

Artículo Original

Bacteriología

Kasmera 47(1):29-37, Enero-Junio, 2019
ISSN 00755222 E-ISSN 2477-9628



Validación e implementación de GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico de tuberculosis en Ecuador

Validation and implementation of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of Tuberculosis in Ecuador

Ortiz-Jiménez José  ¹, Franco-Sotomayor Greta², Ramos-Ramirez Martha³

¹Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. ²Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Guayaquil, Ecuador. ³Carrera de Laboratorio Clínico, Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador

Resumen

El objetivo del estudio fue la validación e implementación de GeneXpert MTB/RIF para uso rutinario en la detección rápida de tuberculosis, y sensibilidad a la rifampicina en muestras clínicas; para esto se recogieron 1592 muestras respiratorias y fueron analizadas en el laboratorio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Guayaquil. El análisis de los resultados de GeneXpert en comparación con la baciloscopia mostraron una sensibilidad inicial de 99,8% y especificidad de 93,2%; el análisis de discrepancias utilizando los resultados del cultivo como método de referencia mostró que los resultados de GeneXpert considerados falsos negativos resultaron ser verdaderos negativos, lo mismo sucede con los falsos positivos que corresponden a verdaderos positivos. Recalculada la sensibilidad y especificidad del GeneXpert se tuvo 99,8% y 100% correspondientemente. La comparación con pruebas de sensibilidad a drogas mostró una sensibilidad de 91,4% y una especificidad del 95,5% para el sistema GeneXpert MTB/RIF. Se concluye que la implementación del sistema GeneXpert en Ecuador permitió dar solución a ciertos problemas asociados con la aplicación de las metodologías de diagnóstico convencionales, disminuyendo los tiempos de espera, e incrementando la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la tuberculosis resistente a drogas, generando una valiosa oportunidad de diagnóstico temprano.

Palabras clave: Estudios de validación, esputo, sensibilidad, especificidad, rifampicina, *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract

The objective of the study was the validation and implementation of GeneXpert MTB/RIF for routine use in the rapid detection of tuberculosis and sensitivity to rifampicin in clinical samples; for this, 1592 respiratory samples were collected and analyzed in the laboratory of Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Guayaquil. The analysis of the results of GeneXpert in comparison with smear microscopy showed an initial sensitivity of 99.8% and specificity of 93.2%. The analysis of discrepancies using the results of the culture as a reference method showed that the GeneXpert results considered false negatives turned out to be true negatives, the same happens with the false positives that correspond to true positives. Recalculated the sensitivity and specificity of the GeneXpert was 99.8% and 100% correspondingly. The comparison with the drugs susceptibility test showed a sensitivity of 91.4% and a specificity of 95.5% for the GeneXpert MTB/RIF system. It is concluded that the implementation of the GeneXpert system allows solution to certain problems associated with the application of conventional diagnostic methodologies, decreasing the waiting times, and increasing the sensitivity and specificity in the diagnosis of drug-resistant tuberculosis, thus generating a valuable opportunity for early diagnosis.

Keywords: Validation studies, sputum, sensitivity, specificity, rifampin, *Mycobacterium tuberculosis*.

Recibido: 15/09/2018

Aceptado: 16/01/2019

Publicación en línea: 28/01/2019

Como Citar: Ortiz-Jiménez J, Franco-Sotomayor G, Ramos-Ramirez M. Validación e implementación de GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico de tuberculosis en Ecuador. *Kasmera*. 2019;47(1):29-37

Autor de Correspondencia: Ortiz Jiménez José Marcelo. E-mail: jortiz@unach.edu.ec; bfmarcelojortiz@gmail.com

Una lista completa con la información detallada de los autores está disponible al final del artículo.

©2019. Los Autores. **Kasmera**. Publicación del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons atribución no comercial (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre y cuando la obra original sea debidamente citada.



Introducción

Existen ciertos autores como Farga (1) quienes sostienen que un tercio de la población mundial está infectada por el bacilo de Koch. Según los Informes Mundiales sobre la Tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estimó un desfase de 4,3 millones entre las notificaciones de casos nuevos y el número estimado de casos incidentes en 2015 (2), mientras que en el 2016 se establece una brecha de 4,1 millones entre casos nuevos notificados frente a la incidencia estimada que fue de 10,4 millones para este año (3), lo que refleja una combinación de subnotificación y subdiagnóstico. Esto se debe a diferentes obstáculos, incluyendo la falta de cobertura de los laboratorios, retrasos en el flujo de la información y ausencia de tecnología en entornos con recursos limitados.

La detección temprana de la infección mediante el diagnóstico rápido de los casos es de vital importancia en el control de la transmisión, administración de tratamiento y disminución de la morbilidad y mortalidad (3). Existen estrategias para el diagnóstico de la Tuberculosis y Tuberculosis Resistente a Drogas, de acuerdo a las poblaciones de riesgo; una de ellas es el uso de GeneXpert MTB/RIF (Xpert). Este es un sistema que emplea un método de análisis por biología molecular, que permite un diagnóstico bacteriológico rápido y ofrece la posibilidad de conocer la susceptibilidad a la rifampicina de las cepas en estudio en menos de dos horas. El ensayo Xpert MTB/RIF, es una plataforma de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real automatizada, integrada y semicuantitativa, que utiliza el sistema GeneXpert (Cepheid, USA). Esta prueba identifica el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y detecta las mutaciones más frecuentes en el gen *rpoB* asociadas a resistencia a rifampicina (RIF), directamente de muestras de pacientes con síntomas de tuberculosis, en menos de dos horas. La plataforma consiste en un sistema cerrado de biología molecular que utiliza cartuchos desechables de un solo uso que son independientes para el procesamiento de la prueba. Con ello, se reduce al mínimo el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras y permite realizar una prueba de biología molecular con bajos requerimientos de bioseguridad e infraestructura (4).

Por otro lado, se considera la aplicación de los algoritmos de diagnóstico de tuberculosis por métodos convencionales acorde a las recomendaciones de la OMS (5).

Los resultados de la baciloscopía (BK) se correlacionan con los diferentes métodos de diagnóstico; por lo cual es necesario garantizar la calidad de las muestras respiratorias para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. La adecuada instrucción al paciente para la obtención de esputo en lugar de saliva es importante para lograr la obtención de una muestra de calidad, optimizando el rendimiento diagnóstico dado que las muestras de mala calidad pueden proporcionar resultados falsos negativos (1).

Se puede mejorar la confiabilidad de cualquiera de los métodos ya sean convencionales o modernos con la aplicación de medidas sencillas como la evaluación visual de calidad de las muestras de esputo, de esta forma disminuir los tiempos de respuesta, tomando en cuenta que la baciloscopía proporciona resultados en un tiempo de 24 horas, mientras que el cultivo y la prueba de sensibilidad a drogas puede requerir un tiempo de 2 a 8 semanas para producir un resultado, por lo cual si las primeras muestras analizadas son adecuada, se agiliza el proceso de diagnóstico e inicio de tratamiento.

El problema principal radica en que los métodos convencionales de diagnóstico de tuberculosis proporcionan resultados en tiempos relativamente largos, lo cual extiende los tiempos de espera para ingreso a tratamiento, más aun considerando que de acuerdo a la OMS alrededor del 3% de los enfermos tuberculosos nuevos a nivel mundial son portadores de cepas resistentes, pudiendo llegar hasta el 15% de acuerdo a variaciones regionales (1). La consecuencia final es que al no existir un efectivo control de la cadena de transmisión de la enfermedad por el retraso en el inicio del tratamiento se incrementa el riesgo de contagio de la población expuesta.

En el año de 1996, la FDA aprobó el uso de pruebas de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAA), mientras que, en 2009, el CDC emitió directrices para su uso normalizado, indicando que debe realizarse NAA en al menos una muestra respiratoria de cada paciente con signos y síntomas de tuberculosis pulmonar para lo que se considera un diagnóstico de la TB (2). El sistema GeneXpert es un método automatizado que consiste en la ejecución de un ensayo de amplificación de ácido nucleico dentro de un cartucho, el cual permite la detección simultánea de tuberculosis y la resistencia a rifampicina en un tiempo estimado de 2 horas. Este método detecta simultáneamente el ADN del *Mycobacterium tuberculosis* y la presencia de mutaciones del gen *rpoB*, responsable de la resistencia a rifampicina (6).

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador realiza la adquisición del sistema GeneXpert MTB/RIF en el año 2011, y se lo implementa a partir del año 2012 como parte de la implementación de la estrategia Alto a la Tuberculosis promovida por la OMS, en cuyos componentes se consideraba "Asegurar la detección de temprana de casos mediante pruebas bacteriológicas de calidad garantizada", y, "Abogar y participar en investigaciones para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, medicamentos y vacunas" (2), por lo cual se da lugar a la implementación del método en diferentes laboratorios con cobertura nacional. El propósito de este artículo es la ejecución de un protocolo de validación del sistema GeneXpert MTB/RIF como parte de la implementación para el uso rutinario en la detección rápida de tuberculosis y análisis de sensibilidad a rifampicina en muestras clínicas de pacientes en zonas de mayor incidencia de infección por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a drogas (2).

En el estudio comparativo se aplicaron diferentes métodos convencionales de diagnóstico de micobacterias como baciloscopía, cultivo por el método de Ogawa Kudoh modificado, pruebas morfológicas y bioquímicas de identificación de especies (pruebas de niacina, nitrato reducción y catalasa), y pruebas de sensibilidad a drogas (PSD) por el método de las proporciones en medio de Lowenstein-Jensen (proporciones de Canetti).

Con el fin de asegurar el control de calidad del rendimiento del sistema GeneXpert MTB/RIF y validar su aplicación, esta prueba se realizó en paralelo con la baciloscopía, cultivo bacteriológico y PSD convencional en medio sólido; se realizó también la evaluación de la calidad de las muestras mediante la evaluación visual.

El resultado esperado de la implementación y validación del sistema Xpert MTB/RIF es contar con un método de prueba rápida y fiable que puede ser incluido en los algoritmos de diagnóstico de tuberculosis en muestras respiratorias acorde a los lineamientos de la OMS (8), cuya aplicación en poblaciones con alta incidencia de tuberculosis y grupos de riesgo permita disminuir los tiempos de espera para el diagnóstico e inicio de tratamiento, logrando una disminución del riesgo de exposición de la población a la infección, al ser este un factor preponderante en control de la progresión de la enfermedad (9).

Métodos

La validación del sistema Xpert MTB/RIF fue realizada mediante un análisis comparativo con los métodos convencionales de diagnóstico de tuberculosis (Baciloscopía, cultivo y PSD) considerados como Gold Standard.

La investigación se realizó en diferentes etapas que parten desde la implementación del método y finaliza con la validación como se describe a continuación:

Implementación del método. La Dirección Nacional de Estrategias de Prevención y Control del Ministerio de Salud Pública, a través de su unidad denominada Estrategia Nacional de Tuberculosis, realizó la adquisición de 5 instrumentos GeneXpert, los cuales han sido distribuidos para su uso de acuerdo a la epidemiología de la enfermedad en diferentes laboratorios del país con el fin de lograr una efectiva cobertura, agilidad y oportunidad en el diagnóstico de la enfermedad. Como parte de la implementación, el Laboratorio Supranacional de Referencia de Tuberculosis de Massachusetts (MSRL) proporcionó capacitación en el uso, mantenimiento, validación e interpretación de los resultados.

Validación del método. Por el lapso de 4 meses comprendidos de julio a octubre de 2012, un total de 1592 muestras respiratorias recolectadas de pacientes con sospecha de Tuberculosis en todo el país, fueron analizadas principalmente en el laboratorio Nacional de Tuberculosis del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la Ciudad de Guayaquil, así como en los otros laboratorios destinados para el propósito

donde se ha puesto a prueba el uso de estos instrumentos. Con el fin de asegurar el control de calidad del sistema Xpert y validar su aplicación, esta prueba se realizó en paralelo con la baciloscopía, cultivo bacteriológico y PSD convencional en medio sólido.

Las pruebas de sensibilidad se llevaron a cabo únicamente en el Laboratorio Nacional de Tuberculosis del INSPI, para lo cual el Laboratorio Supranacional de Referencia de Tuberculosis de Massachusetts realizó previamente la evaluación externa de la calidad de estas pruebas, obteniendo un desempeño satisfactorio con una sensibilidad y especificidad del 100%.

Criterios de inclusión. Las muestras deben provenir de pacientes sintomáticos respiratorios, que formen parte de los grupos de riesgo como: contactos de pacientes con Tuberculosis MDR, pacientes en re-tratamiento, fracaso del tratamiento como abandono recuperado o recaída, coinfección TB/VIH, inmunodeprimidos (principalmente por enfermedades como diabetes o cáncer), personal de salud diagnosticado con tuberculosis y personas privadas de la libertad.

Criterios de exclusión. Fueron excluidas del estudio aquellas muestras que no fueron de origen pulmonar (extrapulmonares), sin embargo, estas fueron analizadas en el laboratorio por los diferentes métodos con fines diagnósticos.

Clasificación de las muestras mediante una evaluación visual. Considerando que la calidad de las muestras es de vital importancia para el diagnóstico, se realizó una clasificación de las muestras mediante una evaluación visual de la calidad para la caracterización de la apariencia macroscópica de las muestras de esputo, con lo cual al obtener los resultados del análisis se podrá correlacionar la calidad de las muestras con los resultados obtenidos. Las muestras fueron clasificadas en cuatro categorías para determinar la calidad de las muestras: saliva (SAL); sanguinolenta (SANG), mucosa (MUC) y mucopurulenta (MP) de acuerdo a lo establecido en el manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis de la Organización Panamericana de la Salud (10).

Análisis de resultados. Posterior a la finalización del tiempo establecido para el estudio se realizó la recolección de los resultados de 4776 pruebas realizadas a las 1592 muestras incluidas en el estudio, tomando en cuenta que todas las muestras se procesaron por baciloscopía, cultivo y GeneXpert; por otro lado se realizaron pruebas de susceptibilidad por el método convencional así como por Xpert MTB/RIF a las 282 muestras en las cuales se obtuvo un resultado de cultivo positivo, se debe considerar además que el tiempo que transcurre para la obtención del resultado de la prueba realizada por métodos de cultivo y PSD es entre 2 a 8 semanas, y finalmente se realiza el análisis de los resultados.

Los resultados de baciloscopía de las 1592 muestras analizadas fueron clasificados de acuerdo a la escala adoptada internacionalmente para el informe de

resultados en diferentes grupos: "Negativo", "Número de bacilos" (se observan de 1 a 9 Bacilos Ácido Resistentes [BAR] en 100 campos observados), "1+" (10 a 99 BAR en 100 campos observados), "2+" (1 a 10 BAR por campo en 50 campos observados) y "3+" (más de 10 BAR por campo en 20 campos observados) (10).

Los resultados de cultivo de las 1592 muestras analizadas fueron clasificados según lo recomienda el Manual de Cultivo de la OMS, escala que ha sido adoptada internacionalmente para el informe de resultados en: "Negativo" (no se evidencia crecimiento de colonias), "Colonias individuales" (entre 1 y 19 colonias en el total de medios sembrados), "1+" (20 a 100 colonias), "2+" (Más de 100 colonias) y "3+" (Colonias incontables) (11).

Se realizó un análisis de correlación utilizando tablas de 2x2, con el fin de establecer el grado de correlación entre los métodos convencionales (baciloscopia, cultivo y pruebas de susceptibilidad) frente al método en estudio, y de acuerdo a esto determinar la sensibilidad y especificidad del método, para lo cual se considera un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se toma en cuenta durante el análisis que, de acuerdo a los criterios de

inclusión, las muestras fueron obtenidas de pacientes con alta sospecha de tuberculosis, y que se encuentran asociados a factores de riesgo de padecer tuberculosis resistente a las drogas. Así mismo todos los pacientes fueron identificados como sintomáticos respiratorios, y poseen criterios clínicos asociados a la enfermedad, sin embargo, no todos fueron sometidos a confirmación por imagen debido a la disponibilidad y acceso.

Resultados

Positividad de las muestras de esputo de acuerdo a la apariencia macroscópica. En cuanto a la positividad de las muestras de esputo, la evaluación visual de la calidad de las muestras permitió realizar la clasificación de los especímenes analizados en las diferentes categorías: SAL; SANG, MUC y MP; de esta forma se compara la calidad de la muestra con el resultado de los diferentes métodos analíticos aplicados, pudiendo tener un rendimiento del método de acuerdo a estas características con respecto al total de muestras analizadas. Estos datos se observan en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Positividad de las muestras de esputo de acuerdo a la apariencia macroscópica de la muestra y el método utilizado para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Método	Clasificación	Apariencia de las muestras								Total
		SAL		SANG		MUC		MP		
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Baciloscopia	Negativa	97	6,1	45	2,8	482	30,3	551	34,6	1175
	Escasos	5	0,3	5	0,3	13	0,8	24	1,5	47
	1+	9	0,6	5	0,3	31	1,9	99	6,2	144
	2+	1	0,1	8	0,5	27	1,7	63	4,0	99
	3+	3	0,2	3	0,2	11	0,7	110	6,9	127
	Total		115		66		564		847	
Cultivo	Negativo	99	6,2	45	2,8	477	30,0	567	35,6	1188
	Colonias individuales	4	0,3	9	0,6	3	0,2	24	1,5	40
	POS 1+	8	0,5	7	0,4	16	1,0	48	3,0	79
	POS 2+	3	0,2	3	0,2	32	2,0	83	5,2	121
	POS 3+	7	0,4	6	0,4	28	1,8	123	7,7	164
Total		121		70		556		845		1592
Xpert-MTB	MTB No Detectado	92	5,8	73	4,6	435	27,3	508	31,9	1108
	MTB Detectado	30	1,9	25	1,6	104	6,5	325	20,4	484
	Total	122		98		539		833		1592

SAL: saliva; SANG: sanguinolenta; MUC: mucosa; MP: mucopurulenta

El grupo MP, el cual es el único que se compone principalmente de esputo contiene la mayor proporción de resultados positivos entre las categorías de baciloscopia, en el cual se observa hasta un 6,9% de positividad con respecto al número total de muestras analizadas; estas muestras se pueden considerar de buena calidad y por ende permiten un incremento en la capacidad de diagnóstico. Los resultados obtenidos de las muestras con apariencia MUC arrojaron un grado de positividad menor en la baciloscopia, aunque sigue siendo significativo al observar el 1,9% respecto al total de muestras analizadas. Pese a que las muestras mucosas tienen una buena calidad, comparativamente se las

considera de menor calidad que las mucopurulentas. En el caso de las muestras sanguinolentas y saliva, estas presentaron una positividad relativamente baja con relación a las anteriores, 0,5% y 0,6% respectivamente ([Tabla 1](#)).

Las muestras mucopurulentas presentan una tendencia de incremento de la positividad en relación al incremento de la carga bacteriana, en contraposición de las muestras con otras características macroscópicas en las cuales se muestra una relación inversa de la positividad con la proporción de la carga bacteriana.

El análisis de los datos del rendimiento del cultivo bacteriano demostró una tendencia similar que en el caso de la baciloscopia; estos datos se muestran en la parte central de la [Tabla 1](#). Las muestras fueron categorizadas por inspección visual; y los resultados del cultivo se encuentran clasificados como colonias individuales, 1+, 2+ y 3+; en este método la mayor positividad se concentró en las muestras mucopurulentas, las cuales presentan una positividad con respecto al total de las muestras analizadas que va desde el 1,5% de las muestras en las cuales se evidencia crecimiento de colonias individuales, y el porcentaje va en ascenso hasta 7,7% en las muestras que presentan crecimiento de 3+; a continuación se encuentran las muestras MUC, SANG y SAL.

En el sistema GeneXpert MTB/RIF se aplicó la diferenciación de la apariencia macroscópica de las muestras en forma similar que en los otros métodos, observándose el mismo comportamiento; en este caso el resultado de la prueba para diagnóstico de tuberculosis en las muestras analizadas se presentó únicamente en dos formas: "MTB Detectado" (Positivo) y "MTB no detectado" (Negativo); se observó una positividad con respecto al total de las muestras analizadas del 20,4% en muestras mucopurulentas, seguido de las mucosas (6,5%), salivales (1,9%) y sanguinolentas (1,6%).

Rendimiento de baciloscopia y cultivo bacteriológico.

Al ser la baciloscopia un método fundamental en el diagnóstico de la tuberculosis, todos los algoritmos de diagnóstico convencionales así como los nuevos, se basan en el resultado de ésta, y, debido a que el rendimiento de la baciloscopia depende de la capacidad del laboratorio así como de la población en la que se aplica y la epidemiología de la enfermedad, esta debía ser evaluada frente al "gold standard" que en este caso es el cultivo bacteriológico. Así, los resultados del frotis fueron clasificados en función de la carga bacteriana: negativo, escasos, 1+, 2+ y 3+; para efectos de un mejor análisis y para poder determinar los falsos positivos y negativos se clasificaron las muestras procesadas por cultivo como negativo, colonias individuales, 1+, 2+ y 3+, además se han relacionado los datos con los resultados del GeneXpert MTB/RIF clasificados como MTB detectado y MTB no detectado; se ha incluido la información recopilada en la [Tabla 2](#).

Los datos de la [Tabla 2](#) reflejan la capacidad de la baciloscopia de detectar la presencia del bacilo de la tuberculosis, observándose que existe una relación directamente proporcional entre la baciloscopia y el cultivo, determinando que a medida que se incrementa el conteo de colonias del cultivo mejora la capacidad de detección de la baciloscopia. Para un mejor análisis los datos de la [Tabla 2](#), se han extraído y se han colocado en tablas de 2x2 para la determinar la sensibilidad y especificidad del GeneXpert frente a cada uno de los ensayos (baciloscopia y cultivo).

Como se muestra en la [Tabla 3](#), 1.483 de un total de 1.592 muestras analizadas por baciloscopia y cultivo fueron concordantes: 1.127 de ellas eran Cultivo

negativo/baciloscopia negativa, por lo que representa los verdaderos negativos (VN) y 356 muestras analizadas Cultivo positivo/baciloscopia positiva que representa a los verdaderos positivos (VP). Para determinar el número de VP se utilizaron los datos de la [Tabla 2](#) por sumatoria de las muestras que dieron resultados positivos para cultivo y baciloscopia. Del total de 1592 muestras, 109 dieron resultados discordantes; de estos 48 fueron baciloscopia negativa/cultivo positivo consideradas como falsos negativos (FN) y 61 fueron cultivo negativo/baciloscopia positiva, representados como falsos positivos (FP). A partir de estos datos se determina la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN); se utiliza un IC de 95% para el cálculo de estos parámetros y sus respectivos límites de confianza, obteniendo los siguientes resultados; sensibilidad 88,1% (84,8- 91,4; IC 95%); especificidad 94,9% (93,6-96,2; IC 95%); VPP 85,4% (81,9-88,9; IC 95%) y VPN 95,9% (94,7-97,1; IC 95%).

Tabla 2. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* por baciloscopia, cultivo y GeneXpert MTB/RIF.

BK	Cultivo	Xpert MTB		Total
		MTB detectado	MTB no detectado	
Negativo	Negativo	46	1081	1127
	Colonias individuales	16		16
	Pos 1+	16		16
	Pos 2+	8		8
	Pos 3+	8		8
Total negativo		94	1081	1175
Escasos	Negativo	17	6	23
	Colonias individuales	4		4
	Pos 1+	8	1	9
	Pos 2+	7		7
	Pos 3+	4		4
Total escasos		40	7	47
1+	Negativo	15	13	28
	SC	13		13
	Pos 1+	31		31
	Pos 2+	43		43
	Pos 3+	29		29
Total 1+		131	13	144
2+	Negativo	3	4	7
	Colonias individuales	5		5
	Pos 1+	11		11
	Pos 2+	36		36
	Pos 3+	40		40
Total 2+		95	4	99
3+	Negativo		3	3
	Colonias individuales	2		2
	Pos 1+	12		12
	Pos 2+	27		27
	Pos 3+	83		83
Total 3+		124	3	127
Total		484	1108	1592

Tabla 3. Resumen de datos de desempeño de baciloscopia en comparación con los resultados de cultivo.

Baciloscopia	Cultivo		Total
	Positivo	Negativo	
Positiva	356 (BK VP)	61 (BK FP)	417
Negativa	48 (BK FN)	1127 (BK VN)	1175
Total	404	1188	1592

Desempeño del Xpert y baciloscopia. Los resultados del análisis comparativo entre Xpert y la baciloscopia en el diagnóstico de Tuberculosis se resumen en la [Tabla 4](#). De

acuerdo a los datos analizados existieron dos grupos concordantes que incluyen 1.081 verdaderos negativos y 390 verdaderos positivos; de igual manera existen dos grupos discordantes que incluyen 121 muestras, de los cuales 94 fueron positivos para Xpert y negativo para baciloscopia, mientras que 27 muestras dieron Xpert negativo/baciloscopia positiva. Para efectos del análisis de los datos de la [Tabla 4](#), y dado que el propósito del protocolo fue la validación del sistema GeneXpert MTB/RIF, en el estudio realizado se consideró a la baciloscopia como "gold standard" por lo cual se clasifica a los datos discordantes como falsos positivos para GeneXpert (Xpert FP) y Falsos negativos para GeneXpert (Xpert-FN). En base a las consideraciones establecidas, se determina la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, así como sus respectivos límites de confianza utilizando un IC de 95%, obteniendo los siguientes resultados; sensibilidad 93,5% (91,0-96,0; IC 95%); especificidad 92,0% (90,4-93,6; IC 95%); VPP 80,6% (77,0-84,2; IC 95%); VPN 97,6% (96,61-98,51; IC 95%).

Tabla 4. Desempeño de GeneXpert MTB/RIF en comparación con baciloscopia.

Xpert	Baciloscopia		Total
	Positiva	Negativa	
Positivo	390 (Xpert VP)	94 (Xpert FP)	484
Negativo	27 (Xpert FN)	1081 (XpertVN)	1108
Total	417	1175	1592

Desempeño Xpert y cultivo. La comparación entre el método Xpert y el cultivo bacteriológico se realiza a partir de los datos recolectados en la [Tabla 2](#), los cuales se resumen en la [Tabla 5](#). Se establece dos grupos concordantes, de los cuales 1.107 son cultivo negativo/Xpert Negativo (VN), y 403 cultivo positivo/Xpert positivo (VP), mientras que las discordancias reflejan 1 cultivo positivo/Xpert negativo (FN) y 81 cultivos negativos/Xpert positivo (FP). A continuación, se muestran los resultados del cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN utilizando un valor de IC de 95%. Sensibilidad 99,8% (99,1-100; IC 95%); especificidad 93,2% (91,7-94,7; IC 95%); VPP 83,3% (79,8-86,7; IC 95%); VPN 99,9% (99,7-100; IC 95%)

Tabla 5. Desempeño de GeneXpert MTB/RIF en comparación con el cultivo bacteriológico.

Xpert	Cultivo		Total
	Positivo	Negativo	
Xpert-positivo	403 (Xpert VP)	81 (Xpert FP)	484
Xpert-negativo	1 (Xpert FN)	1107 (Xpert VN)	1108
Total	404	1188	1592

Se observó la presencia de 1 resultado de Xpert considerado como FN; esto puede explicarse debido a que la sensibilidad del método puede verse afectada por contaminaciones, inadecuado procesamiento o la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación. Por otra parte, se observa que existen 81 muestras de Xpert consideradas como FP, ya que el cultivo fue negativo y el Xpert las reporta como positivas, en este caso se debe tomar en consideración que el sistema GeneXpert al emplear el principio de amplificación de

ácidos nucleicos posee una mayor sensibilidad en comparación con la baciloscopia y el cultivo, por lo que estos valores podrían asumirse como VP y sumarlos a esta categoría. Por otra parte, el resultado FN obtenido pudiera corresponder a un FN de baciloscopia y cultivo.

En base a estas consideraciones se ajustan los datos y se presentan en la [Tabla 6](#), donde se compara el desempeño de cultivo bacteriológico en comparación con GeneXpert MTB/RIF teniendo que la concordancia entre los resultados del cultivo y GeneXpert determina que existen 403 Cultivos VP, y 1107 cultivos VN, mientras que las discordancias corresponden a 1 Cultivo FP y 81 Cultivos FN. Con esta consideración se realiza el cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y sus límites de confianza, utilizando un IC de 95% para el cultivo en relación con el GeneXpert como se resume a continuación: sensibilidad 83,3% (79,8-86,7; IC 95%), especificidad 99,9% (99,7-100; IC 95%); VPP: 99,8% (99,1-100; IC 95%); VPN: 93,2% (91,7-94,7; IC 95%).

Tabla 6. Desempeño de cultivo bacteriológico en comparación con GeneXpert MTB/RIF.

Cultivo	Xpert		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	403 (Cultivo VP)	1 (Cultivo FP)	404
Negativo	81 (Cultivo FN)	1107 (Cultivo VN)	1188
Total	484	1108	1592

Detección de resistencia a rifampicina. Los cartuchos del sistema GeneXpert realizan, además del diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*, la detección de resistencia a rifampicina; esta prueba se efectúa únicamente a las muestras que dieron positivo en la prueba que indica presencia de *Mycobacterium tuberculosis*. El análisis comparativo de Xpert RIF se lo realizó frente al método convencional de PSD en medio sólido, el cual fue previamente evaluado por el MSRL, dando resultados de 100% de sensibilidad y especificidad, por lo cual se lo consideró como "gold standard" para el protocolo aplicado; en la [Tabla 7](#) se resumen los datos. Se observa que existen dos grupos concordantes: 53 verdadero resistente y 214 verdadero sensible; de igual forma las discordancias muestran 5 falsos sensibles y 10 falsos resistentes. En base a estos datos se determina el desempeño de la prueba en detección de resistencia obteniendo los siguientes resultados: sensibilidad 91,4% (83,3-99,5; IC 95%); especificidad 95,5% (92,6-98,5; IC 95%); VPP 84,1% (74,3-93,9; IC 95%); VPN 97,7% (95,5-99,9; IC 95%).

Tabla 7. Desempeño del GeneXpert MTB/RIF en comparación con PSD convencional.

XPRT RIF	Pruebas de susceptibilidad a las drogas, método convencional		Total
	Resistente	Sensible	
Detectado	53 (VR)	10 (FR)	63
No detectado	5 (FS)	214 (VS)	219
Total	58	224	282

Discusión

Mediante la evaluación de la apariencia macroscópica de las muestras respiratorias (esputo) se puede obtener una optimización del desempeño de las pruebas de diagnóstico de tuberculosis, dado que de acuerdo a lo observado, las muestras en las cuales se obtuvo un mejor rendimiento fueron aquellas mucopurulentas, seguido de las mucosas, garantizando así el resultado en las pruebas con menor sensibilidad, corroborando la existencia de correlación entre los resultados del cultivo y la baciloscopia (11). Para cumplir este propósito es importante que el personal de salud tome en cuenta ciertas consideraciones y normativas respecto a la recolección de las muestras como el momento de la toma, número de muestras, calidad de la muestra, tipo de muestra, transporte y conservación, capacitación al paciente para la recolección de muestras (1).

Teniendo en cuenta el objetivo de la OMS referente a la sensibilidad y especificidad de la baciloscopia del 85% y 95% correspondientemente, así como los numerosos datos publicados por otros grupos, el desempeño de la baciloscopia en el presente estudio fue óptimo. Por lo tanto, los resultados de la baciloscopia pueden ser utilizados como indicadores legítimos de la detección de la tuberculosis (9).

De acuerdo a la evaluación del desempeño del GeneXpert MTB/RIF frente a baciloscopia y cultivo se determinó que el método GeneXpert MTB/RIF presenta una alta sensibilidad; al realizar el análisis de discrepancias en lo cual se considera que el GeneXpert MTB/RIF por ser un método de secuenciación de ADN posee mayor sensibilidad, en tal razón el desempeño del sistema Xpert MTB/RIF en la prueba de detección de *Mycobacterium tuberculosis*, así como de resistencia a rifampicina dio resultados satisfactorios (6,2). Considerando además el estudio realizado por Nava Paz, y col., "Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar" (12), y dado que el sistema GeneXpert se basa en la aplicación de la técnica por PCR, existe concordancia en la alta sensibilidad que esta técnica le confiere al método analizado; esta capacidad puede aprovecharse para implementar el sistema Xpert MTB-RIF en los algoritmos de diagnóstico en pacientes de grupos de alto riesgo (5), y permitirá además establecer sistemas de vigilancia epidemiológica (13), brindando una oportunidad valiosa en el diagnóstico específico y seguimiento del *Mycobacterium tuberculosis* en poblaciones con baja incidencia de la enfermedad (14).

Las discrepancias pueden explicarse por diversas razones; un resultado falso negativo puede ser verdadero negativo debido a que se trata de una infección por micobacterias diferentes de tuberculosis. Un resultado falso negativo puede deberse a la presencia de inhibidores de la reacción en la muestra. Los resultados positivos de baciloscopia pueden ser falsos positivos, debido a la sensibilidad del método, además que requiere un adecuado manejo de la técnica de

coloración; por otro lado, se debe tomar en cuenta que la eficiencia del método puede estar ligada a la prevalencia de la enfermedad; por otro lado, existen micobacterias no tuberculosas que pueden ser confundidas microscópicamente, debido a que la especificidad del método microscópico no permite esta diferenciación. Las discrepancias en la detección de resistencia a rifampicina determinan que puede haber mutaciones no visibles o silenciosas, que podrían ser clínicamente relevantes, las cuales pueden ser detectadas por secuenciación (14).

Considerando que el método de PSD convencional que se efectúa en el Laboratorio Nacional de Tuberculosis del INSPI fue evaluado previamente por el MSRL y se determinó una sensibilidad y especificidad del 100%, la sensibilidad y especificidad que presenta el GeneXpert MTB/RIF es menor, y esto se puede explicar por las limitaciones del método de PCR debido a que aproximadamente el 95% de las mutaciones en el gen *rpoB* se encuentran dentro de la región polimórfica hipercorta, mientras que el 5% de mutaciones se encuentran fuera de esta región, por lo cual pasan desapercibidas en el análisis dando resultados falsos sensibles; por otro lado existen mutaciones que son detectadas dentro de esta región, sin embargo son silenciosas lo cual conduce a resultados de falsas resistencias. Pese a esto el desempeño de la prueba en los laboratorios analizados es muy bueno de acuerdo a las consideraciones expuestas (15). Debe considerarse además que de acuerdo a estudios similares en poblaciones con baja incidencia de tuberculosis y de resistencia a drogas establecen que la detección de las resistencias está ligada a las tasas de prevalencia (14).

Existen limitaciones del sistema GeneXpert, ya que no se encuentran diseñados para su uso en laboratorios periféricos, debido a que no se tiene suficiente evidencia para evaluar su desempeño con diferentes tipos de muestras (16,17), sin embargo dados los resultados obtenidos en el estudio realizado, así como en similares, es importante considerar la inclusión de esta metodología que permitirá una optimización de los recursos, al obtener un diagnóstico temprano, e inicio de tratamiento para Tuberculosis sensible así como los casos más comunes de Tuberculosis resistente a las drogas (18).

En conclusión, el rendimiento del sistema GeneXpert MTB/RIF demostró la validez de las dos pruebas comparativamente con los métodos convencionales de diagnóstico al presentar porcentajes de sensibilidad y especificidad mayores al 90%, calculados utilizando un IC del 95%, en tal razón el método se considera como una prueba rápida fiable que debería ser incluido en los algoritmos de diagnóstico de muestras respiratorias, cuya aplicación en lugares con alta incidencia de la enfermedad podría disminuir los tiempos de espera de diagnóstico e ingreso a tratamiento, con lo cual se tendría menos días de infectividad y disminución de la probabilidad de progresión de la enfermedad (18).

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Salud Pública, al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública y al Laboratorio Supranacional de Referencia de Tuberculosis de Massachusetts por el apoyo brindado para la ejecución de la investigación, la obtención y uso de la información que han permitido validar un nuevo método que mejorará la respuesta al diagnóstico de una enfermedad con gran impacto en la salud Pública del Ecuador.

Un especial agradecimiento al personal operativo de la Estrategia Nacional de Tuberculosis, al Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública, por haber permitido la utilización de los datos para la elaboración del presente artículo; al Laboratorio Supranacional de Massachusetts por haber brindado su apoyo en la implementación del estudio y análisis de la información.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no presentar conflictos de intereses.

Referencias Bibliográficas

- Farga V, Camerino JA. Tuberculosis. 3ra ed. Buenos Aires: Editorial mediterraneo; 2011. 483 p.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016 [Internet]. World Health Organization. Ginebra: World Health Organization; 2016. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017 [Internet]. World Health Organization. Geneva; 2017 [citado 15 de enero de 2019]. Disponible en: <https://extranet.who.int/tme>
- Herrera T, Arias F, Ruiz N, col. MANUAL OPERATIVO Implementación del GeneXpert MTB / RIF en el Programa de Tuberculosis [Internet]. Santiago de Chile: Ministerio de Salud. Gobierno de Chile; 2017 [citado 15 de enero de 2019]. 25 p. Disponible en: https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2018/02/2018.01.23_MANUAL-XPRT.pdf
- Pantoja A, Fitzpatrick C, Vassall A, Weyer K, Floyd K. Xpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis: A cost and affordability analysis. Eur Respir J [Internet]. 2013;42(3):708-20. Disponible en: <https://eri.ersjournals.com/content/42/3/708>
- Weyer K, Mirzayev F, Migliori GB, Van Gemert W, D'Ambrosio L, Zignol M, et al. Rapid molecular TB diagnosis: Evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. Eur Respir J [Internet]. 2013;42(1):252-71. Disponible en: <https://eri.ersjournals.com/content/42/1/252>
- Uplekar M, Figueroa-Munoz J, Floyd K. The Stop TB Strategy: building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. [Internet]. WHO report. Geneva; 2006 [citado 15 de enero de 2019]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69241/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf;jsessionid=F3A55CF227C99794463DA5069B2E9048?sequence=1
- World Health Organization. CONSEJO EJECUTIVO EB134/12 134.ª reunión 29 de noviembre de 2013 Punto 6.1 del orden del día provisional [Internet]. Geneva; 2013 [citado 15 de enero de 2019]. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB134/B134_12-sp.pdf?ua=1
- Khan MS, Dar O, Sismanidis C, Shah K, Godfrey-Faussett P. Improvement of tuberculosis case detection and reduction of discrepancies between men and women by simple sputum-submission instructions: a pragmatic randomised controlled trial. Lancet [Internet]. 9 de junio de 2007;369(9577):1955-60. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60916-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60916-7)
- Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: Normas y Guía Técnica. Parte I Baciloscopia [Internet]. Washington, D.C; 2008 [citado 16 de enero de 2019]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/166101/9789275330135.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: Normas y Guía Técnica. Parte II Cultivo [Internet]. Washington DC; 2008 [citado 16 de enero de 2019]. Disponible en: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/18616/tblabscultivo_2008.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Nava O, Hassanhi M, Prieto L. Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Kasmera [Internet]. 2005 [citado 16 de enero de 2019];33(2):119-31. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222005000200005
- Vallejo P, Rodríguez J, Searle A, Farga V. Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev Chil enfermedades Respir [Internet]. 2015;31(2):127-31. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482015000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Rice JP, Seifert M, Moser KS, Rodwell TC. Performance of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and rifampin resistance in a low-incidence, high-resource setting. PLoS One [Internet]. 2017;12(10):1-15. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186139>
- Agapito J, Neyra V, Baldeviano C, Espinoza J, Accinelli R. Caracterización de las mutaciones en el gen rpoB asociadas a la resistencia a rifampicina y tipificación mediante RFLP (IS1610) en cepas de *Mycobacterium Tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. Enferm Torax [Internet]. 2003;46(1):9-24. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/enfermedades_torax/v46_n1/caracte_muta.htm
- Lee HY, Seong MW, Park SS, Hwang SS, Lee J, Park YS, et al. Diagnostic accuracy of Xpert® MTB/RIF on bronchoscopy specimens in patients with suspected pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis [Internet]. 2013;17(7):917-21. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.5588/ijtld.12.08.85>
- Zar HJ, Workman L, Isaacs W, Dheda K, Zemanay W, Nicol MP. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in African children in a primary care setting by use of Xpert MTB/RIF on respiratory specimens: A prospective study. Lancet Glob Heal [Internet]. 1 de agosto de 2013 [citado 16 de enero de 2019];1(2):e97-104. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104164>
- Shrestha P, Khanal H, Dahal P, Dongol P. Programmatic Impact of Implementing GeneXpert MTB/RIF Assay for the Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Respiratory

Specimens from Pulmonary Tuberculosis Suspected Patients in Resource Limited Laboratory Settings of Eastern Nepal. Open Microbiol J [Internet]. 2018;12(1):9-17. Disponible en: <http://benthamopen.com/FULLTEXT/TOMICROJ-12-9>

Autores:

Correspondencia: Ortiz-Jiménez, José Marcelo. <https://orcid.org/0000-0003-3063-9211>. Dirección Postal: Avda. Antonio José de Sucre, Km 1.5 Vía a Guano. Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. Teléfonos: +593 99 543 5477. E-mail jortiz@unach.edu.ec – bfmarcelojortiz@gmail.com

Franco-Sotomayor Greta. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Guayaquil, Ecuador. E-mail: gfranco@inspi.gob.ec

Ramos-Ramírez Martha. Carrera de Laboratorio Clínico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. E-mail: bgf.ramosmartha@gmail.com

Contribución de los Autores:

OJJM y **RRM** participaron en escritura, revisión y gestión del documento. **FSG** participo en la escritura, revisión, gestión del documento y la validación del GeneXpert