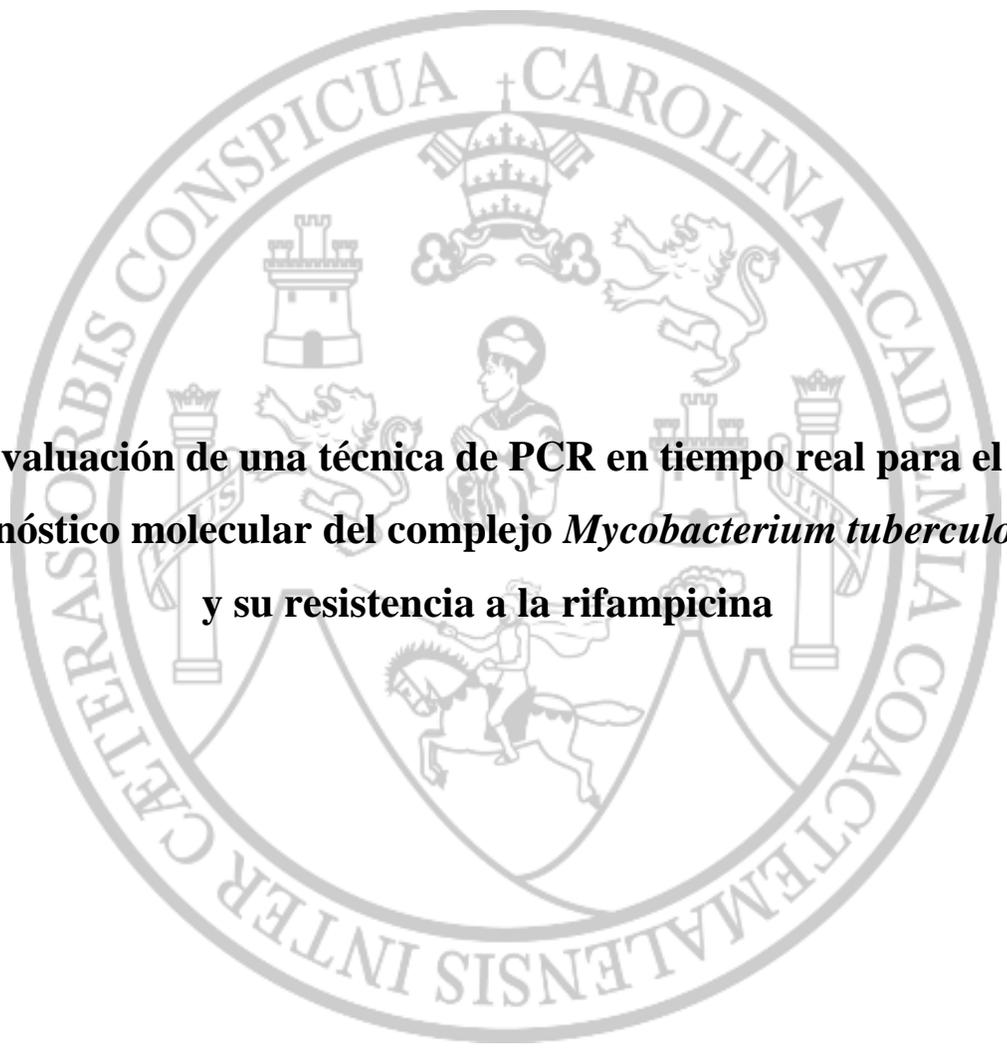


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



Evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina

Cindy Carolina Rocío Villalobos Morales

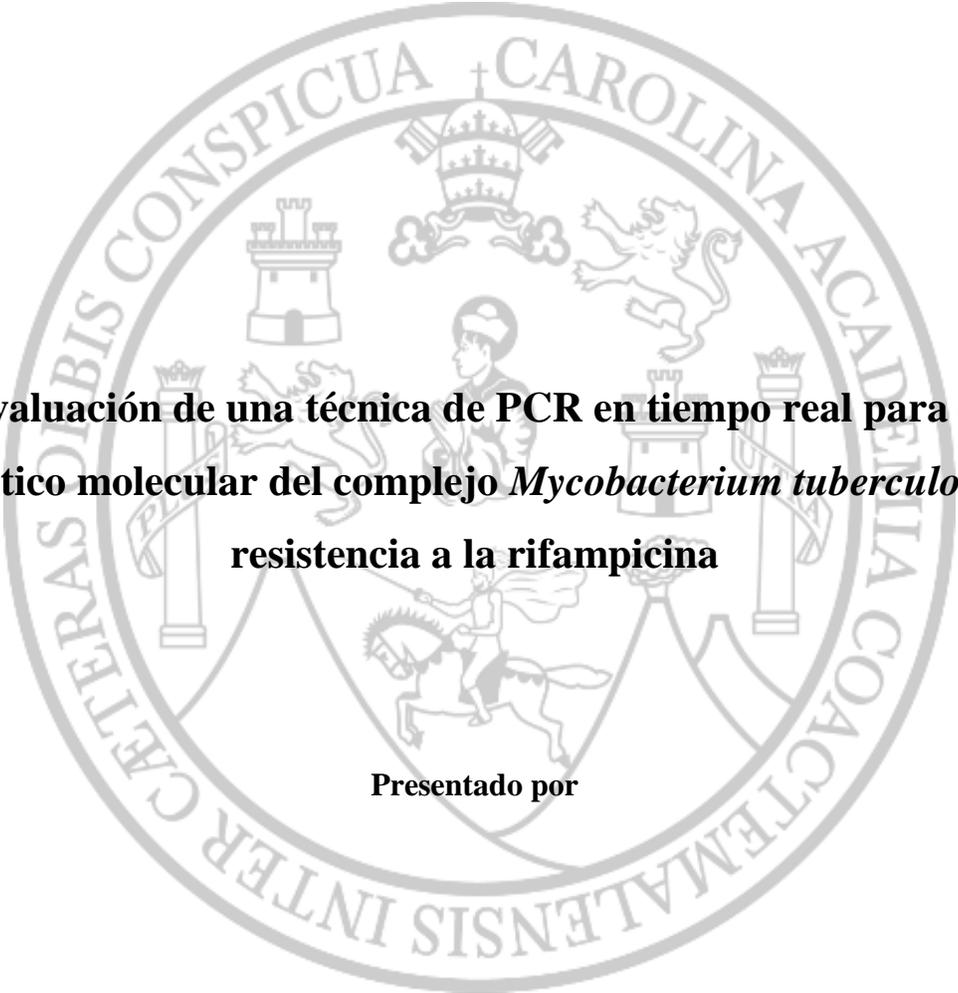
Sofía Maribel Soberanis López

Brenda Elizabeth Guzman Escobar

QUÍMICAS BIOLÓGAS

Guatemala, Octubre de 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



Evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina

Presentado por

Cindy Carolina Rocío Villalobos Morales

Sofía Maribel Soberanis López

Brenda Elizabeth Guzman Escobar

**Para optar al título de
Químicas Biólogas**

Guatemala, Octubre de 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por acompañarnos y guiarnos a lo largo de nuestra carrera, por proporcionarnos fortaleza y sabiduría en este trayecto y permitirnos culminar una etapa más en nuestra vida profesional.

A NUESTROS PADRES

Mirna Maribel Villalobos Morales y Edgar René Ramírez Recinos; Delma Maribel López Contreras de Soberanis y Edgar René Soberanis Gatica; Daisy Elizabeth Escobar de Guzmán y Manuel Eduardo Guzmán Cabrera. Por su inmenso amor y apoyo constante en cada una de las distintas etapas de nuestras vida, por su esfuerzo y dedicación al proporcionarnos una educación y por ser un ejemplo de vida.

A NUESTRA FAMILIA

Estela Morales López, Dulce Ramírez, Edgar Ramírez, Sandra González Samayoa; Edgar René Soberanis López, Gilberto Soberanis Orantes, Jacinta Contreras Bonilla; Alejandro Javier Guzmán Escobar, Londy de Escobar, Víctor Escobar y Silvia Escobar. Por ser parte importante de nuestra vida, por su apoyo incondicional, paciencia y cariño.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A la tricentenaria Universidad por ser nuestra *Alma mater* y abrirnos las puertas para nuestra superación personal, en especial a la centenaria Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por brindarnos la preparación adecuada para nuestra formación como profesionales.

A NUESTROS ASESORES Y REVISORA

Lic. César Roberto Conde Pereira, Licda. Carmen Julia Mazariegos Herrera, M.A. Isabel Cristina Gaitán Fernández y Licda. Karla Josefina Lange. Por su tiempo, dedicación y paciencia en la elaboración de esta investigación.

ÍNDICE

I.	ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	1
II.	RESUMEN	3
III.	ANTECEDENTES	4
	A.Tuberculosis	4
	1. Definición de la enfermedad	4
	2. Agente etiológico	4
	a. Características morfológicas	5
	b. Características metabólicas	5
	c. Características del genoma	5
	3. Transmisión	6
	4. Patogenia	7
	5. Cuadro clínico	8
	6. Papel de la respuesta inmune	11
	B.Diagnóstico	13
	1. Diagnóstico clínico	13
	2. Diagnóstico por imágenes	14
	3. Diagnóstico microbiológico	15
	4. Diagnóstico molecular	18
	C.Tratamiento	26
	1. Resistencia antibiótica	27
	2. Quimioprofilaxis	30
	D.Epidemiología en Guatemala	31
	E.Verificación de los procedimientos analíticos	33
IV.	JUSTIFICACIÓN	35

V. OBJETIVOS	37
A.Objetivo general	37
B.Objetivos específicos	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	38
A.Universo de trabajo	38
B.Muestra	38
1. Criterios de inclusión	38
2. Criterios de exclusión	38
C.Recursos	39
1. Recursos humanos	39
a. Seminaristas	39
b. Asesores	39
2. Recursos institucionales	39
3. Recursos físicos	39
D.Procedimiento	42
1. Recepción de muestras	42
2. Procesamiento de muestras	42
E.Diseño de Investigación	54
1. Tipo de estudio	54
2. Muestreo	54
3. Análisis estadístico	54
VII. RESULTADOS	56
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	61
IX. CONCLUSIONES	71
X. RECOMENDACIONES	72

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
XII. ANEXOS	85

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La tuberculosis es una de las primeras diez causas de mortalidad en todo el mundo, se calcula que una tercera parte de la población mundial se encuentra en fase latente, es decir, que se encuentran infectadas pero aún no han desarrollado la enfermedad y no la pueden transmitir (Organización Mundial de la Salud, 2016). Guatemala se encuentra clasificada por parte de la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud (OMS y OPS) dentro de los países con alta carga de tuberculosis, donde aproximadamente se reportan hasta 85 casos nuevos por cada 100 000 habitantes cada año (Clínica de Enfermedades Infecciosas, 2017).

Las Naciones Unidas en el año 2015, adoptaron los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para el año 2030 y una de sus metas es poner fin a esta epidemia mundial de tuberculosis, por lo que se plantea una estrategia denominada “Fin de la tuberculosis”. Sin embargo, el ritmo de reducción de la incidencia mundial de la enfermedad en el período 2014-2015 se mantuvo en tan solo un 1.5%, y es necesario aumentarlo en 4 o 5% anual para el año 2020 si se quieren alcanzar los ODS (OMS, 2016).

Entre el año 2000 y 2015, gracias al tratamiento oportuno de la enfermedad, se evitaron 49 millones de muertes, pero aún existen carencias diagnósticas y terapéuticas notables, siendo uno de los principales desafíos el diagnóstico rápido y certero de la enfermedad (OMS, 2016).

El presente estudio evaluó una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando GeneXpert, para el diagnóstico molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y su resistencia a la rifampicina. El ensayo Xpert® MTB/RIF es la única prueba de diagnóstico rápido disponible en la actualidad y recomendada por la OMS para este fin. De los 48 países que se encuentran en las listas de países con alta carga de tuberculosis, 15 han adoptado hacia finales del 2015, algoritmos nacionales en los que Xpert® MTB/RIF es la prueba diagnóstica inicial para todas las personas con síntomas y signos pulmonares (OMS, 2016).

La investigación se realizó en el Área de Tuberculosis y Hongos del Laboratorio Clínico, Hospital General San Juan de Dios; también contó con el asesoramiento de la Unidad de Investigación en Inmunología y Hematología, del Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

II. RESUMEN

En la actualidad, la tuberculosis sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública alrededor del mundo. De acuerdo con la OMS y la OPS, Guatemala se encuentra clasificada dentro de los países con alta carga de la enfermedad, donde aproximadamente se reportan hasta 85 casos nuevos por cada 100 000 habitantes cada año.

Hasta la fecha, las técnicas tradicionales utilizadas para la detección de *M. tuberculosis* en nuestro país, son la tinción de Zhiel-Neelsen y el cultivo en medio sólido y/o líquido (Löwenstein-Jensen y MGIT™, respectivamente) utilizado como estándar de oro; sin embargo, estas metodologías poseen baja sensibilidad y periodo de detección muy lento (15 a 45 días).

El objetivo del presente estudio fue evaluar una técnica de PCR en tiempo real utilizando la metodología Xpert® MTB/RIF, para el diagnóstico molecular del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina en muestras pulmonares y extrapulmonares, debido a que esta prueba permite la detección del complejo en menor tiempo y a la fecha, no existen datos que permitan comparar su desempeño frente al estándar de oro bajo las condiciones del Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH) del Hospital General San Juan de Dios.

Según condiciones del ATBH, la metodología Xpert® MTB/RIF presentó una mayor sensibilidad para muestras pulmonares (95,65%), en comparación con muestras extrapulmonares (68.75%) con respecto al estándar de oro. La especificidad, en muestras pulmonares fue de 86.49% y en muestras extrapulmonares se obtuvo un valor de 90.18% . Las muestras pulmonares presentaron un Valor Predictivo Positivo (VPP) de 52.38% y un Valor Predictivo Negativo (VPN) de 99.92%, ambos valores mayores a los de las muestras extrapulmonares; VPP de 25.00% y VPN de 98.35%. Con respecto al índice de Kappa, las muestras pulmonares presentaron una considerable fuerza de concordancia (0.61), y las muestras extrapulmonares una fuerza de concordancia razonable (0.32). Por último, la evaluación de la resistencia a la rifampicina en el total de muestras, presentó un valor de 85.71% de sensibilidad y VPP así como un valor de 97.14% para especificidad y VPN, en comparación con el método MGIT™.

III. ANTECEDENTES

A. Tuberculosis

1. Definición de la enfermedad

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, crónica y sistémica producida principalmente por el bacilo ácido alcohol resistente o bacilo de Koch (BAAR) *Mycobacterium tuberculosis*, que se localiza generalmente en el pulmón, pudiendo afectar otros órganos. Es transmitida de persona a persona por inhalación de aerosoles en los que el bacilo está presente, los cuales han sido eliminados por los individuos enfermos al toser, hablar o estornudar (Uribarren, 2016).

El periodo de incubación del género *Mycobacterium* es de aproximadamente 3 a 5 semanas, con variación entre 2 y 8 semanas. La sintomatología depende de ciertos factores tales como: edad, estado nutricional e inmune, tamaño de inóculo y otras patologías de base del hospedador (Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) avanzado, diabetes y patología renal) (Pérez, Hurtado y Rivera, 2001).

2. Agente etiológico

El agente causal de la tuberculosis fue descubierto en 1882 por Roberto Koch; pertenece al orden *Actinomycetae*, familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. El género *Mycobacterium* incluye más de 100 especies que pueden clasificarse en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico, siendo uno de éstos grupos el complejo tuberculosis, que incluye a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG) y *M. africanum*, productoras todas ellas de tuberculosis, siendo el primero el que se aísla con mayor frecuencia. Se incluye también *M. microti*, productor de tuberculosis en ratas (Ramírez, Cocotle, Méndez y Arenas, 2002).

Las micobacterias también pueden clasificarse en no tuberculosas (*Mycobacterium avium*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*) y en tuberculosas (*M.*

tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, y *M. canettii*, las cuales pertenecen al complejo *M. tuberculosis* (Uribarren, 2016).

a. Características morfológicas

Es un bacilo ligeramente curvo de 1 a 4 μm de largo por 0.3 a 0.6 μm de ancho, intracelular obligado, aerobio e inmóvil (Ramírez, Cocotle, Méndez y Arenas, 2002).

M. tuberculosis posee una pared celular compuesta por una membrana citoplasmática, la cual a su vez, contiene peptidoglicanos unidos a polisacáridos, esterificados con ácidos micólicos (lípidos libres, peptidoglicolípido y glucolípido). Esta estructura influye en las características hidrofóbicas, resistencia a la acción de ácidos y álcalis, así como en el tiempo de generación y resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos fijadores de complemento; así mismo, es la causante de iniciar las reacciones inflamatorias del huésped (Uribarren, 2016; Ramírez et al., 2002).

b. Características metabólicas

Las micobacterias obtienen su energía de la oxidación de compuestos simples de carbono, como la glucosa y el glicerol. Pueden crecer en medios simples que contengan glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio, formando colonias no pigmentadas, rugosas de color gamuza de los 14 a 28 días de incubación. Se utilizan comúnmente los medios de Löwenstein-Jensen o Middlebrook en una atmósfera de 5 a 10% de dióxido de carbono. No posee actividad catalasa, ni la capacidad de acumular niacina o de reducir nitratos a nitritos (Uribarren, 2016; Ramírez et al., 2002).

c. Características del genoma

En el año 1998 fue publicada la secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv, en el cual se identificaron 3974 genes, siendo actualmente 4011. Este genoma comprende 4,411,529 pares de bases (pb), con 65.6% Guanina-Citocina (G-C), encontrándose de manera homogénea a lo largo de todo el genoma. Se ha reportado la presencia de una proporción mayor a la media de G-C, las cuales pertenecen a una gran

familia de genes que incluyen PGRSs (polymorphic G-C rich sequences) (Fontalvo y Gómez, 2015).

Aproximadamente 200 de estos genes se encuentran involucrados en la codificación de enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos, genes codificadores de proteínas ricas en glicina y de las familias de proteínas PE (secuencia de aminoácidos Pro-Glu) y PPE (secuencia de aminoácidos Pro-Pro-Glu) encontradas en regiones N-terminal de cada una de estas proteínas, las cuales poseen aproximadamente 110-180 aminoácidos. En lo que respecta al genoma de *M. tuberculosis*, este posee el potencial para codificar once sistemas completos de transducción de señales, los que están relacionados con la patogénesis y virulencia de dicho microorganismo, entre ellos se pueden mencionar los procesos de disponibilidad de oxígeno, fase de crecimiento, estrés oxidativo del macrófago, osmolaridad, temperatura y pH, permitiendo la activación o represión coordinada de los genes relacionados con virulencia (Maulén, 2011).

M. tuberculosis posee el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la enzima ARN (ácido ribonucleico) polimerasa. Esta región puede llegar a presentar resistencia al fármaco rifampicina debido a mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en una región limitada del gen. Dichas mutaciones se encuentran asociadas con la resistencia fenotípica al fármaco y se localizan en una región de 81 pb con mutaciones en los codones Ser-531, His-523 y Asp-516 (Agapito, Neyra, Castro, Accinelli, Rodríguez y Espinoza, 2002).

3. Transmisión

M. tuberculosis se transmite por partículas en suspensión en el aire o pequeñas gotas llamadas *droplets* (microgotas) que se producen cuando las personas tuberculosas estornudan, tosen o hablan. Las microgotas poseen un diámetro de 1 a 5 μm , por lo que las corrientes de aire pueden mantenerlas en suspensión y ser transportadas en el mismo durante varias horas o incluso días. Los residuos de estas microgotas evaporados, contienen menor número de organismos viables (aproximadamente de 1 a 3 bacilos) y también poseen menor tamaño (Chirico, Morcillo y Kuriger, 2006; Montañes, Iglesias, y Altet, 2011).

La infección asintomática, ocurre cuando una persona susceptible inhala gotas que contienen al bacilo *M. tuberculosis*, los cuales son transportados hasta los alvéolos pulmonares; una vez en el pulmón, son fagocitados por los macrófagos alveolares y pueden ser propagados a través del organismo, dando lugar a una infección sistémica (Granich, Binkin, Jarvis, Simone, Rieder, y Espinal, 2002).

4. Patogenia

Se pueden describir cinco estadios de la patogenia causada por *M. tuberculosis*:

- Inicio
- Simbiosis
- Necrosis caseosa
- Activación de macrófagos y liquefacción
- Cavitación

En la mayor parte de los casos, los bacilos que logran llegar hasta los alvéolos, son fagocitados y destruidos por los macrófagos. En caso contrario, la aspiración de *M. tuberculosis* hasta los alvéolos, desencadena una serie de respuestas inmunológicas y tisulares, denominada primoinfección tuberculosa. En esta situación, se produce un foco de alveolitis exudativa, donde los macrófagos destruyen una determinada cantidad de microorganismos. Cuando la infección se propaga por vías linfáticas intrapulmonares, llegando hasta los ganglios regionales paratraqueales, da lugar a la formación de un complejo bipolar o foco pulmonar y adenopatías (Lozano, 2002; Maulén, 2011).

Luego de 2 a 10 semanas de la infección, inicia la respuesta inmune celular, desencadenada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de *M. tuberculosis*, en donde los macrófagos los reconocen y procesan, mostrándolos a los linfocitos T para la estimulación, por liberación de linfocinas, de la transformación de un gran número de macrófagos especializados contra la micobacteria. Los linfocitos activadores de macrófagos, las células epiteloides y las células de Langhans rodean a los bacilos, con el fin de eliminarlos, dando lugar al granuloma tuberculoso, dejando un núcleo de necrosis caseosa. Una vez cumplida la

meta de eliminar a los microorganismos, se reabsorbe y deja una cicatriz fibrosa que suele calcificarse (Lozano, 2002).

Se pueden observar tres distintas situaciones, desde el punto de vista del sistema inmunitario del huésped y las micobacterias tuberculosas: exposición sin infección (no se evidencia respuesta inmunitaria), infección sin enfermedad (respuesta inmunitaria sin evidencia de la enfermedad) y enfermedad activa (existen síntomas y signos clínicorradiográficos y confirmación bacteriológica) (Lozano, 2002; Maulén, 2011).

5. Cuadro clínico

Al inicio de la enfermedad, los síntomas de la tuberculosis pulmonar suelen ser insidiosos e inespecíficos para la misma, lo que puede causar un diagnóstico tardío de la tuberculosis (Calvo y Bernal 2012).

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), las manifestaciones clínicas de la tuberculosis dependen del área del cuerpo donde se estén replicando los bacilos. Generalmente, estos se multiplican en los pulmones (tuberculosis pulmonar) causando los siguientes síntomas: tos intensa con duración de 3 semanas o más, dolor torácico y hemoptisis o esputo (flema que sale desde el fondo de los pulmones) (CDC, 2016).

Los síntomas de la tuberculosis pueden ser agudos, subagudos o crónicos e inespecíficos: pérdida de peso, diaforesis, astenia, anorexia y fiebre o febrícula, de evolución más o menos prolongada, los cuales pueden ser causados por diversas enfermedades y no necesariamente relacionarlos con tuberculosis. Cuando se observan síntomas respiratorios como tos, expectoración mucopurulenta o hemoptoica, hemoptisis, disnea o dolor torácico, se orienta a un posible diagnóstico de tuberculosis (Calvo y Bernal 2012; Fanlo y Tiberio, 2007).

La tuberculosis primaria o primoinfección, propia de niños, suele ser asintomática o presentar síntomas inespecíficos. En un adulto, suele darse un curso subagudo con tos, cuadro constitucional, expectoración y en algunas ocasiones, puede observarse como un cuadro de inicio agudo, similar al de una neumonía bacteriana. La localización pleural de la tuberculosis

también posee un curso lento de dolor torácico, disnea y síntomas generales asociados a la enfermedad (CDC, 2016).

Por otro lado, las manifestaciones clínicas de los pacientes pueden llegar a ser influenciadas por la edad y el estado inmunológico. En pacientes mayores de 65 años de edad, los síntomas inespecíficos son los más frecuentes.

Los hallazgos clínicos de la tuberculosis en un paciente infectado con VIH dependen de la severidad de la inmunodepresión. Los pacientes que poseen niveles de linfocitos T CD4+ mayores a $200/\text{mm}^3$ presentan síntomas similares a aquellos pacientes inmunocompetentes, quedando la enfermedad circunscrita al pulmón. En los individuos con recuentos menores a este dato, es más frecuente el compromiso extrapulmonar y las formas diseminadas. En estos pacientes la exploración física debe ser sistemática; en búsqueda de adenopatías y lesiones cutáneas que sugieran la presencia de tuberculosis, tales como el eritema nodoso, derrame pleural unilateral, osteomielitis, artritis, desviación de la columna, úlceras y sangrado digestivo (Aidar, Ambroggi, Jave, Brian, Canedo, y Cufre, 2010; Calvo y Bernal 2012).

a. Tuberculosis pulmonar

La infección se localiza con frecuencia en los pulmones pero puede diseminarse y atacar cualquier órgano del cuerpo. El diagnóstico precoz y certero se ve dificultado debido a la naturaleza crónica de la enfermedad y comienzo insidioso con sintomatología general (Dorronsoro y Torroba, 2007).

Los síntomas más frecuentes que suelen presentarse son: hiporexia, pérdida de peso, febrícula vespertina, astenia, adinamia, sudoración nocturna, así como signos asociados a sintomatología respiratoria (tos, expectoración, disnea). El síntoma más característico y frecuente es la tos pulmonar; si bien al inicio es seca (no hay producción de moco o flema), con el avance de la enfermedad evoluciona a tos productiva con expectoración mucosa, hemoptoica o mucopurulenta (Dorronsoro y Torroba, 2007).

b. Tuberculosis extrapulmonar

Afecta a otros tipos de órganos que no sean el pulmón e incluye formas que se encuentran localizadas de manera parcial o totalmente dentro del tórax. También son consideradas extrapulmonares las adenopatías hiliares o mediastinales y la tuberculosis pleural. Se ha reportado que la incidencia de tuberculosis extrapulmonar es del 15-20% en pacientes inmunocompetentes, observándose hasta el 70% en inmunosuprimidos. La sintomatología depende de la localización, siendo las más comunes la tuberculosis pleural y ganglionar. Otras menos comunes son: genitourinaria, nerviosa, osteoarticular, abdominal, cutánea y laríngea (Aidar et al., 2010; Dorronsoro y Torroba, 2006).

La tuberculosis genitourinaria es la segunda forma de tuberculosis extrapulmonar más frecuente, después de su aparición en los ganglios linfáticos. Alrededor del 1% de las mujeres la padecen entre los 20 y 40 años (en edad fértil). En los hombres, los órganos más afectados son el riñón, el epidídimo y la próstata al inicio de la infección. El sistema urinario puede verse afectado, con infección directa al riñón y vías urinarias; causando de forma secundaria una amiloidosis renal (García, Pérez, Chávez y Sereno, 2014; Fanlo y Tiberio, 2007).

A nivel del sistema nervioso central, se puede presentar en tres formas clínicas: meningitis tuberculosa, tuberculoma intracraneal y aracnoiditis tuberculosa espinal. Los adultos pueden verse afectados, principalmente personas con VIH, siendo más frecuente en niños menores (Fanlo y Tiberio, 2007).

c. Tuberculosis diseminada

La enfermedad se puede diseminar hacia otros órganos diferentes a los pulmones, generalmente comprometiendo a más de dos órganos. De forma aguda, se puede presentar como síndrome del distrés respiratorio del adulto y en la forma crónica se observa compromiso del estado general y fiebre de origen desconocido. El estado general se deteriora y se observan síntomas como: hipertermia, disnea, astenia e incluye signos clínicos de aquellos órganos que pueden estar afectados: derrame pleural, trastornos digestivos, hematológicos (anemia, linfopenia, trombocitopenia) y en algunos casos hepatoesplenomegalia (Aidar et al., 2010; Dorronsoro y Torroba, 2006).

6. Papel de la respuesta inmune

La tuberculosis primaria causada por *M. tuberculosis*, ocurre en personas sin inmunidad específica, generalmente en individuos que no habían estado expuestos anteriormente al bacilo, ya sean niños sanos o adultos jóvenes, siendo la edad de mayor riesgo la adolescencia. La enfermedad primaria se desarrolla dentro de los primeros cinco años de la infección inicial. Los factores de virulencia que posee *M. tuberculosis*, le conceden la habilidad de mantener una infección crónica y causar la enfermedad en los sujetos infectados, ya que le permiten entrar y sobrevivir indefinidamente dentro de las células fagocíticas mononucleares (García, 2001).

En la mayor parte de los casos de infección por *M. tuberculosis*, el paciente permanece asintomático y no infeccioso, por lo que esta latencia puede extenderse a lo largo de la vida de la persona infectada. Sin embargo, se puede activar la infección latente cuando existen perturbaciones de la respuesta inmune, tales como infección por el VIH, diabetes mellitus, el envejecimiento, el abuso de drogas o alcohol y el tratamiento con corticosteroides, los cuales aumentan el riesgo de la reactivación de la enfermedad latente. *M. tuberculosis* persiste en los macrófagos dentro de un granuloma en los huéspedes infectados (García, 2001).

a. Respuesta inmune innata

Las características principales de la respuesta innata se inician desde el reconocimiento de estructuras moleculares de los patógenos mediante receptores tipo *Toll* (TLR) que inducen a moléculas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO) que conllevan a la muerte del microorganismo. Además de ello, dichas moléculas inducen la activación de la respuesta adaptativa al reclutar linfocitos T al sitio de lesión, activar las células dendríticas y producir citocinas y quimiocinas (Herrera, Torres, Juárez y Sada, 2005). Al llegar a los alvéolos, *M. tuberculosis* entra en contacto con los macrófagos alveolares (MA), que son la primera línea de defensa en el pulmón; este contacto define si la enfermedad se desarrolla, o se puede controlar la infección. Existen algunos componentes de la micobacteria como la lipoarabinomano (LAM), lipoproteína de 19 kilodaltons (kDa) y glicoproteínas, que se unen al receptor tipo *Toll 2* (TLR2) de los MA, induciendo la producción de moléculas como interleucina-1 (IL-1), TNF- α y NO, las cuales activan

señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune. Se activa entonces un mecanismo de señalización tras la unión de LAM, 19 kDa y otras glicoproteínas con TLR2 y la unión de citocinas como IL-1 y TNF- α con sus respectivos receptores, lo que induce la expresión de citocinas y moléculas involucradas en la respuesta inmune (Herrera et al., 2005).

b. Inmunidad celular

M. tuberculosis puede promover su propia fagocitosis y utilizar diferentes vías para poder ingresar a los MA utilizando varios receptores (receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4, receptores de manosa, receptores carroñeros o *scavenger* y receptores para la proteína surfactante). La vía de entrada de la micobacteria determina su destino dentro de los macrófagos alveolares (Herrera et al., 2005).

Después de la fagocitosis, *M. tuberculosis* que se encuentra en un fagolisosoma dentro de los macrófagos, se destruye debido a los mecanismos bactericidas y proteolíticos de los macrófagos, posterior a ello se producen péptidos y otros antígenos. Los antígenos micobacterianos que tienen naturaleza proteica se unen entonces a moléculas del Complejo de Histocompatibilidad tipo I (MCH I) para ser presentados por los macrófagos a linfocitos T CD8+, o pueden unirse a moléculas del complejo de Histocompatibilidad tipo II (MCH II) y ser presentados a los linfocitos T CD4+. Los antígenos de naturaleza glicolipídica como fosfatidil manósidos, lipoarabinomananas, ácidos micólicos y hexosil-1-fofoisoprenoides, se unen con moléculas CD1 y son presentados a los linfocitos CD8+ y dobles negativos (CD4-CD8). Este proceso de presentación de antígenos constituye un paso de vital importancia en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune celular, ya que se encuentra basado en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares, los cuales se activan y producen factores solubles como citocinas y quimiocinas (García, 2001; Herrera et al., 2005).

Algunas quimiocinas (MCP-1, MIP-1 α) tienen un papel muy importante en la migración de las diferentes subpoblaciones celulares al sitio de infección para la formación del granuloma (Herrera et al., 2005). El granuloma está compuesto por macrófagos, células gigantes, células

T, células B y fibroblastos. En las infecciones latentes, no se conoce la actividad de la bacteria dentro del granuloma. El microorganismo puede estar en un estado inactivo sin replicarse, replicándose activamente pero limitado por la respuesta inmune, o metabólicamente alterado con ciclos replicativos infrecuentes o limitados. Cuando se altera la respuesta inmune, se puede inducir la reactivación y por lo tanto la replicación del bacilo, produciendo daño al tejido pulmonar y su necrosis.

La respuesta inmune puede prevenir la enfermedad activa en la mayoría de las personas, sin embargo, la infección no puede ser eliminada debido a que ha desarrollado mecanismos para poder evadir la respuesta inmune mediada por células (Araujo, Acosta, Escobar, Baños, Fernández y Santiago, 2008). Una de las estrategias en la generación de vacunas es poder incrementar la respuesta inmune natural producida por *M. tuberculosis* (García, 2001).

B. Diagnóstico

1. Diagnóstico clínico

Los pacientes que padecen de tuberculosis presentan manifestaciones clínicas que no permiten ser diferenciadas de otras enfermedades broncopulmonares. El inicio de la enfermedad puede ser insidioso y poco alarmante, dándose un gran periodo de tiempo hasta que se logre realizar un diagnóstico certero (Caminero, Casal, Ausina, Pina y Sauret, 2001).

La infección primaria generalmente es subclínica y con síntomas inespecíficos. En niños, cuando existe persistencia de síntomas durante más de diez días, se aconseja practicar radiografía de tórax, en especial si se observan manifestaciones sistémicas o extrapulmonares (anorexia, pérdida de peso, eritema nudoso). En adultos, con frecuencia tiene un comienzo solapado en forma de tos, expectoración mucopurulenta, sudoración nocturna, cansancio fácil, etc., aunque en algunas ocasiones el inicio es agudo, con fiebre alta, escalofríos, expectoración hemoptoica o hemoptisis franca. En tales casos, el diagnóstico suele ser más temprano (Caminero et al., 2001).

2. Diagnóstico por imágenes

a. Radiografía de tórax

La radiografía de tórax es el principal método de diagnóstico por imágenes, incluyendo las proyecciones pósterio-anterior y látero-lateral (frente y perfil). Una radiografía de tórax normal posee un elevado valor predictivo negativo especialmente en pacientes inmunocompetentes, siendo la frecuencia de este valor de 1%, incrementándose hasta un 7-15% en pacientes VIH positivos. Las manifestaciones radiológicas dependen de diversos factores del huésped tales como edad, inmunosupresión y tuberculosis previa, variando en esta última en tuberculosis primaria y extraprimaria (Aidar et al., 2010; Montañes, Iglesias, y Altet, 2011).

b. Tomografía axial computada (TAC)

La TAC posee mayor sensibilidad en el diagnóstico de la cavitación, la cual se encuentra relacionada con las complicaciones asociadas a la tuberculosis post-primaria. Esta técnica permite la detección de lesiones mínimas y diseminaciones endobronquiales, correspondiendo esta última al llenado de los bronquios centrilobulillares con exudado inflamatorio (Contreras, Pacheco y Conchari, 2011).

c. Ultrasonografía

La ecografía o ultrasonografía es una técnica mínimamente invasiva, ya que emplea un transductor de elevada frecuencia incorporado en el extremo distal del endoscopio; esta permite la obtención de una imagen con alta resolución de la pared gastrointestinal y de estructuras cercanas a esta, así como una punción con aguja fina en tiempo real. Se puede emplear como método auxiliar para la detección de determinadas localizaciones de tuberculosis por medio del estudio de líquidos en cavidad libre, tabicaciones, engrosamiento (pleura, peritoneo, pericardio); determinación de contenido sólido y líquido en adenopatías y enfermedad granulomatosa diseminada en pacientes inmunocomprometidos (Díaz, Calderón, Menéndez, Blanco, Orive e Ibarra, 2011).

3. Diagnóstico microbiológico

a. Baciloscopía

Es una prueba capaz de dar un diagnóstico en menos de dos horas, caracterizándose por ser la más económica y la única prueba existente en muchos países en desarrollo. La sensibilidad puede llegar a ser una limitante, debido a que se requieren una gran cantidad de bacterias en la muestra (5 000-10 000 bacilos/mL) para ser positiva (González, 2014).

Se estima que la sensibilidad de la tinción en muestras pulmonares es alrededor de 55-60% y en las muestras extrapulmonares varía según la localización. En formas ganglionares es similar a la tuberculosis pulmonar, siendo inferior al 15% en líquidos biológicos, como líquido pleural, articular, ascítico, peritoneal o cefalorraquídeo. En pacientes que padecen tuberculosis e infección por VIH, el rendimiento de la microscopía es menor. El diagnóstico diferencial con especies que pueden ser parcialmente ácido-alcohol resistentes como *Nocardia* o *Rhodococcus*, no plantea dificultades debido a su baja incidencia, sin embargo, no debe descartarse la presencia de dichos microorganismos (González, 2014).

Las técnicas de tinción más empleadas son las tinciones de Ziehl-Neelsen y la fluorescente de Auramina-Rodamina. La técnica de Ziehl-Neelsen es una tinción diferencial que utiliza tres reactivos: el colorante primario es la fucsina, que tiene por objetivo la formación de complejos micolatofucsina con los ácidos micólicos presentes en las micobacterias; luego se aplica calor, que sirve de mordiente y estabiliza los complejos. El alcohol ácido al 3% es la solución decolorante que elimina la fucsina, excepto la impregnada en los BAAR; el azul de metileno funciona como colorante de contraste tiñendo el resto de la preparación, facilitando así la evaluación e interpretación diagnóstica (Dorronsoro y Torroba, 2007).

La tinción fluorescente de Auramina-Rodamina fue implementada en el año 2014 en el Hospital General San Juan de Dios, la cual presentó un desempeño superior con respecto a la tinción de Ziehl-Neelsen (91.95% vs 81.57%), utilizando como estándar de oro el cultivo Löwenstein Jensen y/o MGIT™. Los mejores resultados fueron obtenidos para muestras de esputos, aspirados bronquiales y aspirados orotraqueales (Barrera, Dominguez y Martínez, 2014).

Esta técnica posee la ventaja de ser examinada con un menor número de aumentos, lo que redundaría en un menor tiempo de evaluación de cada extensión. La visualización de al menos 3 bacilos ácido-alcohol resistentes por cada 300 campos de 100 aumentos debe considerarse siempre como positiva (Anexo 1) (González, García, Anibarro, Vidal, Esteban y Blanquer, 2010).

b. Medios de cultivo

El cultivo en medio sólido y/o líquido es el método estándar de oro para la identificación de *M. tuberculosis*, siendo más sensible que la baciloscopía, logrando evidenciar un mínimo de 10-100 BAAR presentes en la muestra. Por medio de este método, es posible incrementar la confirmación del diagnóstico en aproximadamente un 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar (OPS, 2008).

M. tuberculosis puede crecer en medios que contienen glicerol como fuente de carbono, albúmina y asparagina, así como iones amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes, ya que metaboliza el glicerol hasta piruvato. Se pueden utilizar medios sólidos o líquidos; al utilizar la primera opción, se logra distinguir las colonias pequeñas; mientras que en la segunda opción, es necesario verificar por baciloscopía si se trata de BAAR, ya que visualmente en el medio es difícil distinguir el desarrollo del bacilo de la contaminación. (OPS, 2008; Pérez, Tuñez, García y Lado, 2002).

En lo que respecta a la temperatura de incubación, se logran mejores resultados a 37⁰C, ya que la velocidad de multiplicación disminuye conforme la temperatura lo hace, así como puede destruirse el bacilo a una temperatura mayor a 40⁰C. El tiempo de detección de un cultivo positivo depende del método de decontaminación que se haya utilizado, del pH y de la riqueza que contenga el medio de cultivo; también depende de las características propias del bacilo, de la cantidad de bacilos que estén presentes en la muestra y del tiempo durante el cual se haya administrado el tratamiento antituberculoso (Pérez, Tuñez, García y Lado, 2002).

Se pueden utilizar los siguientes medios de cultivo:

i. Agar Löwenstein-Jensen

Es un medio utilizado para realizar pruebas de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a los fármacos antituberculosos y la identificación de micobacterias (Garzón, Mejía, Llerena, Orjuela, García y Burbano, 2009). Este medio contiene agua purificada, fosfato monopotásico, sulfato de magnesio, citrato de magnesio, asparagina, harina de papa, glicerina y huevos como nutrientes, así como verde de malaquita para inhibir el desarrollo de contaminantes Gram positivo y negativo. Se observan colonias de color crema, rugosas o cremosas, amarillentas y se debe confirmar con una tinción Ziehl-Neelsen (BritaniaLab, 2015).

ii. MGIT™

Es un tubo indicador utilizado para la identificación de micobacterias, el cual contiene medio líquido Middlebrook 7H9. El fundamento se basa en la propiedad fluorescente de un compuesto sensible al oxígeno que se encuentra en un tapón de silicona en el fondo del tubo; la remoción del oxígeno producto del metabolismo de las micobacterias, permite la manifestación de la fluorescencia a una longitud de onda de 365 nm (Lemus, 2007). También puede ser utilizado para la detección de susceptibilidad a drogas antituberculosas (Ugarte, Ponce y Moore, 2008).

iii. Ogawa-Kudoh

Es un medio a base de huevo el cual contiene glutamato de sodio como fuente de carbono y nitrógeno; se utiliza para el aislamiento y transporte de micobacterias, más no es específico para el género *M. tuberculosis* (Garzón et al., 2009). Está constituido por un conjunto de sales como citrato de magnesio, sulfato de magnesio, glutamato de sodio, fosfato disódico, fosfato monopotásico anhidro, glicerol, verde de malaquita y homogenizado de huevo; se debe realizar en un pH de 6.4 y se coagula en tubos de manera inclinada a 78°C por 45-60 minutos. Se observan colonias redondas de color amarillo, las cuales deben ser estudiadas por la coloración de Ziehl-Neelsen así como realizar pruebas complementarias para la determinación de género y especie (BioBacter, 2015).

iv. Stonebrink

Medio no selectivo a base de huevo que contiene piruvato de sodio como fuente de carbono; es específico para el crecimiento de *M. bovis* (Garzón et al., 2009). Contiene agua purificada, fosfato monosódico, fosfato disódico, piruvato de sodio, huevo y verde de malaquita al 2% el cual se utiliza para la inhibición de contaminantes Gram positivo y negativo (BritaniaLab, 2015).

v. Middlebrook 7H9

Es un caldo no selectivo para el crecimiento de micobacterias que contiene sales inorgánicas para favorecer el crecimiento de los microorganismos. El citrato de sodio, al convertirse en ácido cítrico, ayuda a mantener los cationes orgánicos de la solución. La albúmina bovina posee función protectora, al fijar los ácidos grasos libres, que pueden ser tóxicos para la especie *Mycobacterium*; la catalasa destruye los peróxidos tóxicos que pueden estar presentes en el medio; la dextrosa actúa como fuente de energía; el cloruro de sodio aporta electrolitos esenciales y el glicerol favorece al crecimiento de las micobacterias. El cloruro de sodio, la albúmina bovina, la dextrosa y la catalasa ayudan al enriquecimiento del medio (BD, 2006).

4. Diagnóstico molecular

a. Amplificación mediada por transcripción (TMA)

Método rápido e isotérmico basado en la amplificación de ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) 16S. Se utiliza la transcriptasa inversa para realizar copias del ARNr a un híbrido de ADN cíclico (ADNc)-ARN y posteriormente se utiliza un método de quimioluminiscencia para la detección del complejo *M. tuberculosis* por medio de sondas de ADN (ácido desoxirribonucleico) específicas (Ortíz y Aristizábal, 2013).

b. Amplificación convencional del ADN por reacción en cadena de la polimerasa

Técnica convencional basada en ADN, que amplifica un segmento específico del gen 16S en el ARNr, seguida por una hibridación y detección colorimétrica. Posee una alta sensibilidad y especificidad en muestras con baciloscopía positiva (Ortíz y Aristizábal, 2013).

c. Amplificación de desplazamiento de la hebra (SDA)

Técnica semiautomatizada para la detección rápida del complejo *M. tuberculosis* en muestras respiratorias. Consiste en un proceso de amplificación enzimática e isotérmica, para la generación de múltiples copias de secuencias del gen IS110 y 16S en el ARNr, dando un producto de amplificación el cual será detectado por medio de un método de fluorescencia. Posee una alta sensibilidad en muestras con baciloscopia positiva (Ortíz y Aristizábal, 2013).

d. Ensayos en base sólida de hibridización

Técnica para la detección e identificación del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a rifampicina e isoniazida. Es un ensayo específico para la detección directa del ARN de dicho complejo y micobacterias no tuberculosas tales como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. malmoense*. Posee una alta sensibilidad y especificidad en muestras respiratorias (Ortíz y Aristizábal, 2013).

e. Amplificación isométrica mediada por lazo (LAMP)

Técnica isotérmica para la amplificación del ADN y que utiliza varios cebadores para la región blanco. La amplificación del producto puede ser detectado por métodos colorimétricos y fluorimétricos. Es una técnica rápida con resultados en dos horas y posee una sensibilidad y especificidad variable (Ortíz y Aristizábal, 2013).

f. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa, esta es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada. Para ello, utiliza la actividad de la enzima ADN polimerasa que sintetiza naturalmente el ADN en las células teniendo la capacidad de trabajar a temperaturas muy elevadas (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013). Para amplificar el ADN de la micobacteria, es suficiente que la muestra contenga al menos una cadena de ADN intacta que abarque la región de interés (Cortazar y Silva, 2004).

Los principales elementos en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora o buffer y agua. Los elementos descritos anteriormente deben de interactuar en tres etapas de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay de Dios et al., 2013).

La desnaturalización consiste en separar las dos cadenas de ADN por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos. La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se disminuye la temperatura para que se facilite la unión de los primers a las cadenas. El tiempo requerido para el alineamiento de los primers depende de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C genera buenos resultados, la tercera reacción se efectúa a 72° C, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde (Cortazar y Silva, 2004). Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición continua de este ciclo permite obtener, como resultado, millones de copias del fragmento que se necesita (Fernández, 2013).

i. PCR convencional

La diferencia de la PCR convencional y la PCR en tiempo real radica en la forma en la que son analizados los amplicones; en la PCR convencional son visualizados mediante una electroforesis, técnica con capacidad de separar los ácidos nucleicos a través de una matriz que funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migrarán hacia el polo positivo (Tamay de Dios et., 2013).

Es necesario además, agregarle al gel un compuesto que pueda unirse a la molécula de ADN de doble cadena. Cuando éste compuesto es excitado con luz ultravioleta (UV), emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Al correr los amplicones en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador de peso molecular que

contenga un número determinado de segmentos de ADN de tamaño conocido, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado (Fernández, 2013).

La visualización de los amplicones se puede realizar tomando una fotografía digital al gel de agarosa expuesto a luz UV, adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas (Tamay de Dios et al., 2013).

ii. PCR tiempo real

Técnica basada en la amplificación de diferentes dianas de ADN y detección fluorimétrica por sondas marcadas tales como *TaqMan*, o biosondas FRET, entre otros (Ortíz y Aristizábal, 2013).

La PCR en tiempo real detecta y cuantifica las secuencias específicas de ácidos nucleicos utilizando marcadores fluorescentes en la reacción, por lo que la detección de los productos amplificados sucede en cada uno de los ciclos de la reacción, así mismo tiene la capacidad de cuantificar la cantidad de ADN inicial en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Estas son las ventajas de la PCR en tiempo real, ya que es posible monitorear el producto de la amplificación conforme transcurre la reacción (Cortazar y Silva, 2004). Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos, ya que, aun teniendo una cantidad muy pequeña de ADN, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (Tamay de Dios et al., 2013).

Los productos de amplificación aumentan a medida que transcurren los ciclos de la PCR. La PCR en tiempo real se puede basar en: la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción, y el empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra (Cortazar y Silva, 2004).

Estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos. Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes, como los fluoróforos que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente (Rodríguez y Rodríguez, 2006). La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado se llama *SYBR Green*, la cual es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa su fluorescencia. Los métodos específicos parten de principios distintos a diferencia de los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como “transferencia de energía de resonancia fluorescente” para generar la señal el cual consiste en transferir energía desde un donador o marcador fluorescente a un aceptor o “*quencher*”. Existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación (Tamay de Dios et al., 2013).

Los métodos que se basan en hidrólisis tienen sondas de oligonucleótidos etiquetados con un marcador fluorescente y un “*quencher*”, ambos están unidos mientras la sonda no se enlace a su secuencia blanco; cuando la sonda hibrida, existe un cambio conformacional entre el marcador y el “*quencher*”, lo que le permite a la actividad exonucleasa 5’-3’ de la Taq polimerasa romper esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo, mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; razón por la cual posee una especificidad muy alta (Fernández, 2013).

En lo que respecta a los métodos por hibridación, estos consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que se encuentra en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. El reportero y el aceptor poseen un espectro de excitación y de emisión similar, por lo que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero será excitado y la señal emitida será transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia (Pérez, 2002).

Para realizar el análisis de la reacción, no es suficiente con la detección de la amplificación en tiempo real y la captación de la fluorescencia de la muestra, por lo que el paso final debe ser la determinación de la cuantificación del material genético. Para lograr este fin, los termocicladores poseen una computadora con un programa informático, que genera una serie de gráficas las cuales muestran los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa o no. Una de estas gráficas es la de amplificación, la cual muestra el curso y el progreso de la reacción; otra gráfica es la curva de disociación, la cual muestra información sobre la especificidad de la reacción (Tamay de Dios et al., 2013).

La principal ventaja de la PCR es que logra generar una gran cantidad de copias (millones de estas) de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde. Debido a que los iniciadores poseen la capacidad de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN, esta técnica permite la discriminación entre varios sitios de unión. También es importante mencionar que la principal desventaja de esta técnica, es la estandarización de ésta para el organismo, lo cual eleva su precio y tiempo para ser efectuada (Serrato, Flores, Aportela y Sierra, 2016).

iii. Xpert® MTB/RIF

El método Xpert® MTB/RIF, que se usa con el sistema Cepheid GeneXpert®, es una prueba diagnóstica *in vitro* de PCR semicuantitativa que amplifica el ácido nucleico de manera automatizada, aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico del complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina (Boehme, et al., 2010).

Se utiliza para la detección de ADN de *M. tuberculosis* en muestras de esputo o sedimentos concentrados preparados a partir de esputos expectorados así como la detección de resistencia a la rifampicina por medio del gen *rpoB*. La prueba amplifica y detecta una porción del gen *rpoB*, mediante el uso de 5 sondas que son capaces de distinguir entre la secuencia salvaje conservada y las mutaciones de la región central que se asocian a la resistencia a rifampicina (Boehme et al., 2010). Las secuencias de los primers para la región *rpoB*, son la secuencia sentido (5'-tacggctcggcgagctgatcc-3') y la antisentido (5'-tacggcgtttcgtatgaacc-3'). Las

mutaciones del gen *rpoB*, en casos de resistencia a la rifampicina se encuentran en mayor parte, en seis regiones altamente conservadas del gen (regiones I-VI) (Cepheid, 2010; Fontalvo y Gómez, 2015).

El método Xpert® MTB/RIF realiza de forma automatizada la integración del procesamiento de muestras, la multiplicación del ácido nucleico y la detección de las secuencias diana por medio de ensayos de PCR y PCR de transcriptasa inversa en tiempo real (Cepheid, 2010; PAHO, 2011).

Se utiliza un cartucho GeneXpert desechable para los reactivos y el proceso de PCR; este ensayo contiene reactivos para la detección de *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina, así como un control de procesamiento de muestra, el cual es utilizado para monitorear el correcto procesamiento de las bacterias diana y también para la supervisión de la presencia de inhibidores de la PCR. Por medio de la comprobación de sonda, se comprueba la correcta rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo. Se utilizan iniciadores que amplifican una porción del gen *rpoB* que contiene la región central de 81 pb; las sondas logran distinguir entre la secuencia salvaje conservada y las mutaciones de dicha región que se encuentra asociada a la resistencia a la rifampicina (Cepheid, 2010; Tessema, Beer, Emmrich, Sack,. & Rodloff, 2012).

La ventaja del método molecular de Xpert® MTB/RIF, es la simplicidad de la ejecución del mismo, ya que logra integrar y automatizar los tres procesos, desde la preparación de las muestras, la amplificación del ADN hasta la detección de la tuberculosis, los cuales son necesarios para el método molecular PCR en tiempo real, obteniendo resultados en un tiempo máximo de 2.5 horas. Además de ello, en la actualidad, el método Xpert® MTB/RIF es el único en su tipo que utiliza un cartucho que contiene todos los elementos necesarios para la reacción, tanto los reactivos liofilizados, amortiguadores líquidos como las soluciones de lavado (PAHO, 2011).

Entre las desventajas acerca del método Xpert® MTB/RIF se puede mencionar que presenta un elevado costo y que no detecta micobacterias de especies diferentes a las del complejo *M. tuberculosis*, ya que el ensayo es específico para este (Barriga, Solís, Aceves, López, Ramírez, y Monzalvo, 2014).

Los resultados de la prueba pueden verse afectados por la administración de un antibiótico concurrente o anterior, por lo que el éxito o el fracaso terapéutico no se puede evaluar con esta prueba ya que el ADN puede persistir tras el tratamiento. Es importante mencionar que las mutaciones de los iniciadores pueden llegar a afectar la detección de variantes de MDR-TB (*M. tuberculosis* multidrogo resistente) o cepas resistentes a la rifampicina, dando lugar a un resultado falso negativo (Cepheid, 2010).

En el año 2010, Boehme y colaboradores publicaron un estudio en donde utilizaron la técnica de Xpert® MTB/RIF con el objetivo de evaluar la sensibilidad y especificidad de dicha técnica en una población, comparándola con el método de referencia (cultivo) y baciloscopia. Se evaluaron 1730 muestras pulmonares de pacientes con sospecha de *M. tuberculosis* con resistencia/sensibilidad a los medicamentos, los cuales provenían de Perú, Azerbaijia y África del Sur. Entre los cultivos positivos, una prueba directa con Xpert® MTB/RIF detectó 551 de 561 pacientes con frote positivo (98.2%) y 124 de 171 pacientes con frote negativo (72.5%). Los autores llegaron a la conclusión que Xpert® MTB/RIF posee alta sensibilidad en la detección de tuberculosis y resistencia a la rifampicina cuando se realiza la detección de manera directa sobre la muestra de esputo, dando resultados en un tiempo menor a 2 horas con una manipulación manual mínima (Boehme, et al., 2010).

En otro estudio realizado por Marlowe y colaboradores (2011), se evaluó la técnica de Xpert® MTB/RIF para la detección de *M. tuberculosis* frente el uso del cultivo (estándar de oro) y el frote de esputo. El objetivo de dicho estudio, fue la evaluación del desempeño de GeneXpert® para la detección de *M. tuberculosis* en muestras respiratorias de pacientes residentes en los Estados Unidos así como la evaluación de la habilidad de dicha técnica para detectar la resistencia por parte de la micobacteria a la rifampicina en una población con baja prevalencia. La prueba de GeneXpert® detectó a *M. tuberculosis* en un 89% de los cultivos

positivos (98% con frote positivo y 72% con frote negativo) (Marlowe, Novak-Weekley, Cumpio, Sharp, Momeny, y Babst, 2011).

En el año 2011, Hillemann y colaboradores, evaluaron la eficiencia y confiabilidad del sistema Xpert® MTB/RIF para la detección de *M. tuberculosis* en muestras extrapulmonares y lo compararon con los métodos convencionales de cultivo. Se evaluaron 521 muestras extrapulmonares (91 orinas, 30 aspirados gástricos, 245 tejidos, 113 tejidos pleurales, 19 fluidos cerebrospinales y 23 heces). Se obtuvo una sensibilidad de 69% en la detección de la micobacterias en las muestras de tejido y un 100% en las muestras de heces y orina. De manera global, se determinó que esta técnica posee una sensibilidad de 77.3% y una especificidad de 98.2% (Hillemann, Rüsich, Boehnme & Richter, 2011).

Barriga y colaboradores, publicaron un estudio en el año 2014 en donde realizaron la comparación del empleo de una prueba rápida PCR y resistencia a la rifampicina utilizando la técnica de GeneXpert® MTB/RIF, con técnicas convencionales de tinción, cultivo y tipificación así como la sensibilidad antimicrobiana en una muestra de 693 pacientes con sospecha clínica de tuberculosis extrapulmonar, principalmente meníngea. Como resultados obtuvieron que el método más sensible fue el cultivo en el medio MGIT™ (86.12%), seguido de la prueba Xpert® MTB/RIF (73.2%). De manera general, esta última prueba mostró una sensibilidad y especificidad de 100% para *M. tuberculosis*, mostrando ventajas tales como la simplicidad de la técnica y su rapidez (Barriga et al., 2014).

C. Tratamiento

Existe un número limitado de medicamentos que actualmente se encuentran disponibles para el tratamiento de la tuberculosis, los cuales deben utilizarse de manera correcta para no generar resistencia. La resistencia, a uno o varios medicamentos, disminuye el éxito del tratamiento (Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, 2010).

Los fármacos que se administran durante un periodo de seis meses son la isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomycin, para que se logre la eliminación de

las distintas poblaciones bacilares, y evitar la aparición de recidivas. Estos fármacos son considerados de primera línea o de elección, en función de su eficacia y tolerabilidad; sin embargo, el tratamiento de pacientes tuberculosos tiene diversas dificultades. Una de ellas es que los bacilos solamente son sensibles a los fármacos bactericidas cuando están replicándose y se encuentran metabólicamente activos, además, existen poblaciones de bacilos, que se activan de modo transitorio durante periodos muy cortos. También pueden haber poblaciones de mutantes que sean farmacorresistentes, incluso en poblaciones de bacilos que nunca han estado previamente expuestas a los antibióticos (García, Lado, Tuñez, Pérez, Cabarcos, 2003).

La rifampicina es el único medicamento bactericida que actúa contra las tres poblaciones anteriormente mencionadas, mientras que la isoniazida, estreptomycin y otros aminoglucósidos son bactericidas que actúan contra los microorganismos que se encuentran en el medio extracelular. En lo que respecta a la isoniazida, esta también ejerce poder bactericida contra los bacilos intracelulares. La pirazinamida también puede actuar como bactericida de microorganismos intracelulares, actuando eficazmente en medio ácido de la fase inflamatoria de la enfermedad (primera fase o dos primeros meses). En lo que respecta a los medicamentos de segunda línea, los cuales son utilizados en los casos de tuberculosis resistente a medicamentos de primera elección, estos son utilizados como una alternativa en situaciones clínicas aisladas. Entre estos medicamentos se encuentran las fluoroquinolonas, capreomicina, protionamida, etionamida, kanamicina y rifabutina, los cuales poseen actividad bactericida. Otros medicamentos de segunda línea son el ácido paraaminosalicílico, cicloserina, clofazimina y macrólidos, los cuales a diferencia de los anteriores, poseen acción bacteriostática. La eficacia de los medicamentos antituberculosos depende de la dosis, la cual debe realizarse de acuerdo con el peso y la edad. De preferencia estos deben ser administrados en ayunas y en una sola toma y no debe ingerirse alimento hasta que hayan pasado 15-30 minutos (García et al., 2003).

1. Resistencia antibiótica

El desarrollo de resistencia de *M. tuberculosis* a los fármacos es un serio problema para que la enfermedad se pueda controlar globalmente, principalmente ante la aparición y

diseminación de cepas con resistencia a múltiples agentes antituberculosos en los últimos años. Según la OMS, en 2006 existieron cerca de medio millón de casos nuevos de tuberculosis resistente, al menos, a la isoniazida y rifampicina (multirresistencia o MDR-TB), por su causa mueren cada año alrededor de 1.7 millones de personas en el mundo. El Proyecto Mundial de Vigilancia de la Farmacorresistencia de la OMS y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias ha detectado tuberculosis multirresistente (prevalencia mayor al 4% de los nuevos casos de tuberculosis) en Europa Oriental, América Latina, África y Asia. Además, han surgido cepas con resistencia añadida a las fluoroquinolonas y a algún fármaco inyectable de segunda línea. Estas cepas extremadamente resistentes (XDR-TB) han sido notificadas en 45 países, siendo los más pobres donde existe una mayor incidencia (OMS, 2017; Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2010).

a. Tuberculosis multiresistente (MDR-TB)

Se le llama tuberculosis multidrogo resistente (MDR-TB, por sus siglas en inglés), cuando la micobacteria es resistente a por lo menos dos medicamentos, la isoniacida y la rifampicina, siendo estos dos los más poderosos para el tratamiento de esa enfermedad (CDC, 2012; Díaz, 2003).

b. Tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB)

Se le llama tuberculosis extremadamente resistente (XDR TB, por sus siglas en inglés) a un tipo de tuberculosis MDR relativamente poco común. La tuberculosis XDR se puede definir como una tuberculosis resistente a la isoniacida y a la rifampicina, así como a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (p.ej., amikacina, kanamicina o capreomicina). Ya que la tuberculosis XDR es resistente a los medicamentos más poderosos, los pacientes con esta enfermedad tienen menos opciones de tratamiento. Es aún más preocupante en los pacientes que presentan afecciones que afectan el sistema inmunitario, tal como el VIH, ya que tienen mayores posibilidades de enfermarse después de adquirir la enfermedad, y un mayor riesgo de muerte (CDC, 2012; Díaz, 2003).

La tuberculosis resistente puede presentarse tanto en pacientes nuevos (resistencia primaria) como en aquellos previamente tratados (resistencia secundaria). En la resistencia primaria, esta es adquirida directamente por contagio a partir de otros enfermos portadores de la misma. En el caso que los pacientes ya han sido previamente tratados, la resistencia pudo desarrollarse debido a la utilización de tratamientos inadecuados, ya sea por errores en el tratamiento, una mala adherencia, e incluso mala absorción intestinal. Otro de los factores que influyen es la falta de acceso al tratamiento o el mal estado de los fármacos, derivados de la pobreza en países subdesarrollados. Desde el punto de vista clínico, se sospecha de resistencia en todo caso de fracaso del tratamiento inicial o de recaída tras haber completado el mismo (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2010).

Existen diversos métodos de estudio de la sensibilidad a los fármacos antituberculosos. El método clásico o fenotípico, es el de las proporciones en medio sólido, en donde dependiendo del número de unidades formadoras de colonias que crecen en un medio con los fármacos estudiados y en un medio control, se puede considerar que una cepa es resistente, cuando el 1% del inóculo de la población bacteriana en estudio es resistente a una concentración prefijada de un determinado fármaco (Díaz, 2003; Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2010).

Los métodos automatizados basados en medios de cultivo líquido, tales como MGIT960, MB/BacT ALERT 3D, VersaTREK, entre otros; son más utilizados al tener una alta fiabilidad y rapidez. A pesar de que es posible realizar las pruebas de sensibilidad fenotípicas directamente a partir de una muestra con baciloscopia positiva, es aconsejable realizar la prueba sobre cultivos puros de *M. tuberculosis*. Estos métodos pueden detectar correctamente la multirresistencia a la isoniacida y rifampicina pero puede existir cierta variación entre los diferentes laboratorios respecto a la detección de resistencias para otros fármacos de primera línea como la pirazinamida, el etambutol o la estreptomycinina (Rosarys, Sardiñas, Garcia, Mederos y Díaz, 2014; Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2010).

En la actualidad, en la mayoría de países desarrollados, se realizan las pruebas de sensibilidad a los fármacos de primera línea en todos los aislamientos iniciales de cada paciente con

tuberculosis. Se han desarrollado métodos de detección rápida de la resistencia a partir de la muestra clínica, los cuales tienen ventajas en comparación con los métodos convencionales (mediante cultivos), tales como, el tiempo de detección que va de dos a cuatro días a partir del cultivo; entre estos métodos se encuentran la detección de bacteriófagos, siendo los métodos LRP (*Luciferase Reporter Phage Assay*) y el MAB (*Mycobacteriophage-Based Assay*) que han mostrado mayor utilidad clínica. Estos métodos detectan fielmente la resistencia a la rifampicina, sin embargo el rendimiento para la detección de resistencias a la isoniacida, el etambutol, la estreptomina y la pirazinamida puede variar (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2010).

Las técnicas moleculares basadas en la detección de mutaciones genéticas relacionadas con la resistencia fenotípica, posee ventajas para fármacos como la rifampicina, ya que es un marcador de multiresistencia. La principal desventaja acerca de los métodos moleculares, es que todavía no se conocen todas las mutaciones genéticas existentes, relacionadas con las resistencias a los fármacos de primera y segunda línea (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2010).

2. Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis se refiere al uso de uno o más fármacos antituberculosos en pacientes que presentan evidencia de poseer una infección latente, con el fin de evitar la progresión a una infección activa (Pérez, 2004). El tratamiento de elección es la isoniacida, en una dosis de 5 mg/kg/día por 6 meses, no excediendo los 300 mg/kg/día; a personas sanas que puedan estar infectadas (pero no enfermas) (Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, 2012).

La quimioprofilaxis se puede clasificar en:

- **Primaria** (prevención de la infección): se aplica en personas con Proteína Purificada Derivada o Tuberculosis (PPD) negativa, con el fin de evitar que adquieran la infección. Se realiza especialmente en recién nacidos y lactantes PPD negativos que no han sido vacunados y que viven con madres tuberculosas activas o personal de salud que ingresará a trabajar en lugares con alta complejidad de PDD negativa (Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, 2012).

- Secundaria (tratamiento de la infección): se aplica a niños asintomáticos que se encuentran en contacto con pacientes con tuberculosis y baciloscopía positiva (Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, 2012).

Se pueden utilizar los siguientes tratamientos en la quimioprofilaxis:

- Isoniazida: posee una efectividad del 60% para la prevención de tuberculosis activa. Se utiliza en dosis de 300 mg/día o 900 mg/2 veces por semana, durante 6 meses (65% de efectividad) a 12 meses (75% de efectividad). Puede producir hepatotoxicidad y neuropatía periférica (Laínez, Martínez, Costa y Rodríguez, 2010; Pérez, 2004).
- Rifampicina: se utiliza en dosis de 600 mg/día durante cuatro meses. Puede producir hepatotoxicidad, reacciones de hipersensibilidad con presencia de rash cutáneo y trombocitopenia; también puede mostrar interacción con otros fármacos (Méndez, Mellado, Baquero y García, 2012; Pérez, 2004).
- Rifampicina más pirazinamida: se utiliza rifampicina en dosis de 5 mg/kg/día (máximo 300 mg) más pirazinamida 15-20 mg/kg/día (máximo 2000 mg) día durante 2 meses. Puede producir hepatotoxicidad severa y elevación significativa de transaminasas, y en menor frecuencia se observa rash cutáneo, trombocitopenia o artralgias. Esta combinación resulta efectiva en pacientes VIH positivos co-infectados con tuberculosis (Pérez, 2004).

D. Epidemiología en Guatemala

El Programa Nacional Contra la Tuberculosis (PNCT) en Guatemala, notificó que para el año 2013 el número de casos de tuberculosis reportados fue de 1119, 3224 casos para el 2014 y 3381 casos en el año 2015. De estos casos el 57% corresponde al sexo masculino y un 43% al sexo femenino. En ese mismo año, se reportó un 93% de tuberculosis pulmonar con una incidencia de 29 por cada 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 2% sin incluir pacientes con VIH (OMS, 2017). Es importante mencionar que el 38% de los casos reportados para Guatemala, se encuentran concentrados en el departamento de Escuintla y la ciudad capital. De acuerdo a las edades, el 79% de los casos están comprendidos entre los 15

a 64 años de edad y el 7% se encuentra por debajo de los 10 años de edad (García, 2015; Reyes 2012).

Según el PNCT, cada año se identifican tres mil casos nuevos debido a la asociación de esta enfermedad con las condiciones socioeconómicas de la población. Así mismo, indica que las personas no diagnosticadas a tiempo, diseminan la enfermedad y pueden adquirir resistencia a los fármacos utilizados para el tratamiento. En Guatemala, los departamentos con más riesgo de transmisión y mayor número de casos confirmados son: Escuintla, San Marcos, Quetzaltenango, Retalhuleu e Izabal (OMS, 2016).

En el Hospital General San Juan de Dios, para la detección del complejo *M. tuberculosis*, se utilizan las técnicas de tinción de Zhiel-Neelsen, cultivo en medio sólido (Löwenstein-Jensen) y medio líquido (MGIT™). Sin embargo, los cultivos presentan la desventaja de que tardan aproximadamente de 15 a 45 días para brindar un resultado (Palomino, Cardoso, & Ritacco, 2007). En el Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH) existe el protocolo general para procesamiento de muestras (Anexo 2), donde se establece que toda muestra que ingrese con una orden médica solicitando al menos una prueba para el diagnóstico de tuberculosis, se le debe realizar las pruebas complementarias establecidas en dicho protocolo, con la finalidad de proporcionar un diagnóstico más certero al paciente (Hospital General San Juan de Dios, 2016).

El ATBH recibió 1185 muestras en el año 2013 para el diagnóstico de tuberculosis, 1441 durante el 2014 y 1085 en el año 2015, de las cuales 753 correspondían a muestras pulmonares y 332 a extrapulmonares, diagnosticando un total de 56 casos como positivos. El hospital realiza en promedio 90 cultivos mensuales y cabe mencionar que aún no existen datos epidemiológicos actualizados del año 2016 (Hospital General San Juan de Dios, 2017).

A partir del año 2015, el Hospital adquirió una nueva tecnología de diagnóstico (GeneXpert® MTB/RIF), que permite la detección de *M. tuberculosis* en un tiempo promedio de 2.5 horas mediante la técnica de PCR en tiempo real, además de detectar si existe resistencia al fármaco

rifampicina. Es importante mencionar que en ese año, no se trabajó ninguna muestra con Xpert® MTB/RIF (Hospital General San Juan de Dios, 2017).

E. Verificación de los procedimientos analíticos

La Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) es el Organismo Nacional de Normalización que actúa como representante de Guatemala ante la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés), y realiza el proceso de normalización a través de Comités Técnicos de Normalización (CTN).

La Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA), fue creada por medio del Acuerdo Gubernativo No. 145-2002; esta oficina se encarga de la evaluación, control e idoneidad de los organismos de evaluación de la conformidad. Según la *Ley del Sistema Nacional de la Calidad*, a través del Decreto N. 78-2005, la OGA es un componente del Sistema Nacional de Calidad del Ministerio de Economía. De acuerdo a la OGA, los organismos de inspección, laboratorios de calibración y laboratorios de ensayo (incluyendo los que realizan análisis clínico), deben ser asignados a evaluación para su acreditación (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018).

La Norma Técnica Guatemalteca (NTG) ISO/NTG 15189:2012, fue realizada por el Comité Técnico ISO/TC 212, dirigida a ensayos de laboratorio clínico y sistemas de ensayo diagnóstico *in vitro*. Se encuentra basada en las normas ISO/IEC (Comisión Eléctrica Internacional, por sus siglas en inglés) 17025 e ISO 9001, las cuales especifican los requisitos para la competencia y la calidad de los laboratorios clínicos (Norma Técnica Guatemalteca 15189: 2012, 2013), es utilizada para la evaluación de calidad y competencia de laboratorios clínicos para establecer que los procedimientos de análisis validados por los fabricantes y usados sin modificación, se encuentren sujetos a la verificación independiente por parte del laboratorio, antes de su puesta en uso rutinario (Comisión Guatemalteca de Normas, 2012).

El laboratorio con el objetivo de realizar la verificación independiente deberá obtener información del fabricante acerca del método utilizado, para evaluar y confirmar que las características del desempeño del procedimiento de análisis son satisfechas, las cuales

deberán ser pertinentes al uso previsto de los resultados del análisis (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018).

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la tuberculosis sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública alrededor del mundo, en el 2014 se reportaron 9.6 millones de casos con 1.5 millones de defunciones debidas a la enfermedad (1.1 millones eran VIH negativo y 0.4 millones VIH positivo). De los 9.6 millones de casos reportados, se estima que al menos 480 000 fueron diagnosticados como multidrogo resistentes (MDR) (resistencia simultánea a la isoniacida y rifampicina) y solamente el 25% de los casos fueron reportados. En Guatemala, para el 2015 la tasa de incidencia de tuberculosis fue de 21 casos por 100 000 habitantes y se considera que en el país el porcentaje de diagnóstico es del 34% (World Health Organization, 2015).

En Guatemala, las técnicas de referencia utilizadas para el diagnóstico de *M. tuberculosis* son la tinción de Ziehl-Neelsen y el cultivo en medio sólido Löwenstein-Jensen (estándar de oro). Estas metodologías tienen la desventaja de ser poco sensibles (Ziehl-Neelsen) y muy lentas para el diagnóstico (Löwenstein-Jensen).

Aunque la mayoría de casos de tuberculosis son pulmonares, el 14% son extrapulmonares, para los cuales el diagnóstico es aún más difícil y el tiempo para el mismo debería ser corto debido a la severidad de la infección. Es por eso que en la actualidad son cada vez más frecuentes los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la tuberculosis.

En nuestro país algunos centros hospitalarios públicos y privados utilizan la prueba de PCR en tiempo real Xpert® MTB/RIF del sistema GeneXpert (Cepheid, EUA) para la detección molecular del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina en muestras pulmonares y extrapulmonares tales como biopsias, líquido corporales (cefalorraquídeo, pleural, peritoneal), heces u orina. Sin embargo, no existen datos que permitan comparar su desempeño frente a las pruebas de referencia o estándar de oro bajo las condiciones locales de trabajo.

La importancia de verificar el desempeño de la técnica de PCR en tiempo real (Xpert® MTB/RIF) radicó en corroborar si las especificaciones brindadas por el fabricante en los estudios de validación se cumplían en las condiciones de trabajo en el Área de Tuberculosis y Hongos del Hospital General San Juan de Dios, así como se evaluó el uso de la prueba en muestras extrapulmonares.

La verificación se llevó a cabo a través de la comparación de la prueba molecular contra el estándar de oro (cultivo) del que se obtuvo y analizaron los datos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice de Kappa. Todo esto permitió el uso confiable de una prueba más rápida, fácil de interpretar y que al mismo tiempo brindara un diagnóstico más certero de la enfermedad, lo que facilitará al paciente un tratamiento apropiado y oportuno, disminuyendo los costos de estancia hospitalaria y complicaciones severas de pacientes que no reciben un tratamiento en el momento pertinente (Guglielmone, de Elías, Kiener, Collino & Barzón, 2011).

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Evaluar una técnica de PCR en tiempo real (Xpert® MTB/RIF) para el diagnóstico molecular del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina, en comparación con el estándar de oro (cultivo).

B. Objetivos específicos

1. Determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice de concordancia Kappa de la metodología Xpert® MTB/RIF para muestras pulmonares en comparación con el estándar de oro.
2. Determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice de concordancia Kappa de la metodología Xpert® MTB/RIF para muestras extrapulmonares en comparación con el estándar de oro.
3. Evaluar la detección de resistencia a la rifampicina por el método Xpert® MTB/RIF *vs* el método MGIT™, a través de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Muestras pulmonares y extrapulmonares que ingresen al Área de Tuberculosis y Hongos del Hospital General San Juan de Dios para diagnóstico de tuberculosis.

B. Muestra

Se recolectaron 523 muestras durante los meses de marzo, abril y mayo del año 2018, en las cuales se incluyeron muestras pulmonares (esputo, aspirado orotraqueal, aspirado bronquial, lavado bronquial, cepillado bronquial, líquido pleural, biopsia y absceso pulmonar) y extrapulmonares (orina, líquido cefalorraquídeo, lavado gástrico, aspirado gástrico, líquido pericárdico, peritoneal y gástrico, biopsias, secreciones y muestras ganglionares) que ingresaron al Área de Tuberculosis y Hongos, provenientes de pacientes con sospecha de padecer tuberculosis.

1. Criterios de inclusión

- Muestras pulmonares y extrapulmonares que cumplieran con el protocolo establecido en el área (Anexo 2) y que poseían una orden médica.
- Pacientes que accedieron a participar en el estudio, mediante su aprobación por el consentimiento informado, cuando no fue solicitada la prueba de PCR en tiempo real en la orden médica (Anexo 3).

2. Criterios de exclusión

- Muestras que no eran representativas por volúmenes insuficientes para realizar la metodología Xpert® MTB/RIF.
- Muestras de pacientes que previamente recibieron tratamiento antibiótico contra tuberculosis.

C. Recursos

1. Recursos humanos

a. Seminaristas

- Br. Cindy Carolina Rocío Villalobos Morales
- Br. Sofía Maribel Soberanis López
- Br. Brenda Elizabeth Guzman Escobar

b. Asesores

- M.A. Isabel Cristina Gaitán Fernández
- Lic. César Roberto Conde Pereira
- Licda. Carmen Julia Mazariegos Herrera

2. Recursos institucionales

- Laboratorio del Área de Tuberculosis y Hongos del Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios.
- Unidad de Investigación en Inmunología y Hematología, Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

3. Recursos físicos

a. Material de laboratorio

- Algodón
- Asa en argolla estéril
- Bata
- Balón volumétrico de 500 mL
- Caja para transportar material
- Cronómetro
- Fosfóros

- Frasco ámbar
- Frasco de vidrio con rosca (capacidad de 1 litro)
- Gotero
- Gradilla
- Guantes de látex
- Marcador
- Mascarilla N95
- Papel filtro
- Papel indicador de pH
- Papel Kraft
- Perlas de vidrio (3 mm de diámetro)
- Pinzas
- Pipetas calibradas de 10-200 μ L
- Pipetas calibradas de 1000 μ L
- Pipetas desechables
- Piseta con agua corriente
- Portaobjetos
- Puntas desechables para pipetas
- Tubos cónicos de 20 mL
- Tubos para centrífuga
- Tubos para centrífuga de 1.5 mL

b. Equipo

- Aire acondicionado
- Autoclave
- Cabina de bioseguridad biológica nivel III
- Centrífuga
- Computadora
- Equipo BD MGIT™ 960
- Escáner de código de barras
- Gradillas AST para equipo BD MGIT™ 960

- Incubadora (37 °C)
- Impresora
- Mechero
- Microscopio
- Refrigeradora (2-8 °C)
- Sistema GeneXpert Dx equipado con el software GX2.1
- Vortex

c. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Agua desmineralizada
- Antibióticos SIRE (Estreptomicina, Isoniacida, Rifampicina y Etambutol)
- Azul de metileno
- Buffer de fosfatos estéril
- Cajas petri con agar sangre de carnero al 5%
- Cajas petri con agar tripticasa soya con 5 % de sangre de carnero
- Carbolfucsina (Fucsina fenificada)
- Cartucho Xpert® MTB/RIF
- Cepa *M. tuberculosis* ATCC® 25177™
- Estándar de McFarland 0.5 (equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL) y 1 (equivalente a 3.0×10^8 UFC/mL)
- Frasco con Mycoprep™ (N-acetil-L-cisteína-NaOH)
- Medio de cultivo Löwenstein Jensen
- Reactivo de muestra (Hidróxido de sodio e isopropanol)
- Solución de Alcohol ácido al 3%
- Solución salina estéril
- Suplemento antibiótico BD MGIT™ PANTA
- Suplemento BACTEC™
- Tubo con caldo MGIT™

D. Procedimiento

1. Recepción de muestras

La recepción de muestras se llevó a cabo en el Área de Tuberculosis y Hongos del Laboratorio Clínico, Hospital General San Juan de Dios. Posterior a ello, se verificó en la orden médica si se solicitaban al menos una de las siguientes pruebas: tinción de Zhiel-Neelsen, PCR en tiempo real, cultivo (Löwenstein Jensen y MGIT™). Así mismo, se obtuvo el consentimiento informado por parte del paciente o familiares del mismo, para aquellos donde no se solicitaba la prueba de PCR en tiempo real.

2. Procesamiento de muestras

A cada muestra que ingresó al área y que cumplía con los criterios de inclusión, se le realizaron las siguientes pruebas rutinarias para el diagnóstico de tuberculosis:

a. Proceso de decontaminación y digestión de la muestra

Se realizó este proceso previo a la inoculación en medio MGIT™, Löwenstein-Jensen y metodología Xpert® MTB/RIF.

i. Preparación de reactivos

Buffer de fosfatos

- En un balón volumétrico de 500 mL se vació el contenido de un sobre de buffer de fosfato.
- Se aforó con agua desmineralizada hasta 500 mL.
- Se transfirió solución a un frasco de vidrio de 1 litro.
- Sin enroscar, se autoclaveó solución a 121 °C por 15 minutos.
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se apretó la tapa.

Mycropep™

- Con cuidado de no derramar, se rompieron ampollitas del frasco Mycoprep™ (N-acetil-L-cisteína-NaOH).

- ii. Decontaminación de la muestra (en campana de flujo laminar)
 - Se adicionó volumen a volumen al tubo de la muestra (expectoración, orina y líquidos con volumen mínimo de 5 mL) las ampollitas de Mycoprep™.
 - Se centrifugó a 3000 rpm (revoluciones por minuto) en centrífuga por 15 minutos.
 - Luego, se decantó en contenedor para desechos biológicos y se trabajó con el sedimento.
 - Se agitó en vortex el sedimento por 30 segundos y se dejó reposar 15 minutos, agitando cada 5 minutos.
 - Se agregó buffer de fosfatos estéril; ajustando a 50 mL.
 - Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos.
 - Luego se decantó y se agitó el sedimento para realizar un frotis con tinción de Zhiel-Neelsen.
 - Por último, se ajustó el pH a 6.8 con solución de buffer y papel indicador.

- iii. Control de calidad
 - Se realizó control de calidad en caja petri de agar sangre, a través de la técnica de estriado con un asa en argolla estéril.
 - Se incubó durante 48 horas a 37°C.
 - Se verificó crecimiento bacteriano, de ser así, se repetía de nuevo el proceso de decontaminación.

b. Cultivo en medio Löwenstein-Jensen

- i. Inoculación en medio Löwenstein-Jensen
 - Se rotuló la muestra previamente decontaminada y medio Löwenstein-Jensen.
 - Se colocó 1 gota de muestra en la parte inferior del tubo con el medio.
 - Se colocó 1 gota de muestra en la parte media del tubo con el medio.

- Se colocó 1 gota de muestra en la parte superior del tubo con el medio.
 - Se dejó el tubo en posición horizontal por 24 horas en incubadora a 37°C.
 - Por último, se colocó el tubo en posición vertical y se incubó a 37°C por 28-45 días.
- ii. Control de calidad
- Control de crecimiento (control positivo): se reconstituyó la cepa *M. tuberculosis* (ATCC® 25177™) en un tubo de caldo MGIT™ y se inoculó en un medio estéril Löwenstein Jensen. Luego se colocó el tubo en posición vertical y se incubó a 37°C por 28-45 días. Por último, se verificó crecimiento de colonias típicas de *M. tuberculosis* (ver interpretación de resultados).
 - Control de esterilidad (control negativo): se incubó un tubo de medio Löwenstein Jensen a 37°C por 28 días. Se verificó que no existiera crecimiento durante el tiempo de incubación.
- iii. Interpretación de resultados
- Crecimiento de *M. tuberculosis*: se observaron colonias de color blanco cremoso, secas, de aspecto rugoso, de forma esférica, de dimensiones variables.
- iv. Reporte de resultados
- Crecimiento de *M. tuberculosis*: del cultivo se aisló *M. tuberculosis complex*. Nota: la especie se reporta luego de realizar una tinción Zhiel-Neelsen seguido de la metodología Xpert® MTB/RIF debido a que éste es capaz de identificar únicamente el complejo *complex*. Si en la metodología Xpert® MTB/RIF el resultado es negativo a pesar de observar BAAR en el la tinción Zhiel-Neelsen, se reporta solamente como *M. tuberculosis*.

- No crecimiento de *M. tuberculosis*: el cultivo para micobacterias no revela crecimiento.

c. Cultivo en medio MGIT™

- i. Preparación suplemento antibiótico PANTA™ (en campana de flujo laminar)
 - Se agregaron 15 mL de suplemento de crecimiento BACTEC MGIT™ a un tubo de suplemento antibiótico PANTA™ liofilizado y agitar.
 - Se almacenó en frasco ámbar para proteger de la luz en refrigeración, anotándose la fecha.

- ii. Inoculación de tubo MGIT™
 - Se rotuló tubo respecto al número de la muestra y fecha.
 - Luego se agregaron 0.8 mL de suplemento antibiótico PANTA™ preparado. Para obtener mejores resultados, se adicionó la mezcla antes que la muestra.
 - Se agregó 0.5 mL de la muestra concentrada y decontaminada previamente, tapando el tubo y mezclando por vortex.
 - Se cerró el tubo para mezclar muy bien por rotación.
 - Por último, se ingresó el tubo al equipo BD MGIT™ 960.

- iii. Control de calidad
 - Control de crecimiento (control positivo): posterior a reconstituir la cepa *M. tuberculosis* (ATCC® 25177™), se inoculó en un tubo de caldo MGIT™ de acuerdo al inciso ii (inoculación de tubo MGIT™) y se ingresó al equipo BD MGIT™ 960.
 - Control de esterilidad (control negativo): se agregaron 0.8 mL de suplemento antibiótico PANTA™ a un tubo de medio MGIT™ y se ingresó al equipo BD MGIT™ 960.

iv. Interpretación de resultados

- Crecimiento de *M. tuberculosis*: al existir un tubo positivo en la posición indicada, el equipo reportó por medio de alarma y encendió una luz verde. Nota: se reporta el crecimiento después de verificarlo con tinción Zhiel-Neelsen a partir del tubo positivo y seguido de la metodología Xpert® MTB/RIF, ya que éste identifica únicamente el complejo *complex*. Si en la metodología Xpert® MTB/RIF el resultado es negativo a pesar de observar BAAR en el la tinción Zhiel-Neelsen, se reporta solamente como *M. tuberculosis*.
- No crecimiento de *M. tuberculosis*: los cultivos negativos se reportaron después de completar el protocolo de incubación del equipo (42 días). Los cultivos contaminados se descartaron, después de confirmar la contaminación por Zhiel-Neelsen al no observar BAAR o cultivo en Löwenstein-Jensen con colonias no características de *M. tuberculosis*.

v. Reporte de resultados

- Crecimiento de *M. tuberculosis*: del cultivo se aisló *M. tuberculosis complex*.
- No crecimiento de *M. tuberculosis*: el cultivo para micobacterias no revela crecimiento.

d. Tinción Zhiel-Neelsen

i. Procedimiento

- Se realizó extendido en lámina portaobjetos y se dejó secar.
- Se fijó extendido, mediante calentamiento suave, flameándolo sobre la llama del mechero; repitiendo 3 veces esta acción.
- Se colocó un trozo de papel filtro sobre extendido para agregar el colorante fuscina que cubrió la totalidad del frote por 5 minutos.

- Luego, se flameó por debajo del portaobjetos hasta el desprendimiento de vapores blancos (evitando producir ebullición por exceso de calor).
- Se dejó enfriar 5 minutos y se repitió el flameado hasta nuevo desprendimiento de vapores blancos. Luego se dejó enfriar 5 minutos. Cuando ya se encontraba frío, mediante el uso de pinzas, se quitó y descartó el papel de filtro.
- Se lavó con agua corriente y se cubrió con alcohol ácido al 3% durante 2 minutos.
- Después se lavó con agua corriente y luego se cubrió con azul de metileno durante 1 minuto. Se lavó con agua corriente.
- Se inclinó el portaobjeto hasta drenar el exceso de agua. Finalmente, se colocó cada portaobjetos en una gradilla para que secan al aire.
- Por último, se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la lámina y se observó al microscopio en el objetivo de 100x.

ii. Control de calidad

- Se realizó extendido en lámina portaobjetos a partir de una colonia de *M. tuberculosis* obtenida de la cepa ATCC® 25177™, siendo ésta la lámina control.
- Luego se teñió con la técnica Zhiel-Neelsen la lámina control así como los demás extendidos obtenidos.
- Se verificó el buen estado de los reactivos. Para esto, se debía observar un fondo de color azul y bacilos teñidos de color rojo a fucsia en la lámina control, y en los demás extendidos en los que exista la presencia de *M. tuberculosis*.

iii. Interpretación de resultados

- Presencia de BAAR: el fondo de la lámina se observó de color azul y bacilos teñidos de color rojo-fucsia.

iv. Reporte de resultados

- Presencia de BAAR: se observó BAAR y la cantidad de bacilos se indicó por cruces (Anexo 1).
- Ausencia de BAAR: no se observó BAAR.

e. Método Xpert® MTB/RIF

i. Preparación de la muestra

- Se identificó correctamente cada tubo cónico y cartucho Xpert® MTB/RIF con el número de muestra. En el caso del cartucho, se realizó en los laterales del mismo, evitando tocar el área del código y tapa.
- Luego se agregó como mínimo 1 mL de muestra en un tubo cónico.
- Se agregó la misma cantidad de reactivo que de muestra dentro del tubo cónico, para obtener una relación 1:1.
- Se agitó el tubo cónico 20 veces (de arriba hacia abajo) y se esperaron 10 minutos.
- Después se agitó nuevamente y se esperaron 5 minutos.
- Con la pipeta desechable y calibrada, se aspiró muestra hasta que el menisco se encontrara por encima de la marca del volumen mínimo.
- Por último, se abrió la tapa del cartucho y se transfirió la muestra al interior del puerto abierto del mismo; cerrando tapa.

ii. Preparación del equipo

- Se encendió el aire acondicionado del área de trabajo.
- Se encendió el equipo Xpert® MTB/RIF y luego la computadora.
- Se accedió a internet y se ingresó al software GeneXpert® Dx.
- Se seleccionó “Create Test”, y se escaneó el código del cartucho, ingresando datos de la muestra y seleccionando “Start Test”.
- Luego se abrió la puerta del módulo del equipo mientras la luz verde se encontraba parpadeando; para colocar el cartucho.

- Se cerró la puerta del módulo y se esperó a que la prueba iniciara y la luz verde dejara de parpadear.
- Se esperaron dos horas, hasta que terminara la prueba y la luz verde se apagara.
- Se esperó a que el equipo desbloqueara el cierre de la puerta; para luego abrirla y sacar el cartucho, desechándolo en bolsa roja.
- Por último se apagó el equipo, computadora y aire acondicionado cuando se finalizó el trabajo.

iii. Control de calidad

- Cada prueba incluyó dos controles que garantizaban el resultado: control de procesamiento de muestras (Sample Processing Control, SPC) y comprobación de sonda (Probe Check Control, PCC).
- El SPC contenía esporas no infecciosas desecadas en cada cartucho para comprobar el adecuado procesamiento de *M. tuberculosis* y si el proceso de la muestra era correcto. Además, este control también detectaba la inhibición asociada a muestras del ensayo PCR en tiempo real.
- En una muestra negativa, el SPC debía ser positivo y podía ser negativo o positivo en una muestra positiva. El resultado de la prueba sería “no válido” si el SPC no era detectado en una prueba negativa.
- Antes de que iniciara la reacción en cadena de la polimerasa, el sistema GeneXpert® Dx midió la señal de fluorescencia de las sondas para controlar la rehidratación de las perlas, el llenado del tubo de reacción, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo. La PCC fue correcta, ya que cumplía con los criterios de aceptación asignados.

iv. Interpretación de los resultados

Se seleccionó la opción “View Results” seguido del número de muestra para visualizar resultados. Se observó una gráfica y dos de las siguientes opciones:

- MTB *Detected* (MTB detectado): se detectó el ADN del complejo *Mycobacterium*. El resultado se mostró como alto, medio, bajo o muy bajo, dependiendo del valor Ct (ciclo umbral) del MTB diana presente en la muestra.
- MTB *Not Detected* (MTB no detectado): no se detectó el ADN de MTB.
- RIF *Resistance Not Detected* (Resistencia a rifampicina no detectada): no se detectó el ADN de resistencia a rifampicina.
- La resistencia a rifampicina se mostró como:
 - RIF *Resistance Detected* (Resistencia a rifampicina detectada): se detectó una mutación en el gen *rpoB*.
 - RIF *Resistance Indeterminate* (Resistencia a rifampicina indeterminada): la concentración de MTB era muy baja y no se logró determinar la resistencia.
 - RIF *Resistance Not Detected* (Resistencia a rifampicina no detectada): no se detectó ninguna mutación en el gen *rpoB*.

v. Reporte de resultados:

- Presencia de *M. tuberculosis* y resistencia positiva: se ha detectado ADN de *M. tuberculosis complex* y resistencia a rifampicina.
- Ausencia de *M. tuberculosis*: no se ha detectado ADN de *M. tuberculosis complex*.
- Presencia de *M. tuberculosis* y susceptibilidad positiva: se ha detectado ADN de *M. tuberculosis complex* y susceptibilidad a rifampicina.

f. Sensibilidad antibiótica para *M. tuberculosis* en MGIT™

- i. Muestra a partir de un tubo MGIT™ positivo.
 - El día en que el equipo indicó que existía un tubo positivo, éste se identificó como: día 0 (se dejó el tubo dentro del equipo por lo menos un día más).
 - Si el tubo era día 1 o día 2; se pasó directamente a la preparación antibiótica SIRE (inciso ii).
 - Si el tubo era día 3 al día 5; se diluyó 0.2 mL del caldo positivo del tubo MGIT™ con 0.8 mL de solución salina estéril o agua destilada estéril, para luego seguir con la preparación antibiótica SIRE.

- ii. Muestra desde medio sólido positivo.
 - A partir de la cepa obtenida del medio sólido Löwenstein-Jensen con crecimiento menor o igual a 14 días, se realizó una suspensión superior al 1.0 del estándar de turbidez de McFarland (equivalente a 3.0×10^8 UFC/mL), también se podía realizar con el medio Middlebrook de un tubo MGIT™ usando de 8-10 perlas de vidrio.
 - Se mezcló con vortex durante 2-3 minutos.
 - Luego se dejó sedimentar la masa bacteriana durante 20 minutos.
 - Se transfirió el sobrenadante en otro tubo estéril vacío, dejando reposar por 15 minutos.
 - Se transfirió el sobrenadante en otro tubo estéril vacío y se ajustó turbidez de 0.5 del estándar de McFarland (equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL).
 - Luego se diluyó 0.2 mL del caldo positivo del tubo MGIT™ con 0.8 mL de solución salina estéril o agua destilada estéril. Esta suspensión fue utilizada para los procedimientos siguientes, identificándola como tubo positivo.

- iii. Preparación de antibiótico SIRE
- Se reconstituyó cada frasco de antibiótico adicionando 4 mL de agua estéril.
 - Se almacenaron a -20°C hasta por 6 meses antes de fecha de caducidad. Nota: una vez descongelado no se podía congelar nuevamente.
- iv. Preparación de suspensión de control de crecimiento (CC)
- A partir de muestras del día 1-2 o la dilución 1:5 (tubos de 3 a 5 días), se prepararon 100 μL del tubo positivo y se adicionaron a un tubo con 10 mL de agua destilada o solución salina estéril para una dilución 1:100.
- v. Inoculación para análisis de sensibilidad a partir de un tubo positivo MGITTM (Anexo 4)
- Se rotularon 5 tubos MGITTM:
 - a. Tubo CC (sin antibiótico)
 - b. Tubo S: Estreptomina
 - c. Tubo I: Isoniacida
 - d. Tubo R: Rifampicina
 - e. Tubo E: Etambutol
 - En la campana de flujo laminar, se agregó a cada tubo 800 μL de suplemento BACTEC MGITTM SIRE.
 - Se añadió 100 μL de antibiótico al tubo correspondiente, sin agregar al tubo CC, utilizando una punta diferente para cada antibiótico y homogenizando por inversión.
 - Al tubo CC, se le agregó 500 μL de suspensión de control de crecimiento y se mezcló por inversión.
 - Se agregó 500 μL del tubo positivo a cada tubo SIRE. Se cerraron y mezclaron por inversión.

- Se colocaron los tubos en la gradilla AST, en orden de izquierda a derecha. Colocando en la primera posición el CC y luego el SIRE.
- Por último, se cargó la gradilla leyendo el código de barra en equipo MGIT™ 960.

vi. Control de calidad

- Se realizó extendido de 0.1 mL del CC en agar tripticasa soya con 5% sangre de carnero.
- Luego se incubó a 37°C por 48 horas.
- Por último, se verificó que no existiera crecimiento bacteriano a las 48 horas. Si la placa no mostraba crecimiento bacteriano, se continuaba con el análisis de sensibilidad. Si mostraba crecimiento bacteriano, se procedía a desechar el conjunto de tubos para la sensibilidad SIRE y se repetía el análisis con cultivo puro.

vii. Interpretación de resultados

- Si el equipo detectó crecimiento en uno o más tubos con antibióticos SIRE, éste lo interpretó como resistente al antibiótico correspondiente.
- Si no se detectó crecimiento en algún tubo SIRE, se interpretó como sensible al antibiótico correspondiente. Nota: BACTEC MGIT™ 960, monitorea constantemente la fluorescencia de los tubos en términos de Unidades de Crecimiento (GU, *Growth Units*, por sus silgas en inglés). El CC posee un GU >400 entre los días 4-13 de incubación. Cuando el equipo detecta un GU >100, este lo interpreta como Resistente, y cuando detecta un GU <100, lo interpreta como Susceptible.
- Cuando el CC se detectaba positivo en menos de 4 días o permanecía positivo luego de 21 días, el equipo detectaba un error en la lectura reportándolo como inválido y debía repetirse la prueba.

viii. **Reporte de resultados**

Los resultados obtenidos por MGIT™ 960 fueron cualitativos, y se expresaron como Sensible o Resistente.

- Presencia de *M. tuberculosis* y resistencia positiva: del cultivo se aisló *M. tuberculosis*, resistencia positiva al antibiótico indicado por el equipo.
- Presencia de *M. tuberculosis* y sensibilidad positiva: del cultivo se aisló *M. tuberculosis*, sensible al antibiótico indicado por el equipo.

E. Diseño de Investigación

1. Tipo de estudio

Estudio para la evaluación de pruebas diagnósticas, de tipo descriptivo/transversal y prospectivo.

2. Muestreo

El diseño de muestreo para la presente investigación fue probabilístico, prospectivo utilizando las muestras que llegaron al Área de Tuberculosis y Hongos y que cumplieron con los criterios de inclusión.

3. Análisis estadístico

Para conocer el número de muestras a trabajar, se utilizó el programa estadístico EPIDAT 3.1, obteniendo un número mínimo de muestras a analizar de 156. Los datos de las muestras así como los resultados obtenidos, fueron ingresados en una base de datos en Microsoft Excel; posteriormente los resultados fueron analizados en el programa EPIDAT 3.1.

Para el presente estudio fueron analizadas 523 muestras, cantidad obtenida durante el periodo de muestreo, comprendido entre los meses de marzo a mayo del año 2018, superando así la cantidad de muestras mínima necesaria para este estudio. Para evaluar la metodología Xpert®

MTB/RIF vs el estándar de oro (cultivo en medio sólido y/o líquido, Löwenstein Jensen y MGITTM respectivamente), se calcularon los siguientes indicadores: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice de concordancia Kappa con un 95% de confianza; y para la evaluación de la resistencia a la rifampicina, solamente se utilizaron los primeros cuatro indicadores anteriormente mencionados. Es importante mencionar que las muestras procedentes del mismo paciente fueron analizadas como independientes en este estudio.

Los valores de sensibilidad y especificidad fueron calculados a través de tablas de contingencia en el programa estadístico EPIDAT 3.1, al igual que los valores predictivos positivos y negativos. El índice de concordancia Kappa fue calculado a través de la fórmula establecida en dicho programa.

VII. RESULTADOS

Se recolectaron 523 muestras provenientes de pacientes con sospecha de tuberculosis en el Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH) del Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD). Las muestras fueron clasificadas en pulmonares (n= 171) y extrapulmonares (n= 352) siendo éstas últimas las de mayor frecuencia. De las muestras pulmonares las más representativas corresponden a esputos (n= 145); el resto incluyó aspirados orotraqueales (n= 15), lavados bronquiales (n= 4), entre otros. Por otro lado, el líquido cefalorraquídeo (LCR) (n= 125) fue la muestra más frecuente entre las extrapulmonares, seguido del líquido peritoneal (n= 82), líquido pleural (n= 76), orina (n= 24), y otros tipos de muestras con una cantidad menor a diez (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de las muestras pulmonares y extrapulmonares recolectadas.

Muestra	Número de muestra (n)	%
Pulmonares		
Esputo	145	27.72
Aspirado orotraqueal	15	2.87
Lavado bronquial	4	0.76
Otros ¹	7	1.34
Total	171	32.70
Extra Pulmonares		
Líquido cefalorraquídeo	125	23.91
Líquido peritoneal	82	15.68
Líquido pleural	76	14.53
Orina	24	4.59
Biopsias	10	1.91
Lavado gástrico	8	1.53
Abscesos	6	1.15
Secreciones	6	1.15
Líquido pericárdico	4	0.76
Otros ²	11	2.10
Total	352	67.30
Total de muestras	523	100

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del Laboratorio Clínico del HGSJDD.

¹: Otros incluye: absceso pulmonar, aspirado bronquial, aspirado traqueal, biopsia bronquial, lavado alveolar, masa intrapulmonar y secreción de tráquea.

²: Otros incluye: Aspirado gástrico, ganglio, grano por tejido, hueso, lesión, líquido gástrico, líquido sinovial, tejido y úlcera.

El análisis de los resultados para la evaluación de la técnica Xpert® MTB/RIF, se realizó a través de indicadores de desempeño como: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) e índice de Kappa (Anexo 5 y 6). La sensibilidad para muestras pulmonares fue de 95.65% (IC_{95%} = 85.14 – 100.00), siendo mayor en comparación con extrapulmonares (68.75%, IC_{95%} = 42.91 – 94.59) y la agrupación de ambas (84.62%, IC_{95%} = 72.01 – 97.22) (pulmonares y extrapulmonares).

La mayor especificidad se obtuvo al analizar las muestras extrapulmonares con un 90.18% (IC_{95%} = 86.85 – 93.51), en contraste para el total de muestras con 89.05%, (IC_{95%} = 86.16 – 91.93), y las muestras pulmonares presentaron la menor especificidad con 86.49% (IC_{95%} = 80.64 – 92.33). En las muestras pulmonares el VPP fue de 52.38% (IC_{95%} = 36.09 – 68.68), y el VPN de 99.92% (IC_{95%} = 97.32 – 100.00) siendo ambos datos mayores a los presentados en muestras extrapulmonares, 25% (IC_{95%} = 11.07 – 38.93) y 98.38% (IC_{95%} = 96.80 – 99.95) respectivamente (Tabla 2).

El índice de Kappa que presentó una fuerza de concordancia que se categoriza como considerable, fue correspondiente a las muestras pulmonares (0.61, IC_{95%} = 0.46 – 0.75), y una fuerza de concordancia razonable para muestras extrapulmonares (0.32, IC_{95%} = 0.17-0.48) (Anexo 6).

Al analizar los tipos de muestras extrapulmonares que ingresan al ATBH del HGSJDD (Tabla 3), el LCR presentó una mayor especificidad (90%, IC_{95%} = 84.22 – 95.78) en comparación con los otros líquidos. Por otro lado, la sensibilidad y el VPN del líquido pleural (100%, IC_{95%} = 83.33 – 100; 100%, IC_{95%} = 99.22 – 100, respectivamente) fueron mayores en comparación al LCR.

Tabla 2. Indicadores de desempeño de la técnica Xpert® MTB/RIF contra cultivo en muestras pulmonares, extrapulmonares y total de muestras.

Indicador	Muestras pulmonares %[n] (IC 95%)	Muestras extrapulmonares %[n] (IC 95%)	Total de muestras %[n] (IC 95%)
Sensibilidad	95.65 [22/23] (85.14 – 100.00)	68.75 [11/16] (42.91 – 94.59)	84.62 [33/464] (72.01 – 97.22)
Especificidad	86.49 [128/148] (80.64 – 92.33)	90.18 [303/336] (86.85 – 93.51)	89.05 [431/484] (86.16 – 91.93)
Valor predictivo positivo	52.38 [22/42] (36.09 – 68.68)	25.00 [11/44] (11.07 – 38.93)	38.37 [33/86] (27.51 – 49.23)
Valor predictivo negativo	99.22[128/129] (97.32 – 100.00)	98.38 [303/308] (96.80 – 99.95)	98.63 [431/437] (97.42 – 99.83)
Índice de Kappa	0.61 (0.46 – 0.75)	0.32 (0.17 – 0.48)	0.47 (0.37 – 0.58)

IC: Intervalo de confianza

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

Tabla 3. Indicadores de desempeño de la técnica Xpert® MTB/RIF contra cultivo (Löwenstein Jensen y MGIT™) en diferentes tipos de muestras extrapulmonares.

Indicador	Líquido cefalorraquídeo %[n] (IC 95%)	Líquido pleural %[n] (IC 95%)
Sensibilidad	80.00 [4/5] (34.94 – 100.00)	100.00 [3/3] (83.33 – 100.00)
Especificidad	90.00 [108/120] (84.22 – 95.78)	87.67 [64/73] (79.44 – 95.90)
Valor predictivo positivo	25.00 [4/16] (0.66 – 49.34)	25.00 [3/12] (0 – 53.67)
Valor predictivo negativo	99.08 [108/109] (96.83 – 100.00)	100.00 [64/64] (99.22 – 100.00)
Índice de Kappa	0.34 (0.08 – 0.60)	0.36 (0.05 – 0.66)

IC: Intervalo de confianza

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

Para el cálculo de indicadores no se tomaron en cuenta las muestras de líquido peritoneal, debido a que no se obtuvieron resultados que indicaran correlación tanto para el cultivo como para la técnica Xpert® MTB/RIF.

Se realizó la comparación entre la técnica de Zhiel-Neelsen contra cultivo para muestras pulmonares y la totalidad de muestras (Tabla 4). Las muestras extrapulmonares fueron excluidas del análisis debido a que no se obtuvo ninguna tinción de Zhiel-Neelsen positiva. La sensibilidad para muestras pulmonares fue de 34.78% (IC_{95%} = 13.14 – 56.42), y especificidad de 97.30% (IC_{95%} = 94.35 – 100.00).

Tabla 4. Indicadores de desempeño de la técnica de Zhiel-Neelsen contra cultivo (Löwenstein Jensen y MGIT™) en muestras pulmonares y total de muestras.

Indicador	Muestras pulmonares	Total de muestras ¹
	% [n] (IC 95%)	% [n] (IC 95%)
Sensibilidad	34.78 [8/23] (13.14 – 56.42)	23.53 [8/34] (7.80 – 39.26)
Especificidad	97.30 [144/148] (94.35 – 100.0)	98.90 [360/364] (97.69 – 100.0)
Valor predictivo positivo	66.67 [8/12] (35.83 – 97.51)	66.67 [8/12] (35.83 – 97.51)
Valor predictivo negativo	90.57 [144/159] (85.71 – 95.42)	93.26 [360/386] (90.63 – 95.89)
Índice de Kappa	0.40 (0.18 – 0.62)	0.31 (0.14 – 0.50)

IC: Intervalo de confianza

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

¹: Para el cálculo de indicadores no se tomó en cuenta las muestras de líquido cefalorraquídeo debido a que no se les realiza tinción de Zhiel-Neelsen.

Por último, se realizó la comparación de la técnica molecular Xpert® MTB/RIF contra la metodología microbiológica MGIT™, para la determinación de la sensibilidad a la rifampicina. Se detectaron 33 muestras con presencia de *M. tuberculosis* utilizando la técnica molecular Xpert® MTB/RIF, las cuales en su totalidad mostraban sensibilidad al medicamento rifampicina. Debido a estos resultados, se solicitó al Laboratorio Nacional de Salud, muestras previamente detectadas como resistentes a dicho medicamento, para la posterior evaluación de los indicadores de desempeño (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN) (Tabla 5).

Tabla 5. Indicadores de desempeño de la técnica Xpert® MTB/RIF contra MGIT™ en determinación de resistencia a la rifampicina en el total de muestras.

Indicador	Total de muestras % [n] ¹ (IC 95%)
Sensibilidad	85.71 [6/7] (52.65– 100.00)
Especificidad	97.14 [34/35] (90.19 – 100.00)
Valor predictivo positivo	85.71 [6/7] (52.65 – 100.00)
Valor predictivo negativo	97.14 [34/35] (90.19 – 100.00)

IC: Intervalo de confianza

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

¹ : Se realizó un ajuste estadístico de los valores obtenidos, en donde a cada valor se le sumó una unidad para hacer una corrección estadística de probabilidades basada en el Teorema de Bayes (Anexo 8).

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En Guatemala, a la fecha no existen datos publicados sobre la evaluación de Xpert® MTB/RIF, en muestras pulmonares y/o extrapulmonares. En diversos países se han realizado estudios, en donde se compara principalmente la sensibilidad y especificidad de esta técnica con métodos convencionales, así como con otras técnicas moleculares. En este estudio se analizaron 523 muestras, de las cuales 171 eran pulmonares y 352 extrapulmonares; la mayoría de las muestras correspondieron a esputos (27.72%) y a líquidos cefalorraquídeos (23.91%) (Tabla 1).

En el estudio de Cepheid en el 2010, se analizaron las características de rendimiento de la prueba Xpert® MTB/RIF que plantea el fabricante, en dos centros hospitalarios con muestras pulmonares; la sensibilidad reportada para la detección del complejo *M. tuberculosis* varía entre 96.5% y 99.1% (Cepheid, 2010), valores cercanos a los obtenidos en este estudio 95.65% (IC_{95%} = 85.14 – 100.00) (Tabla 2). Por lo que la capacidad de Xpert® MTB/RIF para identificar correctamente, a los individuos con cultivo positivo para *M. tuberculosis* es considerablemente alta en muestras pulmonares. Así mismo, la alta carga bacilar que contengan las muestras, aumenta la probabilidad de detección del ADN del complejo *M. tuberculosis*, debido a que Xpert® MTB/RIF presenta un límite de detección estimado de 131 UFC/mL (IC_{95%} = 106.2 – 176.4 UFC/mL) (Cepheid, 2010); esta carga aumenta la probabilidad de crecimiento en el cultivo sólido/líquido en donde se necesitan como mínimo de 10-100 bacilos en la muestra (OPS, 2008), disminuyendo así los falsos negativos.

La especificidad de Xpert® MTB/RIF obtenida para muestras pulmonares fue de 86.49% (IC_{95%} = 80.64 – 92.33) (Tabla 2), lo cual indica que 9 de cada 10 individuos con diagnóstico negativo para tuberculosis por el estándar de oro (cultivo), son correctamente identificados por Xpert® MTB/RIF. Cuanto mayor sea la especificidad, mayor será la capacidad de detección de individuos sanos por esta prueba (Cuevas y Alejo, 2010; Ochoa y Orejas, 1999).

La baja capacidad de detección de sujetos sanos que Xpert® MTB/RIF posee para muestras pulmonares, en las condiciones del Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH), en comparación con los estudios realizados por diversos autores, puede deberse a modificaciones en la toma,

manipulación, y almacenamiento correcto de las muestras, errores técnicos o contaminación cruzada (Dejten et al., 2015; Cepheid, 2010).

Por otro lado, existe la posibilidad de que el cultivo pueda introducir un sesgo, al clasificar erróneamente, verdaderos positivos como falsos positivos dado que durante el proceso de decontaminación con Mycoprep™ (N-acetil-L-cisteína-NaOH), previo a la siembra en el medio de cultivo, puede existir una pérdida de bacilos viables debido a la decantación de los sobrenadantes; a diferencia de la metodología de Xpert® MTB/RIF, en donde el fabricante no considera necesaria la etapa de descontaminación y todo el volumen de muestra es procesado. Además de ello, el reactivo de muestra Xpert® MTB/RIF posee una mejor homogeneización y eficacia de licuefacción que el NALC-NaOH (Cepheid, 2010; Vadwai et al., 2011).

En las muestras pulmonares, el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), fue de 52.38% ($IC_{95\%} = 36.09-68.68$) y 99.22% ($IC_{95\%} = 97.32 - 100.00$) respectivamente (Tabla 2), con base en lo anterior, no es recomendable utilizar la metodología Xpert® MTB/RIF para confirmar el diagnóstico de tuberculosis, pero sí es adecuada para descartarlo. Cabe mencionar, que el intervalo de confianza del VPP es amplio, al reproducir el estudio bajo las mismas condiciones, el valor obtenido podría disminuir hasta un 36.09%, siendo inapropiado para confirmar un diagnóstico. En general, los valores predictivos evalúan el comportamiento de una prueba en base a la proporción de enfermos, por lo que son afectados directamente por la prevalencia de la enfermedad (Gürsoy, Yakupoğullari, Tekerekoğlu, & Otlu, 2016; Ochoa y Orejas, 1999). En Guatemala, la prevalencia de tuberculosis es del 20%, por lo que puede decirse que, sí la prevalencia de esta enfermedad es mayor, el VPP aumenta, ya que al existir un alto número de personas enfermas, disminuye el número de falsos positivos; así mismo en una prevalencia alta, el VPN disminuye, pues aumenta el número de falsos negativos, lo que se observó al evaluar la metodología Xpert® MTB/RIF contra el cultivo (Donis, 2012).

Si bien el rendimiento de Xpert® MTB/RIF en la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras respiratorias está bien descrito, su rendimiento en muestras extrapulmonares no se ha categorizado, reportándose una sensibilidad y especificidad menor a la de muestras pulmonares en algunos estudios (Somily et al., 2016). Sin embargo, dadas las limitaciones de las pruebas

disponibles para la detección temprana de tuberculosis extrapulmonar, la OMS recomienda la evaluación de la precisión diagnóstica de Xpert® MTB/RIF para la detección de esta enfermedad en muestras no respiratorias en adultos y niños (Denkinger et al., 2014).

La sensibilidad y especificidad de Xpert® MTB/RIF para muestras extrapulmonares en este estudio fue de 68.75% (IC_{95%} = 42.91 – 94.59) y 90.18% (IC_{95%} = 86.85 – 93.51) respectivamente (Tabla 2). El valor de la sensibilidad, fue un 26.49% menor en las muestras extrapulmonares que en pulmonares. Este hallazgo puede estar relacionado a un paso crítico durante el proceso de homogeneización mecánica de la muestra, siendo esto una fuente de variación en la precisión de la prueba, al afectar la cantidad de partículas de material (sangre, pus y células) en el volumen de muestra, ya que las mismas podrían obstruir las válvulas del cartucho (Denkinger et al., 2014).

De acuerdo con estudios previos, el paso de reconcentración de la muestra durante un tiempo estandarizado (homogeneización mediante el uso de vórtex), mejora la sensibilidad de Xpert® MTB/RIF, desde 84.2% (IC_{95%} = 78.3–90.1%) versus 51.3% (IC_{95%} = 35.5–67.1%) y especificidad 98.0% (IC_{95%} = 96.7–99.2%) versus 94.6% (IC_{95%} = 90.9–98.2%) para muestras no concentradas (Causse, Ruiz, Bautista & Casal, 2011; Denkinger et al., 2014). En comparación con las condiciones del ATBH en donde la homogeneización se realiza de forma manual, esto puede aumentar los posibles interferentes expuestos anteriormente, disminuyendo así la sensibilidad de la prueba.

La especificidad para muestras extrapulmonares fue de 90.18% (IC_{95%} = 86.85–93.51) (Tabla 2), dato mayor que la especificidad obtenida en muestras pulmonares (86.49, IC_{95%} = 80.64 – 92.33), sin embargo, es menor que la reportada en varios estudios, valor que aproximadamente se encuentra en 99-97% (Gürsoy et al., 2016; Lawn & Zumla, 2012). Esta diferencia pudo deberse a la naturaleza paucibacilar de las muestras extrapulmonares, y a la tendencia de *M. tuberculosis* para formar agrupaciones, las cuales conducen a una distribución desigual de bacilos, siendo para este caso, el cultivo un estándar de referencia no adecuado para la detección de tuberculosis extrapulmonar (Denkinger et al., 2014; Vadwai et al., 2011). Si la prueba Xpert® MTB/RIF, identifica correctamente la presencia de *M. tuberculosis* en una muestra de cultivo negativo, el

resultado podría interpretarse como falso positivo, lo que daría lugar a una subestimación de la verdadera especificidad de Xpert® MTB/RIF.

Utilizar un estándar de referencia compuesto (Composite Reference Standard, CRS) permite diagnosticar a un individuo con tuberculosis, basándose en el resultado positivo de una de varias pruebas (frotis, pruebas histológicas, bioquímicas y moleculares, adicionales al cultivo) y los componentes clínicos (signos, síntomas y respuesta al tratamiento), lo que permite reclasificar los falsos positivos de Xpert® MTB/RIF (identificados como negativos para tuberculosis en el cultivo) como verdaderos positivos (casos de tuberculosis) y así aumentar la estimación de la especificidad de Xpert® MTB/RIF (Denkinger et al., 2014). Ya que en este estudio, en el ATBH no se utilizó un CRS como estándar de referencia, sino solamente al cultivo (Löwenstein Jensen y MGIT™), la especificidad tanto de muestras extrapulmonares como pulmonares pudo haber disminuido.

El VPP para muestras extrapulmonares en este estudio fue de 25.00% ($IC_{95\%} = 11.07 - 38.93$), y el VPN de 98.38% ($IC_{95\%} = 96.80 - 99.95$) (Tabla 2), ambos menores que los presentados para muestras pulmonares, datos que eran de esperarse, al tener dichos valores una relación con la especificidad y sensibilidad, respectivamente. Estos resultados se deben a la naturaleza paubacilar y homegeneización mecánica de la muestra, así como no utilizar un CRS como estándar de referencia (Causse et al., 2011).

Debido a que la sensibilidad y la especificidad son medidas de acuerdo no calibradas, en donde, el azar está involucrado, es necesario conocer el verdadero grado de acuerdo y reproducibilidad de la prueba ajustando el efecto del azar (Ocho y Orejas, 1999); para ello, se calculó el índice de concordancia Kappa. La concordancia adquiere importancia cuando se desea conocer si con un método o instrumento nuevo, se obtienen resultados equivalentes de tal manera que eventualmente uno y otro puedan ser reemplazados o intercambiados, ya sea porque uno sea menos costoso, o porque es más seguro para el paciente (Cortés, Rubio y Gaitán, 2010).

Para las muestras pulmonares el índice de Kappa fue de 0.61, clasificándose como fuerza de concordancia considerable y 0.32 para muestras extrapulmonares, clasificándose como razonable

(Tabla 2). Estos valores indican que existe una mayor confiabilidad (capacidad de una prueba para obtener resultados comparables al realizarlas en condiciones idénticas, también llamada repetitividad) (Donis, 2012) en la utilización de Xpert® MTB/RIF, siendo este un método más consistente con respecto al cultivo para muestras pulmonares que para extrapulmonares, según las condiciones del ATBH del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD).

Para evaluar si existía una diferencia entre la exactitud de Xpert® MTB/RIF contra el cultivo, en los diferentes tipos de muestra extrapulmonares, se calcularon los mismos indicadores de desempeño y concordancia (Tabla 3). Para el líquido cefalorraquídeo (LCR), la sensibilidad y la especificidad fue de 80.00% (IC_{95%} = 34.93–100.00), y 90.00% (IC_{95%} = 84.22 – 95.78) respectivamente. Cabe mencionar que, un paso de reconcentración del LCR aumenta la sensibilidad de Xpert® MTB/RIF, sin cambios en la especificidad, probablemente aumentando la carga bacilar en el volumen de entrada del cartucho (Denkinger et al., 2014). Debido a que actualmente no existen recomendaciones disponibles de Xpert® MTB/RIF para el procesamiento de muestras extrapulmonares, otorgadas por el fabricante o de la OMS, una diferencia en el procesamiento según el tipo de muestra puede alterar los resultados (Denkinger et al., 2014).

En este estudio la sensibilidad para el líquido pleural fue de 100.00 % (IC_{95%} =83.33 – 100.00), y la especificidad de 87.67% (IC_{95%} =79.44 – 95.90). La diferencia radica en la naturaleza paucibacilar de la enfermedad, que afecta tanto a la sensibilidad como a la especificidad, siendo entonces la muestra de elección para el diagnóstico de tuberculosis pleural, la biopsia, para aumentar la cantidad de bacilos (Somily et al., 2016; Vadwai et al., 2011), además la presencia de inhibidores de PCR, ya sea en el líquido pleural o a partir de contaminación sanguínea en la toma de la muestra también debe considerarse (Denkinger et al., 2014).

Los valores de VPP del LCR y líquido pleural fueron bajos para ambas muestras, 25.00% (IC_{95%} = 0.66 – 49.34) y 25.00% (IC_{95%} =0 – 53.67) respectivamente, por lo que la probabilidad de tener tuberculosis, cuando Xpert® MTB/RIF presente un resultado positivo, es baja. Una consideración importante en dichos valores es el amplio intervalo de confianza, que no permite realizar ninguna inferencia por lo que se recomienda aumentar el número de muestras evaluadas (Bonita, Beaglehole y Kjellström, 2008). En contraste, los VPN para ambas muestras son altos, 99.08 %

(IC_{95%} =96.83 – 100.00) para LCR y 100.00% (IC_{95%} = 99.22 – 100.00) para líquido pleural, por lo que la probabilidad de diagnosticar un individuo cuando no tiene tuberculosis es alta.

El índice de concordancia Kappa obtenido para el LCR como para el líquido pleural se clasifica como razonable, 0.34 y 0.36, respectivamente (Tabla 3), lo que era de esperarse, al haber obtenido un índice Kappa razonable para muestras extrapulmonares, por lo que existe baja fiabilidad al utilizar Xpert® MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis al compararlo con el cultivo utilizando dichas muestras. Cabe mencionar que, a pesar que el líquido peritoneal fue la segunda muestra en incidencia para este estudio (Tabla 1), no se obtuvieron datos que indicaran correlación entre la metodología Xpert® MTB/RIF y el cultivo, por lo que no fue posible calcular los datos de desempeño y concordancia para esta muestra.

A pesar de que dentro de los objetivos de este estudio no se estableció la comparación de los indicadores de desempeño para la técnica de Zhiel-Neelsen contra Xpert® MTB/RIF, se obtuvieron los resultados para dichas metodologías (Tabla 4). Hasta la fecha, la tinción de Zhiel-Neelsen sigue siendo una técnica tradicional para la detección de *M. tuberculosis* en nuestro país, ya que es una forma rápida y económica para el diagnóstico de la enfermedad; no obstante, es necesario realizar el cultivo para el diagnóstico certero de tuberculosis (González, 2014). En lo que respecta al ATBH del HGSJDD, esta tinción aún es utilizada en la rutina para la detección de *M. tuberculosis* en las diversas muestras remitidas a dicha área. (Tabla 4).

Se calcularon los indicadores de desempeño de esta técnica utilizando el cultivo como método de referencia solamente en muestras pulmonares, debido a que como se mencionó anteriormente, en ningún frote de muestras extrapulmonares se observaron BAAR. El valor de sensibilidad obtenido fue de 34.78% (IC_{95%} =13.14 – 56.42), siendo menor al valor en general para esta prueba (55 - 60%) (González, 2014). Se ha demostrado en los resultados de frotos, los cuales son indicativos de carga de microorganismos, que se requiere de 5×10^3 a 1×10^4 bacilos por mililitro de muestra para generar un resultado positivo (Marlowe et al., 2011). La especificidad de 97.30% (IC_{95%} = 94.35 – 100.00) concuerda con lo esperado para una tinción de Zhiel-Neelsen (97 - 100%) (Pérez et al., 2002), debido a que en personas que no poseen la enfermedad, la prueba da un resultado negativo para la observación de BAAR.

Una de las desventajas de la técnica de Zhiel-Neelsen contra Xpert® MTB/RIF es que a pesar de que ésta tinción permite distinguir ciertas características morfológicas, no permite diferenciar con certeza las especies de micobacterias existentes en la muestra (Pérez et al., 2002). El Xpert® MTB/RIF si identifica plenamente el complejo *M. tuberculosis* en una muestra de las diferentes cepas de micobacterias no causantes de tuberculosis (MNT), debido a su alta especificidad analítica (Cepheid, 2010).

Debido a la alta incidencia de tuberculosis en países en desarrollo, es necesario una técnica que proporcione un diagnóstico temprano, para poder reducir la mortalidad y las secuelas de la enfermedad (Hillemann et al., 2011). Aunque Xpert® MTB/RIF no alcanza la sensibilidad del cultivo, posee mayor sensibilidad que la tinción de Zhiel-Neelsen, lo cual podría mejorar el diagnóstico en muestras extrapulmonares. En muestras tales como LCR y ganglios linfáticos, donde el cultivo u otras pruebas de diagnóstico no son disponibles y se necesita un diagnóstico rápido, puede hacerse uso de esta prueba tomando en cuenta las recomendaciones del fabricante y realizando una toma de muestra correcta (Causse et al., 2011). Una de las limitaciones en este estudio fue que no se tomó en cuenta la clínica de los pacientes al momento de obtener la muestra, información importante para establecer inferencias de los resultados obtenidos. La clínica del paciente no formaba parte de los criterios de inclusión, debido a que toda muestra que ingresara al ATBH, debía ser analizada de acuerdo al protocolo establecido por el área (Anexo 2).

Se considera para estudios a futuro, aumentar el tamaño de la muestra tanto para muestras pulmonares, y en especial para muestras extrapulmonares, para evaluar a detalle la posible variabilidad en la eficacia de la prueba Xpert® MTB/RIF, según el tipo de muestra, y aumentar la confiabilidad de los resultados disminuyendo el rango del intervalo de confianza. Se hace necesario también realizar una comparación de Xpert® MTB/RIF contra el cultivo, junto con otras pruebas moleculares, tales como ensayos en base sólida de hibridación (detección e identificación del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a rifampicina e isoniazida) y amplificación isométrica mediada por lazo (LAMP) (técnica rápida con resultados en dos horas), entre otros, ya que al igual que Xpert® MTB/RIF, estas metodologías detectan el ADN de *M. tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina en menor tiempo. Se recomienda también utilizar un estándar de referencia compuesto (CRS), para disminuir los posibles falsos negativos introducidos

por el cultivo, logrando disminuir el sesgo en el estudio y mejorando el diagnóstico de los pacientes.

Para conocer la eficiencia de la prueba Xpert® MTB/RIF, se calculó el índice de Youden (IY), el cual es una medida conjunta de eficiencia de un medio diagnóstico en donde se observa la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y falsos positivos (Anexo 7). Este a su vez, tiene la ventaja de no estar afectado por la selección de la prevalencia, y es preferido por la combinación de los valores de la sensibilidad y especificidad (Silva, 1997). En el total de muestras se obtuvo un IY de: 0.7367; técnicamente es igual a 1 solo cuando la prueba diagnóstica es perfecta; de modo que también puede decirse que cuánto más cercano a 1, mejor es la prueba diagnóstica que se está evaluando. Para las muestras pulmonares el IY obtenido fue de 0.8214 y para las extrapulmonares 0.5893, considerándose eficiente para muestras pulmonares y no eficiente para extrapulmonares.

Así mismo, se realizó la comparación de la técnica molecular Xpert® MTB/RIF contra la metodología microbiológica MGIT™, para la determinación de la sensibilidad a la rifampicina, según las condiciones del ATBH. El diagnóstico rápido y el inicio del tratamiento contra la tuberculosis, son estrategias fundamentales para el manejo y control oportuno de la enfermedad. La presencia de mutaciones en ciertas regiones del material genético de *M. tuberculosis*, generan mecanismos de resistencia para los fármacos administrados para combatir la enfermedad (Tortoli, Benedetti, Fontanelli & Simonetti, 2002). En Guatemala para el año 2014, se reportó una tasa de resistencia de 4.3% para el periodo 2008-2013, en el Hospital Roosevelt para los años 2012-2013 una tasa del 9%, solamente para resistencia a rifampicina y/o isoniacida (Samayoa, 2017) y en el Hospital General San Juan de Dios, una tasa del 2.8% para tuberculosis MDR-TB. En este estudio, las 33 muestras de *M. tuberculosis* identificadas presentaron sensibilidad al medicamento rifampicina por la técnica Xpert® MTB/RIF y la metodología MGIT™.

El Laboratorio Nacional de Salud (LNS) es la institución gubernamental guatemalteca de referencia para realizar pruebas de sensibilidad a fármacos (Samayoa, 2017). Debido a que en este estudio no se detectaron muestras resistentes a rifampicina, fueron solicitadas al LNS muestras (n= 5) que previamente estuvieran identificadas como resistentes al fármaco, para ser evaluadas bajo las condiciones del ATBH del HGSJDD; dichas identificaciones fueron realizadas por el LNS

mediante el Método de Proporciones (estándar de oro para sensibilidad a fármacos antifímicos), y en el ATBH fueron analizadas por medio de la metodología microbiológica MGIT™ y la técnica molecular Xpert® MTB/RIF, con la finalidad de comparar los resultados.

Se obtuvo una sensibilidad y VPP de 85.71% (IC_{95%} = 52.71 – 100.00) así como una especificidad y VPN de 97.14% (IC_{95%} = 90.19 – 100.00) (Tabla 5), estos datos fueron menores a los reportados por Cepheid en el año 2010 (sensibilidad= 99.1% y especificidad=100.00%) (PAHO, 2010) y otros estudios previos (sensibilidad= 98.52%, especificidad= 100.00%, VPP= 96.96% y VPN= 100.00%) (Jahan et al.,2016). Las variaciones tanto en sensibilidad y especificidad para Xpert® MTB/RIF, de acuerdo a estudios previos, pueden estar relacionados con la prevalencia de la enfermedad (debido a las regiones geográficas en donde han sido realizados los estudios), tipo de muestra, técnicas de muestreo, presencia de tuberculosis multirresistente (MDR-TB) y mutaciones en el gen *rpoB* presentes en la población (Jahan et al., 2016).

Debido a que la técnica Xpert® MTB/RIF contiene cebadores que amplifican una porción del gen *rpoB* (región de 81 pb), así como cinco sondas (A-E) para las mutaciones dentro de la región determinante de resistencia a rifampicina; cuando *M. tuberculosis* es detectada por al menos dos de cinco sondas, esta es identificada como resistente al fármaco (Jahan et al., 2016), lo cual hace que esta técnica llegue a presentar alta sensibilidad y especificidad para la determinación de resistencia a la rifampicina. Sin embargo, diversos autores han reportado discrepancia en la detección de este gen, presentando falsos negativos cuando el paciente se encuentra infectado con múltiples cepas de tuberculosis, ya que Xpert® MTB/RIF solamente puede detectar el gen *rpoB* y no todas las mutaciones que puedan llegar a causar resistencia a la rifampicina (Cayci, Bilgin, Coban, Birinci & Durupinar, 2017). Así mismo, estudios previos han reportado que luego de analizar cientos de muestras, se pueden obtener resultados tanto falsos negativos como falsos positivos de resistencia al fármaco. Estas variaciones pueden deberse a la presencia de secuencias tipo *rpoB* salvaje que puedan llegar a ser detectadas por las sondas de Xpert® MTB/RIF, como secuencias resistentes del gen, dando lugar a que intrínsecamente sea más susceptible a presentar falsos negativos a la sensibilidad del fármaco, en las poblaciones de *M. tuberculosis* con objetivos mixtos (secuencia salvaje y secuencia resistente del gen *rpoB*), por lo que puede llegar a afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba (Rufai et al., 2014).

La metodología Xpert® MTB/RIF es capaz de detectar la presencia de mutaciones en el gen para resistencia a la rifampicina en un 40% (Rufai et al., 2014). Por lo tanto, diversos estudios sugieren utilizar la técnica Xpert® MTB/RIF versión G4, desarrollada por los fabricantes para aumentar la robustez de la prueba y mitigar los posibles falsos resistentes, mejorando así la detección de mutaciones en la sonda E que eran difíciles de detectar en las versiones anteriores (Rufai et al., 2014); para este estudio fue utilizado la versión GX 2.1

IX. CONCLUSIONES

- A. La evaluación de la metodología Xpert® MTB/RIF para el total de muestras analizadas presentó un valor de 84.62% (IC_{95%} = 72.01 – 97.22) de sensibilidad, 89.05% (IC_{95%} = 86.16 – 91.93) de especificidad, 38.37% (IC_{95%} = 27.51 – 49.23) de valor predictivo positivo, 98.63% (IC_{95%} = 97.42 – 99.83) de valor predictivo negativo y 0.47 (IC_{95%} = 0.37 – 0.58) para el índice de Kappa, en comparación con el cultivo.
- B. La metodología Xpert® MTB/RIF presentó un valor de 95.65% (IC_{95%} = 85.14 – 100.00) de sensibilidad, 86.49% (IC_{95%} = 80.64 – 92.33) de especificidad, 52.38% (IC_{95%} = 36.09 – 68.68) de valor predictivo positivo, 99.22% (IC_{95%} = 97.32 – 100.00) de valor predictivo negativo y 0.61 (IC_{95%} = 0.46 – 0.75) para el índice de Kappa, en comparación con el cultivo en muestras pulmonares.
- C. En muestras extrapulmonares, la metodología Xpert® MTB/RIF presentó un valor de 68.75% (IC_{95%} = 42.91 – 94.59) de sensibilidad, 90.18% (IC_{95%} = 86.85 – 93.51) de especificidad, 25.00% (IC_{95%} = 11.07 – 38.93) de valor predictivo positivo, 98.38% (IC_{95%} = 96.80 – 99.95) de valor predictivo negativo y 0.32 (IC_{95%} = 0.17 – 0.48) para el índice de Kappa en comparación con el cultivo.
- D. La evaluación de la resistencia a la rifampicina en el total de muestras, la metodología Xpert® MTB/RIF presentó un valor de 85.71% (IC_{95%} = 52.71 – 100.00) de sensibilidad y valor predictivo positivo así como un valor de 97.14% (IC_{95%} = 90.19 – 100.00) para especificidad y valor predictivo negativo, en comparación con el método MGIT™.

X. RECOMENDACIONES

- A. Utilizar un estándar de referencia compuesto (CRS), para disminuir los falsos negativos introducidos por el cultivo, al procesar muestras extrapulmonares.
- B. Realizar un estudio similar específicamente para líquido cefalorraquídeo, debido a que este tipo de muestra extrapulmonar es la de mayor frecuencia en el ATBH del HGSJDD.
- C. Realizar una comparación de la metodología Xpert® MTB/RIF versus el cultivo, junto a otra prueba molecular (ensayos en base sólida de hibridación, amplificación isotérmica mediada por lazo, entre otros), para comparar el desempeño de esta prueba.
- D. Realizar estudios con mayor número de muestra, tanto para pulmonares como extrapulmonares, para evaluar la variabilidad de la eficacia de la metodología Xpert® MTB/RIF, según el tipo de muestra.
- E. Evaluar la clínica del paciente, para establecer inferencias sobre los resultados obtenidos con la metodología Xpert® MTB/RIF versus el estándar de oro.
- F. Realizar un estudio similar con mayor número de muestras resistentes a la rifampicina, para evaluar si existe discrepancia en la eficacia de Xpert® MTB/RIF.
- G. Realizar un estudio para evaluar el desempeño de la técnica Xpert® MTB/RIF respecto a la determinación de la resistencia a la rifampicina, utilizando exclusivamente como método de referencia el estándar de oro para sensibilidad a fármacos antifímicos (Método de Proporciones).

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agapito, J., Neyra, V., Castro, J., Accinelli, R., Rodríguez, A. y Espinoza, J. (2002). Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a la resistencia a rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19(3), 117-123.
- Araujo, Z., Acosta, M., Escobar, H., Baños, R., Fernández L. y Rivas, S. (2008). Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. Revisión. *Investigación Clínica* 49(3), 411 – 441.
- Aidar, O., Ambroggi, M., Jave, A., Brian, M., Canedo, E., Cufre, M., et al. (2010). *Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis*. Argentina: Hospital Muñiz.
- Atashi, S., Izadi, B., Jalilian, S., Madani, S., Farahani, A. & Mohajeri, P. (2017). Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for determination of rifampicin resistance among new tuberculosis cases in west and northwest Iran. *New Microbe and New Infect*, 19. 117-120. doi: 10.1016/j.nmni.2017.07.002
- Barrera, J., Domínguez, G. y Martínez, L. (2014). *Diseño e implementación del protocolo de la tinción de auramina-rodamina para uso rutinario del diagnóstico microscópico de micobacterias*. (Tesis de licenciatura). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Barriga, G., Solís, M., Aceves, A., López, L., Ramírez, F., Monzalvo, M., et al. (2014). Evaluación de la prueba GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la resistencia a rifampicina en muestras extrapulmonares. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(3), 140-144.
- BD. (2006). *BBL middlebrook 7H9 broth with glicerol*. Recuperado de: [https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007467\(09\)\(1206\)_ES.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007467(09)(1206)_ES.pdf).

BioBacter. (2015). *Medio preparado para cultivo y aislamiento de microorganismos del género Mycobacterium*. Recuperado de: <http://www.biobacter.com/images/INSERTOS/OGAWA.pdf>.

Boehme, C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M., Shenai, S., Krapp, F., et al. (2010). Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England Journal of Medicine*, 363(11), 1005-1015.

Bonita, R., Beaglehole, R. y Kjellström, T. (2008). *Epidemiología básica*. (2ª ed.). Biblioteca OPS: Organización Panamericana de la Salud.

BritaniaLab. (2015). *Löwenstein-Jensen medio*. Recuperado de: http://www.britanialab.com/productos/226_inserto_es.pdfhttp://www.britanialab.com/productos/225_inserto_es.pdf.

BritaniaLab. (2015). *Stonebrink medio*. Recuperado de: http://www.britanialab.com/productos/226_inserto_es.pdf.

Calvo J. y Bernal, M.S. (2012). *Tuberculosis. Diagnóstico y tratamiento*. Recuperado de: <http://www.neumosur.net/files/EB04-46%20TBC%20dco%20y%20tto.pdf>.

Caminero, J., Casal, M., Ausina, V., Pina, J. y Sauret, J. (1996). Diagnóstico de la tuberculosis. *Archivos de bronconeumología*, 32(2), 85-99.

Causse, M., Ruiz, P., Bautista, J. & Casal, M. (2011). Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 3065-3067. doi: 10.1128/JCM.00491-11.

- Cayci, Y., Bilgin, K., Coban, A., Birinci, A., & Durupinar, B. (2017). An evaluation of false-positive rifampicin resistance on the Xpert MTB/RIF. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 112(11), 756-759. doi: 10.1590/0074-02760170051
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (2016). *Tuberculosis multiresistente (MDR)*. Recuperado de: <http://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/signsandsymptoms.htm>.
- Cepheid. (2010). *Xpert® MTB/RIF*. Estados Unidos: Diagnostic Medical Device.
- Chirico, M., Morcillo, N. y Kuriger, A. (2006). *Transmisión de la tuberculosis en los trabajadores de la salud. Medidas de bioseguridad*. Recuperado de: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd49/bioseguridad.pdf>.
- Clínica de Enfermedades Infecciosas. (2017). *Protocolo nacional de tuberculosis*. Recuperado de: infecciosashr.org/download/85/
- Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). (2012). *Norma Técnica Guatemalteca. Laboratorios Clínicos-Requisitos para la calidad y competencia*. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/301731300/Coguanor-Ntg-Iso-15189-2012>.
- Contreras, F., Pacheco, C. y Conchari, G. (2011). Manifestaciones tomográficas de la tuberculosis pulmonar en el hospital Obrero y Luis Uría De La Oliva de la Ciudad de la Paz. *Sociedad Boliviana de Tomografía*, 3(1), 7-16.
- Cortazar, A. y Silva, E. (2004). *Métodos físico-químicos en Biotecnología: PCR*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cortés, E., Rubio, J. y Gaitán, H. (2010). Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 61(3), 247-255.

- Cuevas, C. y Alejo, A. (2010). *Validez y fiabilidad de las medidas de exposición y medición*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dejten, A., DiNardo, A., Leyden, J., Steingart, K., Menzies, D., Schiller, I., et al. (2015). Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*, 3(6). 451-461. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00095-8.
- Denkinger, C., Schumacher, S., Boehme, C., Dendukuri, N., Pai, M. & Steingart, K. (2014). Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *ERS Journals*, 44. 435-446. doi: 10.1183/09031936.00007814.
- Díaz, A., Calderón, A., Menéndez, F., Blanco, S., Orive, V. e Ibarra, S. (2011). Papel de la ultrasonografía endoscópica en el diagnóstico de la tuberculosis ganglionar. *Gastroenterología y Hepatología*, 34(6), 437-438.
- Díaz, R. (2003). *Caracterización molecular de cepas de Mycobacterium tuberculosis y su implicación en el control de la tuberculosis en cuba*. (Tesis de licenciatura). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” La Habana. Cuba.
- Donis, J. (2012). Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avances en Biomedicina*, 1(2). 73-81.
- Dorronsoro, I. y Torroba, L. (2007). Microbiología de la Tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(2), 67-85.
- Epidat. (2016). *Tamaños de muestra y precisión para pruebas diagnósticas*. (Versión 4.2). [Software]. España: Organización Panamericana de la Salud.
- Epidat. (2016). *Indicadores estadísticos básicos para evaluar el desempeño de un procedimiento diagnóstico*. (Versión 4.2). [Software]. España: Organización Panamericana de la Salud.

- Fanlo, P. y Tiberio, G. (2007). Tuberculosis extrapulmonar. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30 (2), 143-162.
- Fernández, J. (2013) *Recomendaciones para los laboratorios que realizan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Áreas y flujos de trabajo*. Chile: Instituto de Salud Pública.
- Fontalvo, D. y Gómez, D. (2015). Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar extrapulmonar. *Médica UIS*, 28(1), 39-51.
- García, C. (2001). Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 14(2), 114-128.
- García, J. (2015). *Vigilancia de tuberculosis*. Recuperado de: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones/Semanas%20Situacional/Vigilancia%20de%20Tuberculosis%20Ene-May%202015.pdf>.
- García, R., Lado, F., Tuñez, V., Pérez, M. y Cabarcos, A. (2003). Tratamiento actual de la tuberculosis. *Análisis de Medicina Interna*, 20(2), 91-100.
- García, S., Pérez, A., Chávez, S. y Sereno, J. (2014). Tuberculosis genital y embarazo a término. Reporte de caso. *Revista Ginecología y Obstetricia de México*, 82(4), 261-267.
- Garzón, M., Mejía, G., Llerena, C., Orjuela, D., García, L., Burbano, Y., et al. (2009). *Guía de evaluación externa del desempeño bacteriología de tuberculosis y lepra*. Recuperado de: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/Indirecta%20de%20los%20Medios%20de%20Cultivo/Gu%C3%ADa%20EED.pdf>
- González, J. (2014). Microbiología de la tuberculosis. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, 15(1), 25–33.

- González, J., García, J., Anibarro, L., Vidal, R., Esteban, J., Blanquer, R., et al. (2010). Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología*, 46(5), 255-274.
- Gordis, L. (2015). Epidemiología. (5ª ed.). *Evaluación de la validez y fiabilidad de las pruebas diagnósticas y de cribado*. (pp. 88-115). España: Elsevier Saunders.
- Granich, R., Binkin, N., Jarvis, W., Simone, P., Rieder, H., Espinal, M. et al. (2002). *Normas para la prevención de la transmisión de la tuberculosis en los establecimientos de asistencia sanitaria en condiciones de recursos limitados*. Recuperado de: http://www.who.int/tb/publications/who_tb_99_269_sp.pdf
- Guglielmone, R., De Elías, R., Kiener, O., Collino, C. y Barzón, S. (2011). Verificación de métodos en un laboratorio acreditado y planificación del control de calidad interno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 45(2), 335-347.
- Gürsoy, N., Yakupoğullari, Y., Tekerekoğlu, M. & Otlu, B. (2016). Evaluation of the diagnostic performance of Xpert MTB/RIF test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in clinical samples. *Mikrobiyol Bul*, 50(2). 196-204. doi: 10.5578/mb.21033.
- Herrera, M., Torres, M., Juárez, E. y Sada, E. (2005). Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(4), 327-336.
- Hillemann, D., Rüsçh, S., Boehme, C. & Richter, E. (2011). Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1202-1205. doi: 10.1125/JMC.02268-10.

- Hospital General San Juan de Dios. (2016). Protocolo de procesamiento de muestras del área de Tuberculosis y Hongos. Departamento de laboratorio clínico-HGSJDD. Guatemala. (No publicado).
- Hospital General San Juan de Dios. (2017). Base de datos del área de Tuberculosis y Hongos. Departamento de laboratorio clínico-HGSJDD. Guatemala. (Datos no publicados).
- Jahan, H., Jhora, S., Habib, Z., Yusuf, Md., Ahmed, I., Farzana, A. & Parveen, R. (2016). Diagnostic evaluation of GeneXpert MTB/RIF assay for the detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* among pulmonary tuberculosis patients in Bangladesh. *Journal of Tuberculosis Research*, 4. 55-60. doi: 10.4236/jtr.2016.41007
- Jiménez, A. (2002). *Susceptibilidad antibiótica y perfil genético de cepas de Mycobacterium tuberculosis aisladas de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan De Dios durante el año 2002*. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Laínez, S., Martínez, M., Costa, A. y Rodríguez, M. (2010). Indicaciones de profilaxis y quimioprofilaxis de la tuberculosis. *Medicine*, 10(56), 3865-9
- Landis, J. & Koch, G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174
- Lawn, S. & Zumla, A. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using the Xpert® MTB/RIF assay. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10(6), 631–635. doi:10.1586/eri.12.43.
- Lemus, D. (2007). *Métodos rápidos para la detección de resistencia en Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de doctorado). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” La Habana. Cuba.
- Lozano, J. (2002). Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Oficina de Farmacia*, 21(8), 102-110.

- Marlowe, E., Novak-Weekley, S., Cumpio, J., Sharp, S., Momeny, M., Babst, A., et al. (2011). Evaluation of the Cepheid XpertMTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4). 1621-1623. doi: 10.1128/JCM.02214-10.
- Maulén, N. (2011). Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Médica de Chile*, 139(12), 1605-1610.
- Méndez, A., Mendallo, M., Baquero, F. y García, M. (2012). *Tuberculosis*. Recuperado de: <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/tuberculosis.pdf>
- Ministerio de sanidad, política social e igualdad. (2010). *Guía de práctica clínica sobre el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la tuberculosis*. España: Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Molinero, L. (2002). Valoración de pruebas diagnósticas. *Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial*. (1-7).
- Montañes, C., Iglesias, M. y Altet, M. (2011). *Tuberculosis*. Recuperado de: http://vacunasaep.org/manual/Cap8_23_Tuberculosis.pdf.
- Norma Técnica Guatemalteca 15189: 2012. (2013) Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/301731300/Coguanor-Ntg-Iso-15189-2012>.
- Ochoa, C. y Orejas, G. (1999). Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (IV): Pruebas diagnósticas. *Anales Españoles de Pediatría*, 50(3). 301-314.
- Oficina Guatemalteca de Acreditación, OGA. (2018). Recuperado de: <http://www.oga.org.gt/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *Tuberculosis*. Recuperado de: <http://www.who.int/tb/challenges/mdr/faqs/es/>

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *Informe mundial sobre la tuberculosis 2016*. Recuperado de: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary_es.pdf?ua=1
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2008). *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II. Cultivo*. Recuperado de: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo\[2\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf)
- Ortíz, C. y Aristizábal, B. (2013). Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis. *Medicina U.P.B.*, 32(2), 144-150.
- PAHO. (2010). Hoja de ruta para incorporar el Xpert MTB/RIF como método de diagnóstico rápido de la tuberculosis y la tuberculosis multirresistente. Recuperado de: <http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Hoja-Ruta-Introduccion-Xpert-MTB-RIF.pdf>
- PAHO. (2011). *Preguntas frecuentes sobre el método Cpert MTB/RIF*. Recuperado de: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Preguntas_frecuentes_Xper_MTB-RIF_final.pdf.
- Palomino, J., Cardoso, S. & Ritacco, V. (2007). *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. Brazil: Emma Raderschadt
- Pérez, C. (2004). Profilaxis antimicrobiana: Tuberculosis. *Revista Chilena de Infectología*, 21(1), 28-30.
- Pérez, M. (2002). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. España: Universidad politécnica de Valencia.

- Pérez, M., Hurtado, M.P. y Rivera, M. (2001). Tuberculosis en el nuevo milenio. *Revista de la Facultad de Medicina*, 24(2), 104-119.
- Peréz, M., Túñez, V., García, M. y Lado, F. (2002). Diagnóstico microbiológico de tuberculosis. *ELSEVIER Medicina Integral*. 39(5), 207-215.
- Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. (2012). *Manual de normas de control de la tuberculosis*. Recuperado de: <http://www.bvs.hn/Honduras/Postgrados/NormasTBMarzo2013.pdf>.
- Ramírez, N., Cocotle, B., Méndez, A. y Arenas, J. (2002). *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Revista Médica de la Universidad de Veracruz*, 2(2), 320-334.
- Reyes, E. (2012). *Evaluación del programa de tuberculosis en la captación y tratamiento de los pacientes en el departamento del Quiché*. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Rodriguez, M. y Rodríguez, W. (2006). *PRC en tiempo real. métodos físicos químicos en biotecnología*. México: UNAM.
- Rosarys, M., Sardiñas, M., Garcia, G., Mederos, L. y Díaz, R. (2014). Evaluation of BacT/ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. *Journal of Tuberculosis Research*, 2(1), 59-64.
- Rufai, S., Kumar, P., Singh, A., Prajapati, S., Balooni, V. & Singh, S. (2014). Comparison of Xpert MTB/RIF with Line Probe Assay for Detection of Rifampin-Monoresistant Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6),1846-1852.
- Samayoa, M. (2017). *Caracterización de los perfiles de resistencia a drogas antifímicas de primera línea en pacientes con tuberculosis pulmonar en los años 2013-2015*. (Tesis de licenciatura). Universidad Rafael Landívar. Guatemala. Guatemala, 2017.

- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J. y Sierra E., (2016). *PCR: reacción en cadena de la polimerasa*. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcr.pdf>
- Siddiqi, S. & Rüsçh, S. (2006). MGIT™. *Procedure Manual*. Estados Unidos: Foundation For Innovative New Diagnostics.
- Silva, L. C. (1997). *Cultura estadística e investigación científica en el campo de la salud: una mirada crítica*. Madrid: Díaz de Santos
- Somily, A., Barry, M., Habib, H., Alataibi, F., Al-Zamil, F., Khan, M., et al. (2016). Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *rpoB* gene in respiratory and non-respiratory clinical specimens at a tertiary care teaching hospital in Saudi Arabia. *Saudi Med J*, 37(12), 1404-1407.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tessema, B., Beer, J., Emmrich, F., Sack, U. & Rodloff, A. (2012). Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, 12(37). doi: 10.1186/1471-2334-12-37
- Tortoli, E., Benedetti, M., Fontanelli, A. & Simonetti, M. (2002). Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for testing susceptibility of mycobacterium tuberculosis to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 607-610. doi: 10.1128/JCM.40.2.607-610.2002
- Ugarte, C., Ponce, M. y Moore, D. (2008). Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Médica Peruana*, 25(3), 171-175.

Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. (2010). *Manejo de la Tuberculosis. Una guía esencial de buenas prácticas*. Francia: Boulevard Saint-Michel.

Uribarren, T. (2016). *Tuberculosis*. Recuperado de:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>.

Vadwai, V., Boehme, C., Nabeta, P., Shetty, A., Alland, D. & Rodrigues, C. (2011). Xpert MTB/RIF: a new Pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7), 2540-2545. doi: 10.1128/JCM.02319-10.

World Health Organization. (2015). *Global Tuberculosis Report*. Recuperado de:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf

XII. ANEXOS

Anexo 1. Interpretación de los resultados de la baciloscopía.

Informe	Ziehl-Neelsen (x1000)	Tinción Fluorescente (x250)	Tinción Fluorescente (x450)
Negativo	0	0	0
Dudoso (repetir)	1-2/300 campos (3 barridos)	1-2/30 campos (1 barridos)	1-2/70 campos (1.5 barridos)
Positivo 1+	1-9/100 campos (1 barrido)	1-9/10 campos	2-18/50 campos (1 barrido)
Positivo 2+	1-9/10 campos	1-9/10 campos	4-36/10 campos
Positivo 3+	1-9/campo	10-90 campos	4-36/campo
Positivo 4+	>9/campo	>90/campo	>36/campo

Se observan los parámetros a tomar en cuenta para poder reportar un resultado, negativo, dudoso, o positivo, dependiendo de la cantidad de bacilos observados por campo, y por lo tanto el número de cruces que se deben de informar, según el tipo de tinción realizada.

Fuente: González, J., García, J.M., Anibarro, L., Vidal, R., Esteban, J., Blanquer, R. y Moreno, S. (2010). Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología*, 46(5), 255-274.

Anexo 2. Protocolo para el procesamiento de muestras en el ATBH.



Ministerio de Salud Pública
República de Guatemala



PROTOCOLO PROCESAMIENTO DE MUESTRAS
ÁREA DE TUBERCULOSIS Y HONGOS
DEPTO. DE LABORATORIO CLÍNICO-HGSJDD

TIPO DE MUESTRA*	BK	CULTIVO DE TB	GIEMSA	PCR TUBERCULOSIS	CULTIVO DE HONGOS	KOH	TINTA CHINA	ANTIGENO DE <i>Cryptococcus</i>	CULTIVO DE AEROB/ANAER
Espuito (1ero. seriado)	X	X		X					
Espuito (2do. y 3ro. seriado)	X								
Lavados, aspirados o cepillados bronquiales	X	X	X	X	X				
Secreciones varias	X	X	X	X	X				
Biopsias varias	X	X	X	X	X				
LCR		X		X	X		X		
Otros líquidos (pleural, sinovial, peritoneal, pericárdico, etcétera)	X	X	X	X	X				
Médula ósea (jeringa o tubo EDTA)	X	X	X		X				
Mielo/Hemo Isolator		X			X				X
Escamas, cabellos, uñas (raspados)					X	X			

* A todas las muestras se les procesará lo indicado por esta tabla aun cuando no venga la orden médica por escrito. Esto tiene el objeto de brindar todas las pruebas disponibles a los pacientes y mejorar la calidad del diagnóstico.

Elaborado por: Lic. César Conde Pereira Supervisor del área de Tuberculosis y Hongos	Autorizado por: Licda. Myriam Alcázar Jefe del Depto. de Laboratorio Clínico
---	---

Fuente: Hospital General San Juan de Dios. (2016). *Protocolo de procesamiento de muestras del área de Tuberculosis y Hongos*. Guatemala: Área de Tuberculosis y Hongos, Hospital General San Juan de Dios.

Anexo 3. Consentimiento informado.



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Biológica



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a la rifampicina.

Este consentimiento se dirige a pacientes que son atendidos en el Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD) a los cuales su médico tratante ha solicitado al Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH), le sean realizadas pruebas ante la sospecha de tuberculosis; por lo que se les invita a participar en la investigación: “Evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y su resistencia a la rifampicina”.

Somos un grupo de estudiantes e investigadores de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y solicitamos su consentimiento para su participación voluntaria en la presente investigación, cuyo objetivo es evaluar una técnica de PCR en tiempo real (GeneXpert, Xpert® MTB/RIF) para el diagnóstico molecular del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia al medicamento rifampicina.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *M. tuberculosis*, la cual puede ser detectada mediante la prueba Xpert® MTB/RIF, por lo que usted, al participar en dicho estudio, conocerá si la bacteria se encuentra presente en su organismo y si esta posee o no resistencia al medicamento rifampicina.

Durante el estudio se analizarán muestras pulmonares y extrapulmonares solicitadas por su médico tratante, las cuales no serán almacenadas luego de su respectivo análisis. Estos análisis no conllevan ningún tipo de riesgo; no obstante, usted es libre de participar o no en el estudio y de retirarse en el momento que lo desee; tanto si elige o no hacerlo, los servicios recibidos en el HGSJDD continuarán. Cabe mencionar que no se dará ningún tipo de compensación económica por participación.

Por motivos de confidencialidad, solamente personal autorizado del HGSJDD y las personas a cargo de dicha investigación, tendrán acceso a los datos del estudio, y nunca se publicarán datos personales que lo identifiquen, únicamente los resultados obtenidos de los análisis serán utilizados para la evaluación de la prueba Xpert® MTB/RIF, los cuales serán publicados en el artículo final de la investigación, motivo por el cual se solicita autorización para utilizarlos en dicha publicación.

De antemano, agradecemos su colaboración en la realización de la presente investigación.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Nombre del participante _____

Firma y/o huella dactilar del participante _____

DPI _____

Fecha _____

Anexo 4. Inoculación para análisis de sensibilidad a partir de un tubo positivo MGIT™

Reactivo	Tubo CC	Tubo S	Tubo I	Tubo R	Tubo E
Suplemento	800 µL	800 µL	800 µL	800 µL	800 µL
SIRE					
Estreptomicina	-----	100 µL	-----	-----	-----
Isoniacida	-----	-----	100 µL	-----	-----
Rifampicina	-----	-----	-----	100 µL	-----
Etambutol	-----	-----	-----	-----	100 µL
Cepa	-----	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Dilución de cepa (1:100)	500 µL	-----	-----	-----	-----

Fuente: Siddiqi, S. & Rüsçh, S. (2006). MGIT™. *Procedure Manual*. Estados Unidos: Foundation For Innovative New Diagnostics.

Anexo 5. Indicadores de desempeño para una prueba diagnóstica.

		Modelo de referencia	
		Positivo	Negativo
Positivo	Verdadero positivo (a):	Falso positivo (b):	
	Tienen la enfermedad y la prueba es positiva.	No tienen la enfermedad pero la prueba es positiva.	
Negativo	Falso negativo (c):	Verdadero negativo (d):	
	Tienen la enfermedad pero la prueba es negativa.	No tienen la enfermedad y la prueba es negativa.	

Fuente: Gordis, L. (2015). Epidemiología. (5ª ed.). *Evaluación de la validez y fiabilidad de las pruebas diagnósticas y de cribado*. (pp. 88-115). España: Elsevier Saunders.

Indicador	Fórmula
Sensibilidad	$a / (a + c)$
Especificidad	$d / (b + d)$
Valor predictivo positivo	$a / (a + b)$
Valor predictivo negativo	$d / (c + d)$

Fuente: Gordis, L. (2015). Epidemiología. (5ª ed.). *Evaluación de la validez y fiabilidad de las pruebas diagnósticas y de cribado*. (pp. 88-115). España: Elsevier Saunders.

Anexo 6. Índice de concordancia Kappa (k).

		Modelo de referencia		
		Método 1		
		Si	No	
Método 2	Si	A	B	N1
	No	C	D	N2
		N3	N4	Total

Fórmula

$$k = 2 (AD + BC) / (N1*N4 + N2*N3)$$

Interpretación del índice de concordancia Kappa (k)

Kappa	Concordancia
<0.00	Pobre
0.00 – 0.20	Leve
0.21 – 0.40	Razonable
0.40-0.60	Moderada
0.61-0.80	Considerable
0.80-1.00	Perfecta

Fuente: Landis, J. & Koch, G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174

Anexo 7. Índice de Youden

$$IY = S + E - 1$$

IY= índice de Youden S= sensibilidad E= especificidad

Fuente: Epidat. (2016). *Indicadores estadísticos básicos para evaluar el desempeño de un procedimiento diagnóstico.* (Versión 4.2). [Software]. España: Organización Panamericana de la Salud.

Anexo 8. Teorema de Bayes.

$$P_{\text{post}} = \frac{(P)(CP)}{1 + P (CP - 1)}$$

P= Probabilidad Pre-Prueba

CP= Cociente de Probabilidad

Fuente: Molinero, L. (2002). Valoración de pruebas diagnósticas. *Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial.* (1-7).



Br. Cindy Carolina Rogio Villalobos Morales
Autor



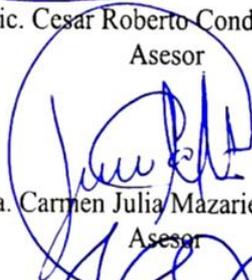
Br. Sofia Maribel Soberanis López
Autor



Br. Brenda Elizabeth Guzman Escobar
Autor



Lic. Cesar Roberto Conde Pereira
Asesor



Licda. Carmen Julia Mazariegos Herrera
Asesor

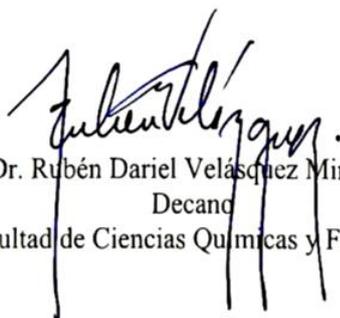


M.A. Isabel Cristina Gaitan Fernandez
Asesor



MSc. Alba Marina Valdés de García
Directora

Escuela Química Biológica



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia