

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**



**Técnicas de biología molecular aplicadas en el diagnóstico de
Mycobacterium tuberculosis en El Salvador, en el mes de
julio de 2023**

Ensayo presentado por:

Erick Ernesto Hernandez Delgado HD12004

Para optar el grado de:

Licenciado en laboratorio clínico

Asesor:

Licda. Yeni Elizabeth Paz Romero

Ciudad Universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, El Salvador, Septiembre, 2023

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Msc. Roger Armando Arias

Vicerrector Académico

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López

Vicerrector Administrativo

Ing. Juan Rosa Quintanilla

Secretario/a General

Ing. Francisco Antonio Alarcón

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**

Autoridades de la facultad de medicina

Decana

MsC. Josefina Sibrián de Rodríguez

Vicedecano

Dr. Saúl Díaz Peña

Secretaria

MsC. Aura Marina Miranda de Arce

Director de Escuela

MsC. José Eduardo Zepeda Avelino

Directora de Carrera

MPH. Astrid Violeta Villalobos Velásquez

Contenido

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.....	ii
AUTORIDADES DE FACULTAD DE MEDICINA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	viii
DESARROLLO.....	1
CONCLUSIONES.....	17
FUENTES DE INFORMACIÓN.....	18

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios en primer lugar, por nunca abandonarme en este camino, por darme fortaleza y paciencia para finalizar con éxitos mis estudios.

A mi mamá Ana María Delgado Chávez, por haberme apoyado en este largo viaje sé que sin ti no lo hubiese logrado has sido mi fuerza mi motor para salir adelante te amo eres lo más especial en mi vida.

A mi esposa Arely del Carmen Flores de Hernandez por estar conmigo en las buenas y en las malas brindándome tu amor comprensión y apoyo.

A mis hermanos y familia, porque de una u otra manera siempre han estado para mí, para apoyarme y confortarme en momentos de angustia.

A mis compañeros, que me apoyaron y brindaron ánimos para seguir adelante con la mentalidad positiva que todo es un proceso y que lograríamos cumplir nuestras metas.

Resumen

En la infección producida por *Mycobacterium tuberculosis*, la evolución clínica es variable, un paciente con tuberculosis puede presentar sintomatología clínica o no presentar síntomas por lo que es importante lograr un rápido y correcto diagnóstico de la enfermedad, lo que hace necesario implementar nuevas herramientas diagnósticas.

En el presente ensayo se dio a conocer como a sido la evolución de las diferentes técnicas en el diagnóstico de la tuberculosis través del tiempo hasta llegar a técnicas diagnósticas establecidas actualmente; como la baciloscopía (BK) y cultivo en Löwenstein-Jensen (L-J), frente a la técnica de biología molecular GeneXpert MTB/RIF importante herramienta diagnóstica que permite detectar la sensibilidad y/o resistencia a la Rifampicina, para demostrar su aplicabilidad diagnóstica a partir de muestras clínicas.

Las técnicas de biología molecular se basan en el principio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real que permiten amplificar, detectar y secuenciar los ácidos nucleicos (ADN o ARN en función de la sospecha clínica) y establece un diagnóstico fiable, de calidad y en menor tiempo, a la vez que permiten la monitorización de la enfermedad, establecer su pronóstico y mejorar la calidad de vida.

En El Salvador la biología molecular para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* brinda una herramienta diagnóstica que permite determinar de forma rápida pacientes paucibacilares o con infección latente de tuberculosis y dar tratamiento oportuno y eficaz para mejorar la calidad de vida de la población salvadoreña.

Palabras clave

Biología molecular, Técnicas, Diagnóstico, Tuberculosis, GeneXpert, PCR tiempo real

Abstract

In the infection produced by *Mycobacterium tuberculosis*, the clinical evolution is variable, a patient with tuberculosis can present clinical symptoms or not present symptoms, so it is important to achieve a rapid and correct diagnosis of the disease, which makes it necessary to implement new diagnostic tools.

In the present essay, the evolution of the different techniques in the diagnosis of tuberculosis over time until arriving at currently established diagnostic techniques was disclosed; such as bacilloscopy (BK) and culture in Löwenstein-Jensen (L-J), compared to the molecular biology technique GeneXpert MTB/RIF, an important diagnostic tool that allows detection of sensitivity and/or resistance to Rifampicin, to demonstrate its diagnostic applicability from of clinical samples.

Molecular biology techniques are based on the principle of polymerase chain reaction in real time, which allow the amplification, detection and sequencing of nucleic acids (DNA or RNA depending on clinical suspicion) and establishes a reliable, quality diagnosis. and in less time, while allowing monitoring of the disease, establishing its prognosis and improving quality of life.

In El Salvador, molecular biology for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* provides a diagnostic tool that makes it possible to quickly determine paucibacillary patients or patients with latent tuberculosis infection and provide timely and effective treatment to improve the quality of life of the Salvadoran population.

Keywords

Molecular biology, Techniques, Diagnostics, Tuberculosis, GeneXpert, Real-time PCR

Introducción

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad en el mundo. La pandemia de COVID-19 y las desigualdades socioeconómicas, han revertido años de progreso en la lucha contra la tuberculosis y han aumentado el número de infecciones, especialmente en los más vulnerables.

A nivel mundial, en 2021, se estimaron que 10,6 millones de personas se enfermaron de tuberculosis, y 1,6 millones fallecieron por esta causa; de ellas, 187,000 tenían coinfección con el VIH.

En las Américas, en 2021, se estimaron 309,000 casos de tuberculosis se notificaron 215,116 (70%), Las muertes estimadas para la región fueron 32,000, de las cuales el 11% (9,000) correspondieron a la coinfección por TB/VIH. Se diagnosticó 4,820 casos de TB-RR/MDR. De estos, el 95% inició tratamiento.

La Organización Panamericana de la Salud en el 2020, reportó para El Salvador una tasa de 31 nuevos casos de tuberculosis por 100,000 habitantes en El Salvador.

Para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, durante mucho tiempo, ha sido utilizada la microscopía de frotis y las técnicas de cultivo convencionales, este último como prueba confirmatoria, sin embargo la microscopia carece de características para el rendimiento diagnóstico y dificultades para lograr resultados de calidad en cuanto a las factores de preparación, tinción y experticia analítica, mientras tanto, las técnicas de cultivo sólido, cuenta con la limitación del tiempo de respuesta que dura varias semanas, también se han desarrollado cultivos en medio líquido para la detección temprana de Tuberculosis, alcanzando un tiempo de respuesta aproximadamente de 21 días, lo que aun, sigue resultando un tiempo demorado para obtener un

diagnóstico confirmatorio de tuberculosis y contribuye al aumento en la morbilidad y la mortalidad, además predisponen a la resistencia secundaria y pueden promover la transmisión de cepas resistentes.

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) se trata de otra posible metodología utilizada en la identificación de microorganismos basada en la amplificación del ADN a una única temperatura, usando una polimerasa muy activa y haciendo que sea una técnica muy rápida. Permite detectar genes relacionados con resistencia a antimicrobianos en menos de media hora con una sensibilidad y especificidad muy alta.

La prueba semicuantitativa GeneXpert MTB/RIF de diagnóstico in vitro que detecta componentes del genoma del *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y resistencia a rifampicina (RIF) se realiza de forma automatizada, purificando y amplificando ácidos nucleicos, identificando la secuencia diana a través de ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), ambas en tiempo real. Esta prueba contiene cebadores que amplifican una porción del gen *rpoB* y sondas que distinguen la secuencia mutada asociada a la resistencia a rifampicina con resultados en dos horas.

Se necesita de un instrumento que contiene un ordenador personal y software precargado para realizar las pruebas y ver los resultados (MTB detectado o no detectado, RIF resistencia detectada, indeterminada o no detectada), así como un cartucho autónomo desechable de un solo uso que contienen los reactivos RT-PCR y PCR.

En los últimos años, esta prueba de biología molecular se ha convertido en una gran herramienta para el diagnóstico de tuberculosis con resultados en corto tiempo, con gran utilidad en pacientes que presentan una baja carga bacilar en las muestras para la lectura de un frotis teñido con Zielh Neelsen (baciloscopía), que pueden reportarse negativas y posterior a 60 días positivas en el cultivo Löwenstein Jensen. Aunque la baciloscopía representa una prueba de menor costo que

también brinda resultados inmediatos requiere de personal altamente capacitado para su lectura, lo que finalmente demanda inversión.

El fabricante de la prueba GeneXpert MTB/RIF describen su rendimiento con sensibilidad del 76,1 % y una especificidad del 98,8 % frente al cultivo Löwenstein Jensen con baciloscopia negativa.

Desarrollo

La Tuberculosis tiene una historia tan larga como la misma humanidad, siendo causante de varias crisis sanitarias a través de los tiempos; sin embargo, también ha sido gran partícipe de los grandes cambios que ha habido en la historia de la Medicina.

Orígenes – Edad Antigua

En Grecia, Hipócrates crea el concepto de “*tisis*” el cual comprendía un proceso clínico de tos, hemoptisis, caquexia, etc. Debido a que los discípulos de Hipócrates tenían la teoría que la misma naturaleza se encarga del proceso de curación, ellos recomendaban a los pacientes con Tuberculosis un descanso obligatorio, evitar cualquier exceso y una dieta sana, la cual varias veces incluía el consumo de lácteos, ya que se creía que era un remedio específico contra la Tuberculosis.

Edad Media

Los registros de esta época no son lo suficientemente buenos para poder tener información sobre tuberculosis en la Edad Media, sin embargo, estudios arqueológicos demuestran la evidencia de tuberculosis ósea. Es en esta época en que se populariza el “toque del Rey”: aparentemente era muy común en Europa la escrófula (Tuberculosis ganglionar en ganglios cervicales) y la creencia era que, si el rey tocaba con su mano la escrófula, esta se curaba: produciendo que hubiera momentos en que la labor del rey se veía agobiada de filas interminables de pacientes en busca de la cura.

Renacimiento y Revolución Industrial

Es en esta época en que la Tuberculosis comienza a ser una de las causas más importantes de muerte (los casos en Londres probablemente alcanzaron 1,000 -1,250/100,000 casos por año). Algo que también influyó fue el “estatus” adquirido con la enfermedad: se “romantizó”. Se creía

que era la enfermedad de los artistas y literatos (Gorki, Chopin, Paganini, entre otros), y ha sido referenciada en obras como “Las Damas de las Camelias” de Alejandro Dumas hijo y en “La Boheme” de Puccini. Asimismo, la migración de la gente del campo a la ciudad en busca de trabajo, creando problemas de vivienda y malas condiciones de vida en la época de la revolución industrial, favoreció a que la Tuberculosis se vuelva en un problema de Salud Pública.

Época moderna

En 1816, Rene Laennec comenzó a trabajar en el Hospital de Necker como médico; tuvo un encuentro temprano con la Tuberculosis debido a que su madre murió cuando la tenía 5 años de edad. Durante su trabajo en el Hospital, Laennec encuentra que el escuchar los sonidos de los órganos (como la respiración) permitía discernir entre salud y enfermedad: gracias a este descubrimiento el crea el estetoscopio, herramienta indispensable en el manejo de la Tuberculosis. Laennec publica los resultados de su observación en 1819 “*Traite de l'auscultation mediate et des maladies des poumons et des coeur* “.

Roberto Koch identifica al *M. tuberculosis* realizando experimentos sacando muestras de pacientes con Tuberculosis, las cuales cultivo y las inyecto en conejos, para luego sacar nuevamente muestras de estos conejos y hacer cultivos donde recupera el *M. tuberculosis*. Koch presenta sus hallazgos en Sociedad Fisiológica de Berlín el 24 de marzo de 1882 en una ponencia que titula *Über Tuberculose*. Cien años después, se realiza en la misma fecha el primer día mundial de la Tuberculosis, auspiciado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias (UNION).

En 1895, Conrad Röntgen descubre los rayos X, brindando una opción más para el diagnóstico de la Tuberculosis, llegándose a usar durante la Segunda Guerra Mundial como método de

“screening” o “búsqueda” de Tuberculosis en las tropas. Sin embargo, con el tiempo se encontró que no es costo-efectivo este tipo de evaluación.

Vacuna Bacillus Calmette-Guerín (BCG)

La preparación inicialmente se comenzó a preparar en 1908 en base al *Mycobacterium bovis* (aislado por Nocard en 1902). Esta preparación consistía en tomar una cepa virulenta del *Mycobacterium bovis* y pasarla a través de varios medios durante varias semanas para atenuar su virulencia. Finalmente, la primera administración se realiza en un recién nacido que no desarrolla tuberculosis posteriormente en 1921. La cepa atenuada usada fue de *Mycobacterium bovis* en el Instituto Pauster en Lille- Francia, en un trabajo realizado por Albert Calmette y Camille Guérin (debido a esto se usa el nombre de BCG).

La quimioterapia antituberculosa

La sulfanilamida fue la primera sulfamida utilizada en la enfermedad, pero ni ella ni otras más complejas lograban atravesar la pared del bacilo de Koch, al igual que ocurrió con la penicilina. El primer antibiótico eficaz fue la estreptomicina en 1946. Su administración por vía intramuscular negativizaba la baciloscopia del esputo, mejoraba las imágenes radiológicas y hacía desaparecer los signos generales de la enfermedad, pero pronto comenzó a mostrar efectos secundarios como su acción tóxica sobre el nervio auditivo y la aparición de gérmenes resistentes. Ese mismo año de 1946 se publicaron los resultados positivos de la utilización del ácido para amino salicílico, para poco después comprobarse que su administración conjunta con la estreptomicina retrasaba o impedía la aparición de resistencias. Faltaba sin embargo un remedio que además de eficaz fuera barato, fácil de administrar y sin efectos secundarios. Ello se consiguió en buena medida con la isoniacida, que pasó a administrarse conjuntamente con los dos anteriores en 1955. Tres años después se comprobó también el valor profiláctico de la isoniacida, por lo que por fin se hizo

realidad el control eficaz de la tuberculosis. Entre 1950 y 1960 el uso de los tuberculostáticos se hizo general, con una caída brusca de la tasa de mortalidad y de la aparición de casos nuevos.

En los años siguientes continuó la búsqueda de nuevos fármacos, siendo el etambutol y la rifampicina los que mejores resultados obtuvieron. Todas estas mejoras llevaron a un descenso tan grande de la enfermedad que se llegó a pensar en la década de los setenta en su eventual erradicación. La aparición del SIDA a comienzos de los ochenta truncó estas esperanzas y la asociación de ambas enfermedades se convirtió en habitual.

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad en el mundo. La pandemia de COVID-19 y las desigualdades socioeconómicas, han revertido años de progreso en la lucha contra la tuberculosis y han aumentado el número de infecciones, especialmente en los más vulnerables.

A nivel mundial, en 2021, se estimaron que 10,6 millones de personas se enfermaron de tuberculosis, y 1,6 millones fallecieron por esta causa; de ellas, 187,000 tenían coinfección con el VIH.

En las Américas, en 2021, se estimaron 309,000 casos de tuberculosis se notificaron 215,116 (70%), Las muertes estimadas para la región fueron 32,000, de las cuales el 11% (9,000) correspondieron a la coinfección por TB/VIH. Se diagnosticó 4,820 casos de TB-RR/MDR. De estos, el 95% inició tratamiento.

La Organización Panamericana de la Salud en el 2020, reportó para El Salvador una tasa de 31 nuevos casos de tuberculosis por 100,000 habitantes en El Salvador.

Las muertes atribuidas a tuberculosis comprenden los fallos en el sistema de salud de cualquier país, debido a que, los medicamentos contra las tuberculosis disponibles ampliamente, poseen tasas de curación de hasta un 90%, para mejorar esta condición en el sistema de salud, como primer desafío en el diagnóstico de la tuberculosis, es contar con las metodologías que permitan la confirmación de la enfermedad de forma oportuna y precisa para iniciar el tratamiento de forma temprana.

Para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, durante mucho tiempo, ha sido utilizada la microscopía de frotis y las técnicas de cultivo convencionales, este último como prueba confirmatoria, sin embargo la microscopia carece de características para el rendimiento diagnóstico y dificultades para lograr resultados de calidad en cuanto a las factores de preparación, tinción y experticia analítica, mientras tanto, las técnicas de cultivo sólido, cuenta con la limitación del tiempo de respuesta que dura varias semanas, también se han desarrollado cultivos en medio líquido para la detección temprana de Tuberculosis, alcanzando un tiempo de respuesta aproximadamente de 21 días, lo que aun, sigue resultando un tiempo demorado para obtener un diagnóstico confirmatorio de tuberculosis y contribuye al aumento en la morbilidad y la mortalidad, además predisponen a la resistencia secundaria y pueden promover la transmisión de cepas resistentes.

Obtención de muestras

1. Por esputo espontáneo: la obtención del esputo por este medio se limita habitualmente a personas mayores de diez años, sin embargo, si un niño menor de esa edad puede dar la muestra, deberá recolectarse. La muestra se debe recolectar preferentemente por la mañana y remitirla al laboratorio.

2. Por esputo inducido: es muy utilizada en la niñez desde los seis años de edad y a veces en menores de esa edad, con sospecha de TB pulmonar, es recomendada para el diagnóstico microbiológico; también se debe utilizar en adultos con alta sospecha de TB y que no pueden expectorar. Una muestra puede ser suficiente ya que el rendimiento de esputo inducido es similar al de tres lavados gástricos. Este procedimiento es bien tolerado, pero pueden presentar efectos colaterales menores, como el incremento de tos, epistaxis, vómito o dificultad respiratoria.
3. Por aspirado gástrico: método recomendado para recuperar del estómago las secreciones respiratorias que han sido deglutidas por pacientes pediátricos que no pueden expectorar. Debe realizarse con el paciente hospitalizado, para garantizar mejor calidad de la muestra y lograr elevar la eficacia del diagnóstico por este método. La muestra debe ser en forma seriada durante dos días consecutivos.
4. Por fibrobroncoscopía: En esta técnica se obtienen muestras de lavado y cepillado bronquial o biopsias bronquiales para procesar estudios bacteriológicos e histológicos.

Técnica de biología molecular

- LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

se trata de otra posible metodología utilizada en la identificación de microorganismos basada en la amplificación del ADN a una única temperatura, usando una polimerasa muy activa y haciendo que sea una técnica muy rápida. Permite detectar genes relacionados con resistencia a antimicrobianos en menos de media hora con una sensibilidad y especificidad muy alta, actualmente no se realiza en el salvador.

- GeneXpert

Los sistemas del instrumento GeneXpert automatizan e integran el procesamiento de muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de las secuencias diana en muestras simples o complejas mediante ensayos de PCR con transcriptasa inversa y de PCR en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal, un lector de códigos de barras y un software precargado para la realización de pruebas con las muestras recogidas y la visualización de los resultados. El sistema requiere el uso de cartuchos GeneXpert desechables de un solo uso para albergar los reactivos y el realizar proceso de PCR. Dado que los cartuchos son independientes, se elimina el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras.

El ensayo Xpert MTB/RIF incluye reactivos para la detección de MTB y la resistencia a RIF, así como un control de procesamiento de muestras (SPC) para controlar el procesamiento adecuado de las bacterias diana y monitorizar la presencia de inhibidores en la reacción PCR. El control de comprobación de la sonda (PCC) comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de las sondas y la estabilidad del fluorocromo.

Los cebadores del ensayo Xpert MTB/RIF amplifican una porción del gen *rpoB* que contiene la región «central» de 81 pares de bases. Las sondas son capaces de distinguir entre la secuencia natural conservada y las mutaciones de la región central que se asocian a la resistencia a RIF.

- **Reactivos e instrumentos**

El kit Xpert MTB/RIF (CGXMTB/RIF-50) contiene reactivos suficientes para procesar 50 muestras de paciente o de control de calidad. El kit Xpert MTB/RIF contiene los elementos siguientes:

1. Cartuchos Xpert MTB/RIF con tubos de reacción integrados (50 por kit)
2. Microesfera 1 y microesfera 2 (liofilizadas): 2 por cada por cartucho

3. Microesfera 3 (liofilizada): 1 por cartucho
4. Reactivo 1: 4,0 ml por cartucho
5. Reactivo 2: 4,0 ml por cartucho
6. Frascos de reactivo para muestras: 50 por kit

Reactivo para muestras

1. Hidróxido de sodio
2. Isopropanol: 8 ml por frasco
3. Pipetas de transferencia desechables: 60 por kit

CD

1. Archivo de definición del ensayo (Assay Definition File, ADF)
2. Instrucciones para importar el ADF en el software
3. Instrucciones de uso (prospecto) 1 por kit

Materiales requeridos, pero no suministrados

1. Sistema GeneXpert Dx o sistema GeneXpert Infinity (el número de catálogo varía según la configuración): instrumento GeneXpert, ordenador, lector de códigos de barras y manual del operador
2. Para el sistema GeneXpert Dx: Software versión 4.0 o superior
3. Para el sistema GeneXpert Infinity-48: Software Xpertise versión 4.3 o superior
4. Para los sistemas GeneXpert Infinity-80 e Infinity-48s: Software Xpertise versión 6.0 o superior

5. Impresora: Si se requiere una impresora, póngase en contacto con el representante de ventas de Cepheid para organizar la compra de una impresora recomendada.
6. Recipientes herméticos y estériles, con tapa de rosca, para recogida de muestras
7. Guantes desechables y protección ocular
8. Etiquetas o rotulador de etiquetas indeleble
9. Pipetas estériles para procesamiento de muestras

Advertencias, precauciones y peligros químicos

1. Trate todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos usados, como posibles agentes transmisores de infecciones. Con frecuencia es imposible saber qué muestras podrían ser infecciosas, por lo que todas las muestras biológicas deben tratarse tomando las precauciones habituales. Las directrices para la manipulación de las muestras están disponibles en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades⁶ y el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio⁷ de Estados Unidos.
2. Utilice guantes protectores desechables, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras y los reactivos. Lávese las manos a fondo tras manipular las muestras y los reactivos de la prueba.
3. Siga los procedimientos de seguridad del centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.
4. No se ha demostrado el rendimiento del ensayo Xpert MTB/RIF para la detección del complejo MTB con muestras no respiratorias, como sangre, LCR, heces u orina. No se ha evaluado el rendimiento del ensayo Xpert MTB/RIF con muestras procesadas mediante métodos diferentes a los descritos en este prospecto.

5. Si se procesa más de una muestra a la vez, abra solo un cartucho; añada la muestra tratada con el reactivo para muestras y cierre la tapa del cartucho antes de procesar la siguiente muestra. Cámbiese los guantes entre una muestra y la siguiente.
6. No abra la tapa del cartucho del ensayo Xpert MTB/RIF, salvo para añadir la muestra tratada.
7. No utilice cartuchos que se hayan caído después de extraerlos del kit.
8. No utilice cartuchos que se hayan caído o agitado, o cuyo contenido se haya derramado, después de añadir la muestra tratada. Si el cartucho se agita o se deja caer después de abrir la tapa, es posible que se obtengan resultados falsos o indeterminados.
9. No utilice cartuchos que parezcan mojados o que tengan el precinto roto.
10. No utilice cartuchos con tubos de reacción dañados.
11. cartucho del ensayo Xpert MTB/RIF se utiliza para procesar una sola prueba. No reutilice los cartuchos procesados.

Procedimiento

- Etiquete cada cartucho Xpert MTB/RIF con la identificación de la muestra. Nota Escriba en los lados del cartucho o pegue una etiqueta de identificación. No ponga la etiqueta en la tapa del cartucho ni cubra el código de barras 2D existente en el cartucho.
- Con una pipeta estéril, transfiera al menos 0,5 ml del gránulo resuspendido total a un tubo cónico con tapón de rosca para el ensayo Xpert MTB/RIF. También puede procesar toda la muestra en el tubo original. +2 °C+8°C.
- Con una pipeta de transferencia, transfiera 1,5 ml de reactivo para muestras del ensayo

Xpert MTB/RIF a los 0,5 ml de sedimento resuspendido.

- Agite enérgicamente 10 a 20 veces o utilice un mezclador vórtex durante 10 segundos como mínimo.
- Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego agite la muestra enérgicamente 10 a 20 veces o utilice un mezclador vórtex durante 10 segundos como mínimo.
- Incube la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos más.

Inicio de la prueba

- Compruebe que se ha importado al software el archivo de definición del ensayo (ADF) del Xpert MTB/RIF. Este
- Importante apartado describe los pasos básicos para realizar la prueba. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el Manual del operador del sistema GeneXpert Dx o el Manual del operador del sistema GeneXpert Infinity.

Nota Los pasos que debe seguir pueden ser diferentes si el administrador del sistema cambió el flujo de trabajo predeterminado del sistema.

Encienda el instrumento GeneXpert:

Si está utilizando el instrumento GeneXpert Dx, encienda primero el instrumento y, a continuación, encienda el ordenador. El software GeneXpert Dx se iniciará automáticamente o podría ser necesario hacer doble clic en el icono de acceso directo del software GeneXpert Dx en el escritorio de Windows®. o

Si está utilizando el instrumento GeneXpert Infinity, ponga en marcha el instrumento. El software GeneXpert se ejecutará automáticamente o podría ser necesario hacer doble clic en el icono de acceso directo del software Xpertise en el escritorio de Windows.

Inicie sesión en el software del sistema del instrumento GeneXpert con su nombre de usuario y su contraseña.

En la ventana del sistema GeneXpert Dx, haga clic en Crear prueba (Create Test) (GeneXpert Dx) o en Solicitudes (Orders) y Solicitar prueba (Order test) (Infinity). Aparecerá la ventana Crear prueba (Create Test).

Escanee o escriba la Id. paciente (Patient ID). Si escribe la Id. paciente (Patient ID), asegúrese de escribirla correctamente. La Id. paciente (Patient ID) se asocia a los resultados de la prueba, y se muestra en la ventana Ver resultados (View Results) y en todos los informes.

Escanee o escriba la Id. muestra (Sample ID). Si escribe la Id. muestra (Sample ID), asegúrese de escribirla correctamente. La Id. muestra (Sample ID) se asocia a los resultados de la prueba, y se muestra en la ventana Ver resultados (View Results) y en todos los informes.

Escanee el código de barras del cartucho Xpert MTB/RIF. El software utiliza la información del código de barras para rellenar automáticamente los cuadros de los campos siguientes: Seleccionar ensayo (Select Assay), Id. del lote (Reagent Lot ID), Numero de serie del cartucho (Cartridge SN) y Fecha de caducidad (Expiration Date).

Haga clic en Iniciar prueba (Start Test) (GeneXpert Dx) o en Enviar (Submit) (Infinity). En el cuadro de diálogo que aparece, introduzca su contraseña, si es necesario.

En el sistema GeneXpert Infinity, coloque el cartucho en la cinta transportadora. El cartucho se cargará automáticamente, se realizará la prueba y el cartucho usado se colocará en el recipiente de residuos.

Para el instrumento GeneXpert Dx:

1. Abra la puerta del módulo del instrumento que tiene la luz verde intermitente y cargue el cartucho.
2. Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la Luz se apaga.
3. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta del módulo antes de abrirla y retirar el cartucho.
4. Los cartuchos usados deben eliminarse en los recipientes de residuos de muestras adecuados, de acuerdo con las prácticas habituales de su centro.

Eliminación de los cartuchos usados

1. Elimine los cartuchos usados en un recipiente para residuos biopeligrosos de laterales duros de acuerdo con las prácticas estándar de su institución.
2. El PCC se considera superado si cumple los criterios de aceptación validados.

Interpretación de los resultados

El sistema del instrumento GeneXpert genera los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y los algoritmos de cálculo integrados. Los resultados pueden verse en la ventana Ver resultados (View Results). Consulte la Figura 9, la Figura 10 y la Figura 11 para ver ejemplos específicos, y consulte la Tabla 2 para la lista de todos los resultados posibles.

Resultados e interpretaciones del ensayo Xpert MTB/RIF

- MTB DETECTADO MEDIO; Rif Resistance NO DETECTADO

- No se ha detectado ninguna mutación en el gen rpoB.
- SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.

MTB DETECTADO BAJO; Rif Resistance DETECTADO (MTB DETECTED LOW; Rif)

La muestra contiene la secuencia diana de MTB:

- Se ha detectado una mutación del gen rpoB que está dentro del ajuste válido de Ct delta.
- SPC: NA (N/A) (no aplicable). No se requiere una señal SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.

MTB DETECTADO; Resistencia a Rif INDETERMINADA (MTB DETECTED; Rif Resistance INDETERMINATE). La muestra contiene la secuencia diana de MTB:

- No se pudo determinar la resistencia a RIF debido a una detección insuficiente de la señal.
- SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.

MTB no detectado (MTB Not Detected). No se ha detectado la secuencia diana de MTB en la muestra:

- SPC: SUPERADO (PASS). El SPC cumplió los criterios de aceptación.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.

NO VÁLIDO (INVALID) No puede determinarse la presencia o ausencia de MTB.

- El SPC no satisface los criterios de aceptación, la muestra no se procesó correctamente o la PCR se ha inhibido. Repita la prueba. Consulte la Apartado J.2, Procedimiento de repetición de la prueba.

MTB NO VÁLIDO (INVALID): No puede determinarse la presencia o ausencia de ADN del MTB.

- SPC: NO SUPERADO (FAIL). El resultado de la diana de MTB es negativo, y el Ct del SPC no está dentro del intervalo válido.
- Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.

ERROR: no puede determinarse la presencia o ausencia de MTB. Repita la prueba.

- MTB: SIN RESULTADO (NO RESULT)
- SPC: SIN RESULTADO (NO RESULT)
- Comprobación de la sonda: NO SUPERADO (FAIL). Todos o uno de los resultados de la comprobación de la sonda no superaron la prueba.
- Nota: Si la comprobación de la sonda se superó, el error se debe a un fallo en los componentes del sistema.

SIN RESULTADO (NO RESULT) No puede determinarse la presencia o ausencia de MTB.

Repita la prueba

- MTB: SIN RESULTADO (NO RESULT)
- SPC: SIN RESULTADO (NO RESULT)
- Comprobación de la sonda: NA (no inaplicable)

Si bien las técnicas de biología molecular no pueden sustituir completamente a la metodología tradicional en el diagnóstico de la tuberculosis en la actualidad, son un pilar fundamental en el diagnóstico rápido de la enfermedad y de los casos graves de multirresistencia. La gran variedad de métodos disponibles y en constante evolución, así como los diferentes grados de aplicación, ha conllevado la instauración progresiva e imprescindible de esta tecnología, en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica de los países desarrollados y subdesarrollados.

Conclusiones

En el presente ensayo se puede concluir lo siguiente:

Para el diagnóstico de tuberculosis en El Salvador, se realiza de forma convencional utilizando la microscopía de frotis teñido por Zielh Neelsen que pueden generar falsos positivos y/o negativos y no determinan las infecciones paucibacilares y las técnicas de cultivo convencional en la cual se prolonga el tiempo para dar un resultado negativo y/o positivo. Debido a ello se hace necesario un diagnóstico más rápido y con mayor sensibilidad por técnicas biología molecular.

La prueba semicuantitativa GeneXpert MTB/RIF de diagnóstico in vitro nos permite detectar los componentes del genoma del *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y su resistencia a rifampicina (RIF).

Las técnicas de biología molecular actualmente no pueden sustituir completamente a la metodología tradicional en el diagnóstico de la tuberculosis, pero son un pilar fundamental en el diagnóstico rápido de la enfermedad y de los casos graves de multirresistencia.

Fuentes de información

1. Alcaide, Fernando.” Que aporte la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis”
Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Vol 2, 2019: pág. A93-495.
2. Mellado, Olga Magia.” Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas”. vol 3, número 30, 2020; pág. 88-111.
3. Baguena Cervellera, Magia Jose. “La tuberculosis en la historia”. Historia de ciencia, vol 1, 2020; pagar 1-8.
4. Paneque Ramos, Ena. Rojas Rodríguez, Liliana Yaneth. Pérez Loyola, Maritza. “La tuberculosis a través de la historia: un enemigo de la humanidad”. Revista habanera de ciencias medicas, 2020, pág. 353-363.
5. Jugarte Gil, Cesar A. “historia de la tuberculosis”. Instituto de medicina tropical Alexander Von Humboldt. Universidad peruana Cayetano Heredia.
6. Cartes Parra, Juan Carlos. “Breve historia de la tuberculosis”. Revista médica de costa rica y Centroamérica. Lxx (605), 2018, pág. 145-150.
7. Ministerio de salud de el salvador (MINSAL). “Lineamientos técnicos para la prevención y control de la tuberculosis”. 3° edición.
8. Con te era, Mariela. Amaya, Gabriela. Gutiérrez, Claudia. “Diagnóstico de tuberculosis utilizando las nuevas técnicas moleculares rápidas en Uruguay”. Programa nacional de tuberculosis. Vol 1. 2021.
9. Meseros cuervo, Lilian Marina. Martínez Romero, Mafía Rosarys. Sardiñas Aragón, Misleidis. Garcia León, Grechen. Pereira Gros, Ernesto Gerardo. Días Rodríguez, Raúl.

“Aplicabilidad de la herramienta GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis”.

Artículo de investigación. Vol 51, 2020, pág. 173-180.

10. Cepheid, “GeneXpert MTB/RIF”. Equipo para el diagnóstico de tuberculosis un vitro, 2019.
11. Barrera, Lucia. “La tuberculosis con el lente de aproximación a la biología molecular”. Instituto nacional de enfermedades infecciosas ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, buenos aires. Pág. 17-25.
12. Arias M, Fabiola. Herrera M, Tañía. “Nuevos métodos para el diagnóstico de tuberculosis”. Sección de tuberculosis. Pág. 254-259.
13. Vaquero Artigao, Fernando. Del Rosal, Teresa. Falcón Neyra, Lola. “Actualización del diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis”. Asociación española de pediatría. Pág. 1-10. 2023.
14. Acosta Sánchez, Dainer Rogelio. Domínguez Sánchez, Leodainis. López González, Joaquín. Darte Granadales, Serguei. “GeneXpert como método diagnóstico de la tuberculosis en Santiago de cuba”. Medison. Pág. 1-10. 2022.
15. Iglesias Osore, Sebastián. Ruiz Torres, Charles. Becerra atoche, Giancarlo. “Utlidad de la PCR en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas”. Facultad de ciencias de la salud. Universidad señor de sipan. Chiclayo, Perú. Vol 26. N° 3. Pág. 1-13. 2022.
16. Macero Esteves, Carolina. Moreno Calderón, Xiomara. Oliveira Oliveira, Débora. “Prueba GeneXpert MTB/RIF para el diagnóstico de tuberculosis en el Instituto Médico la Floresta. Vol 33. Pág. 40-47. 2022.

17. Sanz Ortega, Julián. “Técnicas de amplificación (Fundamentos teórico de PCR)”. Hospital clínico San Carlos, Madrid. Pág. 1-5.
18. Agredo, Freddy. Osorio, Lyda. “Cobertura y fidelidad de la prueba GeneXpert MTB/RIF en un área de alta carga de tuberculosis pulmonar en colombiano”. Biomédica. Pág. 626640. 2020.
19. Dorado Pérez, Gabriel. “Amplificación de DNA mediante la PCR (reacción en cadena de la polimerasa)”. Departamento de bioquímica y biología molecular, campus universitario de Rabanales. Pág. 1-18.
20. Palacios Cedillo, Nori Verónica. Zambrano Mancia, Coralia. “Diagnóstico y seguimiento de tuberculosis pulmonar en pacientes con comorbilidades”. Revista científica pena ciencias. Vol 5. Pág. 68-88. 2023.