos en condiciones de terreno; encontrado para el caso del cultivo sólido una sensibilidad de 82%, diferente a la sensibilidad que presentó el cultivo sólido en la presente investigación que fue de 59.25%.

Los hallazgos más importantes de la investigación fueron la sensibilidad mostrada por los medios de cultivos líquidos. En el caso del cultivo líquido M-GIT en comparación con los medios clásicos, se observó una mayor sensibilidad de 82% se incrementó a 92.3%, un menor tiempo de espera y un mayor costo. Los cultivos de 7H9 Middlebrook en comparación con los medios clásicos se observó una mayor sensibilidad de 82% se incrementó a 97%, un menor tiempo de espera y mayor carga de trabajo.

Muestras con escaso número, es decir baciloscopía negativa, en el 7H9 la positividad aumenta de 7.4% a 9.1%. En promedio el agregado de medios líquidos incrementó el aislamiento por cultivo en un 24%.

El tiempo de detección de los cultivos positivos era significativamente menor que los medios solidos con una mediana de 13.5 días.

Agregar a los medios de cultivo clásicos un tubo de M-GIT en muestra con paciente inmunocomprometidos con o sin baciloscopía negativa y que necesiten un rápido diagnóstico debido a la condición que presenta su sistema inmune, aumenta la positividad de los cultivos de 14.9% a 18.1%.

La OMS recomienda para la identificación primaria de la TB, agregar el medio líquido a los cultivos sólidos, al aplicar estas recomendaciones se mejoraría el diagnóstico de TB disminuyendo el tiempo de espera en los resultados, aumentando la sensibilidad y también la especificidad. (GILLI, MARÍA INÉS, SEQUEIRA, MARÍA 1999. 43)

7. CONCLUSIONES

- La sensibilidad del Gene Xpert MTB/RIF fue de 90.74% y la especificidad de 100% mostrando ser una prueba altamente confiable para el diagnóstico temprano de tuberculosis.
- El valor predictivo positivo de Gene Xpert MTB/RIF fue de 100%, reportando el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en todas las muestras en las que estaba presente.
- La sensibilidad del medio sólido de Löwenstein Jensen fue de 59.25%, una sensibilidad baja si consideramos que en nuestro país esta prueba es utilizada como “Gold Standar”.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso del Gene Xpert MTB/RIF únicamente como prueba de cribado ya que ha mostrado un mayor rendimiento en el diagnóstico temprano de TB, pero no en el monitoreo de la enfermedad.
- Para evaluar la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica; se recomienda seleccionar adecuadamente el método de referencia, para obtener datos con mayor veracidad.
- Se recomienda al ministerio de salud agregara los medios de cultivo sólidos un tubo de M-GIT en muestras de pacientes inmunocomprometidos o con BK negativasque necesitan un rápido diagnóstico para aumentar la sensibilidadde un 14.9% hasta un18.1%; reduciendo el tiempo de espera de resultados, tipificación y prueba se susceptibilidad a antibióticos.

9. Referencias

1. ABRAIRA V. "El índice de kappa" Unidad de bioestadística Clínica, Hospital Ramón y Cajal. Madrid. www.elsevier.es/es-revista-semergen-medicina-familia-40-articulo-el-indice-kappa-S113835930173955X.
2. ARGUETA, JOSÉ ALBERTO, 2015. Metodología de la investigación. Guía para abordar los problemas de salud, Ciudad universitaria, El Salvador. Páginas. 54-57.
3. Barriga, Angulo "Evaluación de la prueba Gene Xpert MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la resistencia a rifampicina en muestras extrapulmonares" 2014. www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt143d.pdf.
4. CEPHEID Indira Soundiram, 2012 "Xpert MTB/RIF Training". www.molecular-tb.org/gb/pdf/ppt/14_SYMP_ISoundiram_Xperttraining_2902.pdf
5. CEPHEID Innovation, "Xpert MTB/RIF" www.cepheid.com/manageddownloads/xpert-mtb-rif-english-package-insert-301-1404-rev-b-february-2015.pdf
6. Coros. A, De Conno. E, 2002 New York IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Insertion Sequence, Is Also Present in the Genome of *Mycobacterium smegmatis*, Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2347380/.
7. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA. 2014. Programa y manual de prácticas de laboratorio. Diagnostico Bacteriológico. Pág. 99, 111-113, 115-117.
8. ELMER W. KONEMAN. 1999. Diagnostico Microbiológico 5^{ta} edición. Editorial Médica Panamericana. Cap. 17.
9. Fontalvo D, Gómez D. Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. MÉD.UIS. 2015, www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a04.pdf.
10. GERALD KARP. 2005. Biología celular y molecular conceptos y experimentos 4^{ta} edición. Cap. 18.
11. JAWETZ MCLNICK Y ADELBERG. 2011. Microbiología Médica principios y aplicaciones. 25 ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Capítulo 23. Pág. 289, 291, 292, 294 y 295.

12. MANTERORA D. CARLOS, "Como interpretar un artículo sobre pruebas diagnósticas". http://paginas.facmed.unam.mx/deptos/sp/wp-content/uploads/2015/11/U10_compl_manterolac_epiclin.pdf
13. ORGANIZACIÓN MUNDIAL PARA LA SALUD, "Hoja de ruta para incorporar el Xpert MTB/RIF como método de diagnóstico rápido de la tuberculosis y la tuberculosis multirresistente 2010". www1.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Hoja-Ruta-Introduccion-Xpert-MTB-RIF.pdf
14. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2008. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2. Cultivo. Pág. 38, 39, 50, 51, 55-64.
15. TERAN ROMMY, H. de Waard Jacobus, "Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico".
16. Vallejo V. Patricio, Rodriguez D. Juan Carlos. "Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnostic de tuberculosis. 2015. www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482015000200010. www.ifcc.org/media/334117/eJIFCC2015Vol26No4pp310-325.pdf.

ANEXO 1

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE GENE XPERT MTB/RIF

Resultados	Interpretación
<i>M. TUBERCULOSIS</i> (MTB) RESISTENTE A RIFAMPICINA (RIF) DETECTADO.	<ul style="list-style-type: none">• Se ha detectado el <i>M. tuberculosis</i> dentro de la muestra y se ha detectado una mutación en el gen <i>rpoB</i>.• SPC (no aplicable) una señal de CCP no es necesario porque la amplificación MTB puede competir con éste control.• Comprobación de sonda (CC1 Y CC2): Pass, todos los resultados de comprobación de la sonda pasan.
MTB DETECTADO; LA RESISTENCIA A RIF NO SE DETECTA.	<ul style="list-style-type: none">• Se ha detectado el <i>M. tuberculosis</i> dentro de la muestra y NO se ha detectado una mutación en el gen <i>rpoB</i>.• SPC (no aplicable) una señal de CCP no es necesario porque la amplificación MTB puede competir con éste control.• Comprobación de sonda (CC1 Y CC2): Pass, todos los resultados de comprobación de la sonda pasan.
MTB DETECTADO; RESISTENCIA RIF INDETERMINADO.	<ul style="list-style-type: none">• Se ha detectado el <i>M. tuberculosis</i> dentro de la muestra, pero una mutación en el gen <i>rpoB</i> no se pudo determinar debido a la detección de señal insuficiente.• SPC (no aplicable) una señal de CCP no es necesario porque la amplificación MTB puede competir con éste control.

	<ul style="list-style-type: none"> Comprobación de sonda (CC1 Y CC2): Pass, todos los resultados de comprobación de la sonda pasan.
MTB NO DETECTADO	<ul style="list-style-type: none"> No se ha detectado el <i>M. tuberculosis</i> dentro de la muestra. SPC: PASS. El SPC se reunió con los criterios de aceptación. Comprobación de sonda (CC1 Y CC2): Pass, todos los resultados de comprobación de la sonda pasan.
INVÁLIDO	<ul style="list-style-type: none"> La presencia o ausencia de <i>M. tuberculosis</i> no se puede determinar. El SPC, no cumple con los criterios de aceptación, la muestra no se ha procesado correctamente, o la PCR fue inhibida. REPITA LA PRUEBA. SPC: FALLO. El resultado de MTB es negativo, y el SPC Ct no está dentro del rango válido. Comprobación de sonda (CC1 y CC2): PASS. Todos los resultados de la comprobación de la sonda pasan.
ERROR	<ul style="list-style-type: none"> La presencia o ausencia de <i>M. tuberculosis</i> no se puede determinar. Repita la prueba. MTB: Ningún resultado SPC: Ningún resultado Comprobación de sonda (CC1 y CC2): FALLO. Error de comprobación de sonda puede ser la fuente de error, pero otros errores como el fallo de un componente del sistema puede ocurrir incluso si pasa la verificación de sensores.

SIN RESULTADOS	<ul style="list-style-type: none"> • La presencia o ausencia de <i>M. tuberculosis</i> no se puede determinar. Repita la prueba. • Resultado indica que se recogieron datos insuficientes. Por ejemplo, el operador detiene una prueba que estaba en curso. • MTB: Ningún resultado • SPC: Ningún resultado • comprobación de sonda (CC1 y CC2): NA (no aplicable)

ANEXO 2

Resultados de Gene Xpert MTB/RIF y Cultivo de LJ de muestras pulmonares realizadas en el Laboratorio Nacional de Referencia "Dr. Max Bloch" en el 2013

	Resultado GeneXpert	Resultado de Cultivo de LJ
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo
5	Negativo	1 colonia
6	Negativo	Negativo
7	Invalido	Negativo
8	Negativo	Negativo
9	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
10	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo
13	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
14	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo
26	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
27	Negativo	Negativo
28	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
29	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo

36	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo
40	Negativo	1 colonia
41	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo
52	Negativo	Negativo
53	Negativo	Negativo
54	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo ++
55	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo
57	Negativo	Positivo +
58	Negativo	Negativo
59	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
60	Negativo	Negativo
61	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo
65	Negativo	Positivo ++
66	Negativo	Negativo
67	Negativo	Negativo
68	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
69	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo
71	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
72	Negativo	Negativo
73	Negativo	Negativo
74	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
75	Negativo	Negativo
76	Negativo	Negativo

77	Negativo	Negativo
78	Negativo	Negativo
79	Negativo	Negativo
80	Negativo	Negativo
81	Negativo	Negativo
82	Negativo	Negativo
83	M. Tb Sensible a Rif.	15 colonias
84	Negativo	Negativo
85	Negativo	Negativo
86	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
87	Negativo	Negativo
88	Negativo	Negativo
89	Negativo	Negativo
90	Negativo	Negativo
91	Negativo	Negativo
92	Negativo	Negativo
93	Negativo	Negativo
94	Negativo	Negativo
95	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
96	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
97	Negativo	Negativo
98	Negativo	Negativo
99	Negativo	Negativo
100	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
101	Negativo	Negativo
102	Negativo	Negativo
103	Negativo	Negativo
104	Negativo	Negativo
105	Negativo	Negativo
106	Negativo	Negativo
107	Negativo	Negativo
108	M. Tb Sensible a Rif.	3 colonias
109	Negativo	Negativo
110	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
111	Negativo	Negativo
112	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
113	Negativo	Negativo
114	Negativo	Negativo
115	Negativo	Negativo
116	Negativo	Negativo
117	Negativo	Negativo

118	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
119	Negativo	Negativo
120	Negativo	Negativo
121	Negativo	Negativo
122	Negativo	Negativo
123	Negativo	Negativo
124	M. Tb Resistente a Rif.	11 colonias
125	M. Tb Sensible a Rif.	9 colonias
126	Negativo	Negativo
127	Negativo	Negativo
128	Negativo	Negativo
129	Negativo	Negativo
130	Negativo	Negativo
131	Negativo	Negativo
132	Negativo	Negativo
133	M. Tb Sensible a Rif.	9 colonias
134	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
135	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
136	M. Tb Sensible a Rif.	3 colonias
137	Negativo	Negativo
138	Negativo	Negativo
139	Negativo	Negativo
140	Negativo	Negativo
141	M. Tb Sensible a Rif.	5 colonias
142	Negativo	Negativo
143	Negativo	Negativo
144	Negativo	Negativo
145	Negativo	Negativo
146	Negativo	Negativo
147	Negativo	Negativo
148	Negativo	Negativo
149	Negativo	Negativo
150	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo ++
151	Negativo	Negativo
152	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
153	Negativo	Negativo
154	Negativo	Negativo
155	Negativo	Negativo
156	M. Tb Sensible a Rif.	4 colonias
157	Negativo	Negativo
158	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++

159	Negativo	Negativo
160	Negativo	Negativo
161	Negativo	Negativo
162	Negativo	Negativo
163	Negativo	Negativo
164	Negativo	Negativo
165	Negativo	Negativo
166	Negativo	Negativo
167	Negativo	Negativo
168	Negativo	Negativo
169	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
170	Negativo	Negativo
171	Negativo	Negativo
172	Negativo	Negativo
173	Negativo	Negativo
174	Negativo	Negativo
175	Negativo	Negativo
176	Negativo	Negativo
177	Negativo	Negativo
178	Negativo	Negativo
179	Negativo	Negativo
180	Negativo	Negativo
181	Negativo	Negativo
182	Negativo	Negativo
183	Negativo	Negativo
184	Negativo	Negativo
185	Negativo	Negativo
186	Negativo	Negativo
187	Negativo	Negativo
188	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
189	Negativo	Negativo
190	Negativo	Negativo
191	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
192	Negativo	Negativo
193	Negativo	Negativo
194	Negativo	Negativo
195	Negativo	Negativo
196	Negativo	Negativo
197	Negativo	Negativo
198	Negativo	Negativo
199	Negativo	Negativo

200	Negativo	Negativo
201	Negativo	Negativo
202	Negativo	Negativo
203	Negativo	Negativo
204	Negativo	Negativo
205	Negativo	Negativo
206	Negativo	Negativo
207	Negativo	Negativo
208	Negativo	Negativo
209	Negativo	Negativo
210	Negativo	Negativo
211	Negativo	Negativo
212	Negativo	Negativo
213	Negativo	Negativo
214	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
215	Negativo	Negativo
216	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
217	Negativo	Negativo
218	Negativo	Negativo
219	M. Tb Sensible a Rif.	1 colonia
220	Negativo	Negativo
221	Negativo	Negativo
222	M. Tb Resistente a Rif.	Negativo
223	Negativo	Positivo +
224	Negativo	Negativo
225	Negativo	Negativo
226	Negativo	Negativo
227	Negativo	Negativo
228	Negativo	Negativo
229	Negativo	Negativo
230	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
231	Negativo	Negativo
232	M. Tb Sensible a Rif.	18 colonias
233	M. Tb Sensible a Rif.	2 colonias
234	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
235	Negativo	Negativo
236	Negativo	Negativo
237	Negativo	Negativo
238	Negativo	Negativo
239	Negativo	Negativo
240	Negativo	Negativo

241	Negativo	Negativo
242	Negativo	Negativo
243	Negativo	Negativo
244	Negativo	Negativo
245	Negativo	Negativo
246	Negativo	Negativo
247	Negativo	Negativo
248	Negativo	Negativo
249	Negativo	Negativo
250	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
251	Negativo	Negativo
252	Negativo	Negativo
253	Negativo	Negativo
254	Negativo	Negativo
255	Negativo	Negativo
256	Negativo	Negativo
257	Negativo	Negativo
258	Negativo	Negativo
259	Negativo	Negativo
260	Negativo	Negativo
261	Negativo	Negativo
262	Negativo	Negativo
263	Negativo	Negativo
264	Negativo	Negativo
265	Negativo	Negativo
266	Negativo	Negativo
267	Negativo	Negativo
268	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
269	Negativo	Negativo
270	Negativo	Negativo
271	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
272	Negativo	Negativo
273	Negativo	Negativo
274	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
275	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
276	Negativo	Negativo
277	Negativo	Negativo
278	Negativo	Negativo
279	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
280	Negativo	Negativo
281	Negativo	Negativo

282	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
283	Negativo	Negativo
284	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
285	Negativo	3 colonias
286	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
287	Negativo	Negativo
288	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
289	Negativo	Negativo
290	Negativo	Negativo
291	Negativo	Negativo
292	Negativo	Negativo
293	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
294	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
295	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
296	Negativo	Positivo +
297	Negativo	Negativo
298	M. Tb Resistente a Rif.	Positivo +
299	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
300	Negativo	Negativo
301	Negativo	Negativo
302	Negativo	Negativo
303	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
304	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
305	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
306	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
307	Negativo	Negativo
308	Negativo	Negativo
309	Negativo	Negativo
310	Negativo	Negativo
311	Negativo	Negativo
312	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
313	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
314	Negativo	Negativo
315	Negativo	Negativo
316	Negativo	Negativo
317	Negativo	Negativo
318	Negativo	Negativo
319	Negativo	Negativo
320	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
321	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
322	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +

323	Negativo	Negativo
324	Negativo	Negativo
325	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
326	Negativo	Negativo
327	Negativo	Negativo
328	Negativo	Negativo
329	Negativo	Negativo
330	Negativo	Negativo
331	Negativo	Negativo
332	Negativo	Negativo
333	Negativo	Negativo
334	Negativo	Negativo
335	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
336	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
337	Negativo	Negativo
338	Negativo	Negativo
339	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
340	Negativo	Negativo
341	Negativo	Negativo
342	Negativo	Negativo
343	Negativo	Negativo
344	Negativo	Negativo
345	Negativo	Negativo
346	Negativo	Negativo
347	Negativo	Positivo +++
348	Negativo	Negativo
349	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
350	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
351	Negativo	Negativo
352	Negativo	Negativo
353	Negativo	Negativo
354	Negativo	Negativo
355	Negativo	positivo ++
356	Negativo	Negativo
357	Negativo	Negativo
358	Negativo	Negativo
359	Negativo	Negativo
360	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
361	Negativo	Negativo
362	M. Tb Sensible a Rif.	16 colonias
363	Negativo	Negativo

364	Negativo	Negativo
365	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
366	M. Tb Sensible a Rif.	positivo ++
367	Negativo	Negativo
368	Negativo	Negativo
369	Negativo	Negativo
370	Negativo	Negativo
371	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +++
372	Negativo	Negativo
373	Negativo	Negativo
374	Negativo	Negativo
375	Negativo	Negativo
376	Negativo	Negativo
377	Negativo	Negativo
378	Negativo	Negativo
379	Negativo	Negativo
380	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +++
381	Negativo	Negativo
382	M. Tb Resistente a Rif.	Negativo
383	Negativo	Negativo
384	Negativo	Negativo
385	Negativo	Negativo
386	Negativo	Negativo
387	Negativo	Negativo
388	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +
389	M. Tb Sensible a Rif.	4 colonias
390	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +++
391	Negativo	Negativo
392	Negativo	Negativo
393	Negativo	Negativo
394	Negativo	Negativo
395	Negativo	Negativo
396	Negativo	Negativo
397	Negativo	Negativo
398	Negativo	Negativo
399	Negativo	Negativo
400	Negativo	Negativo
401	Negativo	Negativo
402	Negativo	Negativo
403	Negativo	Negativo
404	Negativo	Negativo

405	Negativo	Negativo
406	Negativo	Negativo
407	Negativo	Negativo
408	Negativo	Negativo
409	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
410	Negativo	Negativo
411	Negativo	Negativo
412	Negativo	Negativo
413	Negativo	Negativo
414	M. Tb Sensible a Rif.	positivo ++
415	Negativo	Negativo
416	Negativo	Negativo
417	Negativo	Negativo
418	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +
419	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +
420	Negativo	Negativo
421	Negativo	Negativo
422	Negativo	Negativo
423	Negativo	Negativo
424	Negativo	Negativo
425	Negativo	Negativo
426	Negativo	Negativo
427	Negativo	Negativo
428	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
429	Negativo	Negativo
430	Negativo	Negativo
431	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +
432	Negativo	Negativo
433	Negativo	Negativo
434	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
435	M. Tb detectdado Resistencia a Rif Indeterminada	3 colonias
436	Negativo	Negativo
437	Negativo	Negativo
438	Negativo	Negativo
439	Negativo	Negativo
440	Negativo	Negativo
441	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
442	M. Tb Sensible a Rif.	positivo +++
443	Negativo	Negativo
444	Negativo	Negativo

445	Negativo	Negativo
446	Negativo	Negativo
447	Negativo	Negativo
448	Negativo	Negativo
449	Negativo	Negativo
450	Negativo	Negativo
451	Negativo	Negativo
452	Negativo	Negativo
453	Negativo	Negativo
454	Negativo	Negativo
455	Negativo	Negativo
456	Negativo	Negativo
457	Negativo	Negativo
458	Negativo	Negativo
459	Negativo	Negativo
460	Negativo	Negativo
461	Negativo	Negativo
462	M. Tb Sensible a Rif.	Negativo
463	Negativo	Negativo
464	Negativo	Negativo
465	Negativo	Negativo
466	Negativo	Negativo
467	Negativo	Negativo
468	Negativo	Negativo
469	Negativo	Negativo
470	Negativo	Negativo
471	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +
472	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
473	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo ++
474	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo ++
475	Negativo	Positivo +
476	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++
477	M. Tb Sensible a Rif.	6 colonias
478	M. Tb Sensible a Rif.	Positivo +++