



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN NORTE DEL DISTRITO FEDERAL.
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA "DR. DANIEL MENDEZ HERNÁNDEZ"

"Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct® (GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo para el diagnóstico de tuberculosis"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA.

P R E S E N T A:

Dr. Alejandro Lara Pelayo.

ASESOR PRINCIPAL: Dr. Enrique Alcalá Martínez.
CO-ASESORA: QBP Faustina Ramírez Cruz.
COLABORADORES: Dr. Gustavo Barriga Angulo.
Dr. Elfego Bautista Cortés.



MÉXICO, D.F.

ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Elfego Bautista Cortés.

Coordinador Clínico de Educación e Investigación en Salud, Hospital de Infectología,
Centro Médico Nacional “La Raza” Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dra. Elena Urdez Hernández

Profesora Titular del Curso de Especialización en Infectología. Hospital de Infectología.
Centro Médico Nacional “La Raza” Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dr. Enrique Alcalá Martínez.

Asesor Principal.

Médico Epidemiólogo adscrito al servicio de Medicina Preventiva y Epidemiología
Hospitalaria, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza” Instituto
Mexicano del Seguro Social.

QBP Faustina Ramírez Cruz.

Co-Asesora.

Química Bacterióloga Parasitóloga. Jefa de sección de Micobacterias, Laboratorio del
Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del
Seguro Social.

Dr. Gustavo Barriga Angulo.

Colaborador.

Jefe de Laboratorio del Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza”,
Instituto Mexicano del Seguro Social.

IMSS REGISTRO NACIONAL DE TESIS DE SUBESPECIALIDAD.

Delegación: Norte Unidad de Adscripción: Hospital de Infectología CMN La Raza.

Autor

Apellido Paterno: Lara Materno: Pelayo Nombre: Alejandro

Matrícula: 99178944 Especialidad: Infectología de Adultos

Fecha de Graduación: 28-02-2015 No. de Registro: R-2014-3502-131

Título de la tesis:

Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct® (GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo para el diagnóstico de tuberculosis.

Resumen:

Introducción: *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno intracelular obligado donde los humanos son los principales huéspedes. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Tuberculosis (Tb) es la segunda causa de muerte de etiología infecciosa después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El advenimiento de técnicas moleculares rápidas, fiables y sensibles para la detección directa de micobacterias tuberculosas en frotis de muestras respiratorias ha venido a revolucionar el laboratorio y la práctica clínica. **Objetivo:** Conocer la correlación de los resultados obtenidos por la prueba directa GTMD en muestras directas de secreción pulmonar comparada con los aislamientos del cultivo para el diagnóstico de Tuberculosis. **Material y métodos:** Se realizó la identificación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias mediante GTMD versión 4.0 Hain Lifescience® en un periodo de 4 meses. Se calcularon medidas de tendencia central y de dispersión para variables continuas, así como frecuencias simples; las variables cualitativas se compararon mediante χ^2 . Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, intervalos de confianza al 95%, se consideró valores de $P < 0.05$ como significativos.

Resultados: Se estudiaron 51 pacientes; 61% de las muestras evaluadas fueron de expectoración y 39% de lavado bronquio alveolar. En el análisis de pruebas diagnósticas se comparó la prueba GTMBD con el estándar de oro (cultivo) encontrándose una sensibilidad de esta nueva prueba de 63.6% y una especificidad de 92.5%. Con Un Valor Predictivo Positivo (VPP) de 70% y un Valor Predictivo Negativo (VPN) de 90.2% ($p < 0.001$). **Conclusiones:** No hubo correlación entre la prueba GTMD comparada con el cultivo, en muestras pulmonares de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar con frotis negativos. Por lo que no se recomienda como método diagnóstico.

Palabras clave: GTMD, Tuberculosis, Diagnóstico.

Tipo de Estudio: Observacional transversal prospectivo descriptivo



"2014, Año de Octavio Paz".

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3502
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA 01/08/2014

DR. ENRIQUE ALCALA MARTINEZ

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct (GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo para el diagnóstico de Tuberculosis.

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2014-3502-131

ATENTAMENTE

DR.(A). GUILLERMO CARRAGA REYNA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3502

IMSS

SOLIDARIDAD Y SEGURIDAD SOCIAL

Instituto Mexicano del Seguro Social.
Delegación Norte México D.F.
Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández”
Centro Médico Nacional La Raza.

Título:

**Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct ®
(GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo
para el diagnóstico de tuberculosis.**

Tesis:

Para obtener el grado de: Especialista en Infectología.

Dr. Alejandro Lara Pelayo.

Médico Internista. Residente de Infectología, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza” Instituto Mexicano del Seguro Social. Matricula 99178944. Tel 55832211 Ext. 23900 Correo electrónico: mdalexlara@gmail.com.

Asesor:

Dr. Enrique Alcalá Martínez.

Médico Epidemiólogo adscrito al servicio de Medicina Preventiva y Epidemiología Hospitalaria, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza” Instituto Mexicano del Seguro Social. Matricula 99092891. Tel 55832211 Ext. 23900 Correo electrónico: roldan79@hotmail.com.

Co-asesora:

QBP Faustina Ramírez Cruz.

Química Bacterióloga Parasitóloga adscrita al departamento de Micobacterias, Laboratorio del Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del Seguro Social. Tel. 55832211 Ext. 23900. Correo electrónico: fausmicro@yahoo.com.mx

Colaboradores:

Dr. Gustavo Barriga Angulo.

Jefe de Laboratorio del Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del Seguro Social. Tel 55832211 Ext. 23900 Correo electrónico: gustavo.barriga@imss.gob.mx.

Dr. Elfego Bautista Cortés.

Coordinador Clínico de Educación e Investigación en Salud, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional “La Raza” Instituto Mexicano del Seguro Social. Tel 55832211 Ext. 23900 Correo electrónico: e.bautistac@imss.gob.mx

Agradecimientos:

A mi madre Eva quien es y será mi motivo de inspiración por toda la eternidad. Te amo mamá.....

A mis hermanos: Ady, Isita, Raúl, Gaby, Adán, Laura, Ulises y Paty; por su inagotable comprensión y su amor infinito.

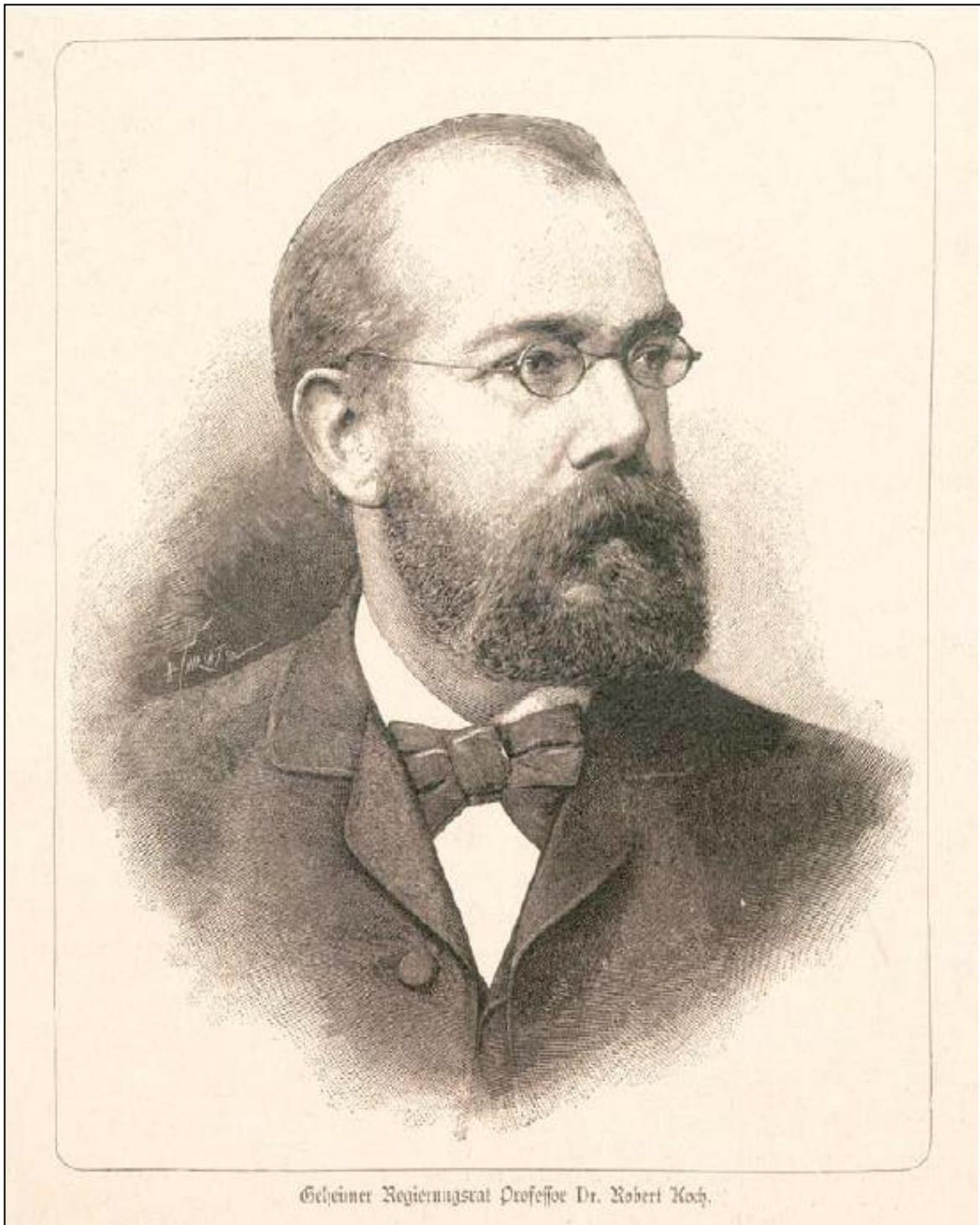
A mis maestros: Elena Urdez Hernández, Muslim Schabib Hany, Ma. Concepción Hernández García, Rafael Luna Montalbán y por supuesto a la QFB Eva Aurora Hernández Sánchez “Evita”. Todos ellos por compartir la misma pasión por este increíble y extraordinario mundo de la microbiología; pero sobre todo mi agradecimiento inmenso por ser una fuente de inspiración constante para mí.

A la QBP Faustina Ramírez Cruz “Faus” por su ayuda incondicional en la elaboración de este trabajo y por ser una gran amiga.

A mi asesor principal el Dr. Enrique Alcalá Martínez; sin su apoyo no hubiese sido posible culminar este proyecto.

A uno de mis grandes amigos el Dr. Juan Daniel Jaimes Álvarez por formar parte de la etapa más extraordinaria de mi vida.

Por supuesto a mis amigas Myriam Méndez Nuñez y Gabriela Ramírez Izquierdo, grandes y extraordinarias mujeres.....



Retrato de Robert Koch (1884)

El presente trabajo es un homenaje a uno de los más grandes bacteriólogos de todos los tiempos; a 110 años de haber recibido el Premio Nobel por el descubrimiento del bacilo tuberculoso; recibió y recibirá por parte de la humanidad eterno agradecimiento.....

Gracias **Robert Koch**

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2-11
Planteamiento del problema.....	12
Pregunta de investigación.....	13
Justificación.....	14
Objetivo.....	15
Hipótesis.....	16
Material y Métodos.....	17-21
Resultados.....	22-23
Discusión.....	24-25
Tablas de resultados.....	26
Anexos.....	27-32
Hoja de recolección de datos.....	33
Flujo grama de trabajo.....	34
Cronograma de actividades.....	35
Referencias bibliográficas.....	36-41

Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct® (GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo para el diagnóstico de tuberculosis.

Resumen:

Introducción: *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno intracelular obligado donde los humanos son los principales huéspedes. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Tuberculosis (Tb) es la segunda causa de muerte de etiología infecciosa después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El advenimiento de técnicas moleculares rápidas, fiables y sensibles para la detección directa de micobacterias tuberculosas en frotis de muestras respiratorias ha venido a revolucionar el laboratorio y la práctica clínica.

Objetivo: Conocer la correlación de los resultados obtenidos por la prueba directa GTMD en muestras directas de secreción pulmonar comparada con los aislamientos del cultivo para el diagnóstico de Tuberculosis.

Material y métodos: Se realizó la identificación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias mediante GTMD versión 4.0 Hain Lifescience® en un periodo de 4 meses. Se calcularon medidas de tendencia central y de dispersión para variables continuas, así como frecuencias simples; las variables cualitativas se compararon mediante χ^2 . Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, intervalos de confianza al 95%, se consideró valores de $P < 0.05$ como significativos.

Resultados: Se estudiaron 51 pacientes; 61% de las muestras evaluadas fueron de expectoración y 39% de lavado bronquio alveolar. En el análisis de pruebas diagnósticas se comparó la prueba GTMBD con el estándar de oro (cultivo) encontrándose una sensibilidad de esta nueva prueba de 63.6% y una especificidad de 92.5%. Con Un Valor Predictivo Positivo (VPP) de 70% y un Valor Predictivo Negativo (VPN) de 90.2% ($p < 0.001$).

Conclusiones: No hubo correlación entre la prueba GTMD comparada con el cultivo, en muestras pulmonares de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar con frotis negativos. Por lo que no se recomienda como método diagnóstico.

Palabras clave: GTMD, Tuberculosis, Diagnóstico.

1. Introducción.

Definición y epidemiología.

Para propósitos de definición la infección por tuberculosis (Tb) pulmonar, ocurre cuando una persona susceptible inhala partículas de gotitas que contienen *Mycobacterium tuberculosis* entre 1-5µm, las cuales viajan a través del tracto respiratorio hasta el alveolo.^(1,2)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Tb es la segunda causa de muerte de etiología infecciosa después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En el 2011 se reportó una incidencia estimada de casi nueve millones de casos,⁽³⁻¹¹⁾ de los cuales 2.9 millones correspondieron a mujeres y 1-1.2 millones a personas con infección por VIH; ^(3,6,10) en ese mismo año se reportó 1.4 millones de muertes por Tb (990,000 en pacientes sin infección por VIH y 430,000 muertes asociadas a este virus).^(4-7,9,10)

Los cinco países con mayor incidencia de Tb fueron la India (2-2.5 millones), China (0.9-1.1 millones), Sudáfrica (0.4-0.6 millones), Indonesia (0.4-0.5 millones) y Pakistán (0.3-0.5 millones).^(3,6) La OMS consideran que debido a la ubicuidad de *Mycobacterium tuberculosis* se estima que aproximadamente 2 billones de personas (un tercio de la población mundial) están infectadas pero asintomáticos, forma clínica conocida como Tb latente.⁽¹²⁻¹⁷⁾

En México para el año 2012 de acuerdo a la plataforma única de información SUIVE/DGE/SS de la Secretaría de Salud se registraron 19,735 casos de Tb en todas sus formas, de los cuales el 80.7% (15,918 casos) fueron pulmonares, de estas formas pulmonares el 18.5% se asociaron a diabetes y 5.6% a síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Hubo un registro de 2,218 defunciones por Tb pulmonar. Los estados de la República con mayor incidencia reportada fueron: Baja California seguido por Guerrero, Tamaulipas, Sonora y Sinaloa con una tasa mayor a 24 casos por cada 100,000 habitantes. Las tasas de mortalidad por Tb pulmonar más altas se registraron en Baja California y Sonora arriba de 4.12 muertes por cada 100,000 habitantes.⁽¹⁸⁾

Factores de riesgo.

La infección por VIH y la insuficiencia renal crónica (IRC) son de los principales factores de riesgo para Tb, la primera incrementa el riesgo 20 veces más que en personas no infectadas; y la segunda más de 10 veces. Otros factores son el consumo de alcohol y

tabaquismo; enfermedades crónicas como silicosis, diabetes mellitus que confiere un riesgo 3 veces mayor de padecer la enfermedad, el uso de cortico esteroides con un riesgo incrementado de 2 veces; así como los antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF) que son un riesgo en ascenso en países industrializados.^(2,3,12,13) Finalmente algunos otros factores que condicionan riesgo de adquirir Tb menos importantes reportados en la literatura son: tumores de órganos sólidos y hematopoyéticos, condiciones de vida en hacinamiento, contaminación del aire, edad y susceptibilidad genética (hay una creciente lista de genes asociados con riesgo de tuberculosis, incluyendo genes para una resistencia natural asociados a proteína 1 de macrófago, interferón γ , óxido nítrico sintasa 2A, lectina de unión a manano, receptor de vitamina D y algunos receptores tipo Toll.⁽³⁾

La probabilidad de desarrollar Tb clínica activa después de la inhalación de un aerosol que contenga el bacilo de un paciente infectado con Tb activa es muy baja, se estima un riesgo del 10% en el transcurso de la vida; siendo más frecuente durante los primeros dos años después de la infección hasta en un 5%. La mayor parte de los individuos inmunocompetentes eliminan el bacilo o contienen la enfermedad en fase latente.^(1-4,12,13,17)

Fisiopatología.

La Tb en muchos casos sigue un patrón general descrito por Wallegren; quien divide la progresión y resolución de la enfermedad en cuatro etapas. En la primera etapa que va de la semana 3 a la 8 después de que son inhalados los aerosoles que contienen el bacilo y estos se implantan en el alveolo, las bacterias se diseminan por circulación linfática a los nódulos linfáticos regionales en el pulmón, formando el llamado complejo primario o complejo de Ghon. En este momento ocurre la conversión y reactividad a la tuberculina.⁽¹⁹⁾

La segunda etapa que dura alrededor de 3 meses se caracteriza por la circulación hematógena de la bacteria a muchos órganos incluyendo otras partes del pulmón; en esta etapa en algunos individuos la enfermedad aguda puede ser fatal y manifestarse como meningitis tuberculosa o tuberculosis miliar (diseminada). La pleuresía ocurre en la tercera etapa que va de 3 a 7 meses y causa dolor torácico severo; esta etapa puede retrasarse hasta por 2 años. Finalmente la última etapa o resolución del complejo primario donde la enfermedad no progresa puede ocurrir después de 3 años.⁽¹⁹⁾

Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas de Tb pulmonar generalmente incluyen fiebre de bajo grado,^(2,3) tos crónica con producción de esputo, pérdida del apetito, pérdida de peso, diaforesis y hemoptisis.^(1-5,7,20) Se ha descrito que dos terceras partes de las personas con Tb pulmonar primaria pueden encontrarse asintomáticas.^(2,3) Por otro lado en los pacientes infectados con VIH la presencia de tos, fiebre y diaforesis durante 3 semanas tiene una sensibilidad del 93% y especificidad del 36%.⁽²¹⁾

Un alto índice de sospecha para Tb es fundamental en pacientes infectados con VIH, donde el riesgo es elevado y el diagnóstico difícil.^(1,3,7) Aunque los pacientes con niveles adecuados de células CD4 presentan características típicas de Tb, la inmunodeficiencia progresiva substancialmente afecta el espectro de la enfermedad con mayor riesgo de formas clínicas extra pulmonares y diseminadas;^(1,3,20) presentando manifestaciones atípicas sobre todo con CD4 menores a 200 cel/mm³, pudiendo encontrar infiltrados sutiles, derrame pleural, o linfadenopatía hiliar. Pero con CD4 menores a 75/mm³ los hallazgos pulmonares pueden ser ausentes con tuberculosis diseminada, manifestada como una enfermedad febril no especifica con amplio involucro a órganos y micobacteriemia.⁽⁷⁾

La Tb subclínica asintomática con frotis de esputo negativos y radiografía de tórax sin hallazgos, pero con cultivos positivos es común en Tb asociada a infección por VIH y puede corresponder al 10% de los casos en regiones endémicas. Por lo tanto el tamizaje para Tb es recomendado en todos los pacientes infectados por VIH.⁽⁷⁾

Alrededor del 90% de los casos de Tb pueden ser atribuibles a reactivación.^(2,3) El examen físico es inespecífico y puede incluir estertores o signos de derrame pleural.^(1,2) El hallazgo radiográfico más común es adenopatías hiliares;^(2,4) no obstante se pueden evidenciar infiltrados en el segmento apical posterior del lóbulo superior y más del 20% de esos infiltrados son asociados con cavernas.⁽²⁾

Generalidades de *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis fue el primero identificado por el científico alemán Robert Koch, quién anunció su descubrimiento el 24 de marzo de 1882.⁽³⁻⁵⁾ El complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que puede causar enfermedad humana está

comprendido por: *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium canetti*.^(1,3,19,22)

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular obligado que puede infectar varias especies de animales aunque los humanos son los principales huéspedes. Es un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR), aerobio no móvil, no encapsulado y no formador de esporas. Su crecimiento es más exitoso en tejidos con alto contenido de oxígeno, tal como los pulmones; se divide cada 15-20 horas pues es extremadamente lento comparado con otras bacterias; esta tasa de multiplicación lenta y la capacidad de persistir en estado latente hace que el tratamiento sea más prolongado en personas infectadas.⁽³⁾

Una característica importante de *Mycobacterium tuberculosis* es la peculiar estructura de su pared que provee de una excepcional y fuerte barrera impermeable a componentes tóxicos y drogas constituyendo un importante factor de virulencia. La micobacteria posee una membrana externa funcionalmente similar a lo observado con las bacterias Gram negativas; constituida por una bicapa de lípidos formada por ácidos grasos de cadena larga en su interior (ácidos micólicos), de glicolípidos y componentes de cera en su capa externa. La membrana externa e interna forman un espacio periplásmico con la presencia de una capa de peptidoglucano en el lado más interno unido covalentemente al arabinogalactano y lipoarabinomano.⁽²³⁾

El 60% del total de los componentes son lípidos.^(24,25) Un componente de patogenicidad importante es el factor cuerda (trehalosa 6'6 dimicolato) que causa la agrupación de estos bacilos en filas paralelas y está estrechamente relacionada con las cepas virulentas; además que se ha encontrado que es responsable por la inhibición de la migración de polimorfonucleares al sitio de colonización e induce formación de granulomas.⁽²⁴⁾

En términos de heterogeneidad genética, el MTBC y las micobacterias no tuberculosas (MNT) son ampliamente diferentes y esto tiene fuertes implicaciones para la elección de métodos de tipificación y en los niveles alcanzables de discriminación. MTBC constituye un grupo genético notablemente homogéneo. Esto es mejor ilustrado por el hecho de que dentro del operon del DNA ribosomal (rDNA) no solo los genes codifican varios tipos de

rRNA, sino también regiones entre esos genes tal como regiones del espaciador transcrito interno, el cual en muchas bacterias y hongos son altamente polimórficos y por lo tanto son útiles para la identificación y tipificación de las especies o a nivel de cepa, mostrando completa conservación entre los miembros del MTBC.⁽²⁶⁾

Diagnóstico tradicional de tuberculosis.

En muchos países la visualización al microscopio de muestras de esputo sigue siendo el principal método diagnóstico de Tb.^(11,21) El examen microscópico (frotis positivo) tiene una sensibilidad variable que va del 32% al 97% dependiendo de la técnica usada y no distingue entre MTBC de las MNT.^(4,11) Su baja sensibilidad para el diagnóstico esta en relación a que en las muestras de esputo se requiere una elevada carga bacteriana; alrededor de 10.000 micobacterias/ml para que incremente su rendimiento, esto en pacientes sin infección por VIH;⁽²⁷⁾ por otro lado la sensibilidad para el diagnóstico mediante microscopia es mucho menor en pacientes infectados por VIH,⁽¹¹⁾ debido a que en las muestras de esputo existe todavía una menor carga bacteriana que en los pacientes inmunocompetentes, reportándose un rendimiento diagnóstico de la baciloscofia de aproximadamente el 30%.⁽²¹⁾

La tasa de detección estimada en todo el mundo de casos de Tb con baciloscopias positivas fue de 62% en el 2008, sin embargo la falta de precisión y rapidez para el diagnóstico mediante esta técnica resulta un gran obstáculo. En la última década se han hecho esfuerzos para mejorar el diagnóstico de Tb con desarrollo de nuevas tecnologías algunas de las cuales han sido aprobadas por la OMS. El procesar el esputo con hidróxido de sodio más centrifugación incrementa la sensibilidad hasta un 13% a la microscopia.^(3,27)

A diferencia de la tinción de Ziehl Neelsen (ZN); el uso de tinciones fluorescentes como la auramina O (AuO), permiten leer los frotis en la microscopia a bajo poder (200x) y en un periodo de tiempo más corto hasta en 20-30 segundos. Esta tinción fluorescente es resultado de la unión del colorante por los ácidos nucleicos de la micobacteria. La micobacteria muestra un patrón de tinción intracelular que muy probablemente refleja la distribución homogénea del ácido desoxirribonucleico/ácido ribonucleico (ADN/ARN); este patrón de tinción es tan típico a mayor aumento (400x o 1000x) que obvia la necesidad de reteñir el frotis con ZN para clarificar las imágenes dudosas. Por lo anterior el procedimiento de tinción con AuO es más rápido y fácil que la tinción ZN pues no requiere

calentamiento del frotis; sin embargo la mayor limitación para su uso es la necesidad de microscopios fluorescentes.⁽²⁸⁾ La microscopia de fluorescencia incrementa la sensibilidad comparado con microscopía convencional,^(29,30) hasta en un 10% con especificidad equiparable a la tinción ZN.⁽³¹⁾

El cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* es el estándar de oro actualmente,^(3,7,11-13) con sensibilidad mayor al 80-85%.⁽²¹⁾ Los sistemas de cultivos líquidos automatizados son substancialmente más rápidos y con un rendimiento 10% mayor que el medio sólido.⁽³⁾ Pero ambos tienen la desventaja que el reporte del resultado es en 4-6 semanas dificultando la toma de decisiones terapéuticas.^(11,21,27) El cultivo es capaz de detectar escasos microorganismos alrededor de 10^1 - 10^2 microorganismos/ml de una muestra, superando la sensibilidad del frotis.⁽³²⁾

Las especies de micobacterias aisladas a partir de cultivos habían sido tradicionalmente identificadas mediante una serie de pruebas bioquímicas y fenotípicas; sin embargo dada la variación de estas pruebas en un asilado de la misma especie y debido a que en muchos casos no se obtenía la identificación definitiva; aunado a que eran lentas, laboriosas y con un rendimiento ambiguo; los laboratorios están utilizando cada vez más métodos moleculares para la identificación de especies.⁽³³⁾

Diagnóstico molecular de tuberculosis.

Dentro de las técnicas moleculares para el diagnóstico de Tb se describen la hibridación por sondas que consiste en una serie de pasos que incluyen extracción del ADN de los aislados de micobacterias o directamente de las muestras clínicas, amplificación del mismo por reacción en cadena de polimerasa (PCR) e hibridación de los productos de PCR marcados con sondas de oligonucleótidos y el desarrollo colorimétrico que permite que las líneas sean vistas donde se encuentran localizadas las sondas.^(11,29,30)

Las primeras sondas comerciales no radiactivas disponibles fueron las de AccuProbe (Gen-Probe Incorporated, San Diego, Estados Unidos). El uso de estas sondas de ADN complementarias al ARN ribosómico (rARN) micobacteriano, marcadas con quimioluminiscencia⁽³³⁻³⁵⁾ permiten identificar la región 16S (16S rARN)⁽³⁶⁾ del MTBC, el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae* a partir de cultivo sólido y líquido sin necesidad de amplificación genómica. Esta

técnica presenta una buena sensibilidad y especificidad, pero el número de especies que identifica es limitado.⁽³³⁻³⁵⁾

Alternativamente también se han diseñado sondas fluorescentes de ácidos nucleicos peptídicos, (Dako Probe MTB Culture Confirmation Test. Dako, Dinamarca) que permite diferenciar el MTBC del resto de las micobacterias⁽³⁵⁾ a partir del cultivo positivo; sin embargo el tiempo en la realización de este método es de aproximadamente 2 horas.⁽³³⁾

Nuevas técnicas de biología molecular basadas en la PCR y procedimientos de hibridación inversa se han comercializado desde hace varios años para la identificación de micobacterias a partir de cultivos. La técnica de hibridación es realizada sobre tiras de nitrocelulosa en las cuales las sondas son fijadas paralelamente. Dos sistemas con este diseño son comercialmente disponibles en Europa, la prueba para micobacterias INNO-LiPA diseñado para amplifica la región espaciadora del rARN 16S-23S y la evaluación para micobacterias GenoType cuyo blanco de amplificación es la región 23S del rARN.⁽³⁷⁻³⁹⁾ Estos métodos han reportado una sensibilidad del 100% y especificidad del 94.4-100% para la identificación de las micobacterias más comunes.^(37,38)

La primera versión del sistema INNO-LiPA permitía la identificación simultánea de ocho diferentes especies de micobacterias: MTBC, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* y el complejo *Mycobacterium chelonae*. La versión de la prueba ha sido ampliamente evaluada con éxito para identificación de micobacterias aisladas de cultivos sólidos y líquidos.⁽³⁹⁾

Esta prueba ha evolucionado hacia una segunda versión llamada INNO-LiPA v2 la cual incrementa la capacidad de identificación a 16 especies de micobacterias diferentes. La evaluación de micobacterias por GenoType permite la identificación simultanea de 13 diferentes especies: MTBC, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium peregrinum* y *Mycobacterium phlei*. La realización de estas pruebas han sido evaluadas en varios estudios.^(37,39)

Con el fin de ampliar el rango de detección de especies de micobacterias, una nueva versión de la evaluación GenoType (también dirigida a la región génica 23S del rARN) ha sido desarrollada.^(35,37) La prueba para micobacterias combinada GenoType CM/AS (CM: micobacterias comunes y AS: especies adicionales) ha sido desarrollada y se ejecutan de forma consecutiva.⁽³⁷⁾ La evaluación CM permite la identificación simultánea de 14 especies de micobacterias⁽³⁵⁾ incluyendo las más relevantes como MTBC, miembros del complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium chelonae*.⁽³⁷⁾ Adicionalmente la segunda prueba AS permite la identificación de 16 especies de micobacterias adicionales⁽³⁵⁾ tal como *Mycobacterium simae*, *Mycobacterium mucogenicum* y *Mycobacterium celatum*.⁽³⁷⁾ El último formato es GenoType MTBC para identificar especies dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.⁽³⁵⁾

Otras pruebas moleculares de identificación de micobacterias a partir de cultivos sólidos y líquidos son la amplificación de restricción de polimorfismo (PRA), que amplifica mediante PCR el gen *hsp65*, seguida de una digestión del producto mediante dos enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*). La realización de PCR en tiempo real y finalmente la secuenciación donde las empleadas para la identificación son 16S rADN y *hsp65*.^(34,35)

El uso de métodos de identificación molecular en muestras primarias para diferenciar MBTC de las MNT, permitirá una mejor comprensión de la epidemiología de este complejo grupo de organismos y su relevancia en enfermedad humana. Históricamente el diagnóstico de laboratorio para MBTC está basado en el largo proceso del cultivo de muestras clínicas usando medios sólidos o líquidos. El advenimiento de técnicas moleculares rápidas, fiables y sensibles para la detección directa de MBTC en frotis positivos de muestras respiratorias ha venido a revolucionar el laboratorio y la práctica clínica.⁽⁴⁰⁾

En los últimos años, se han desarrollado y evaluado un gran número de técnicas para detectar micobacterias, fundamentalmente para el MTBC directamente de muestras clínicas. La sensibilidad de estas técnicas es dependiente en gran medida de la utilización de métodos optimizados y correctamente estandarizados para extraer el material genético.⁽³⁵⁾ Se han descrito diferentes protocolos o técnicas no comerciales basadas en la amplificación de diferentes secuencias diana (IS6110, *hsp65*, MBP64, o *rpoB*) mediante

PCR.^(35,41) En un meta análisis en el que se comparaban las técnicas no comerciales de amplificación, se señalaba que la amplificación de IS6110 mediante *nested*-PCR era la que presentaba un rendimiento mejor.⁽³⁵⁾

Dos técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) han sido aprobadas por la agencia para la administración de alimentos y drogas (FDA) de los Estados Unidos: La prueba Gen-Probe amplificado MTD (*Mycobacterium tuberculosis* directo) (Gen-Probe, San Diego, California) y la prueba Roche Amplicor MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ). Ambas pruebas están aprobadas para su uso en muestras respiratorias con baciloscopía positiva;^(32,35) y ambas amplifican la región 16S rARN.⁽⁴¹⁾ La prueba Gen-Probe es además aprobada en muestras pulmonares con frotis negativos. Otros kits comerciales actualmente disponibles incluyen el BD-ProbeTec direct (Becton Dickinson, Sparks, MD) y el COBAS Amplicor (Roche Diagnostic System, Mannheim, Germany).^(32,35)

La sensibilidad del GenoType Direct oscila entre el 60-95% con una especificidad del 95-100% en muestras respiratorias. La prueba Amplicor MTB tiene una sensibilidad del 75-100% y especificidad del 90-100%. Las prueba BD-ProbeTec con sensibilidad del 55-100% y especificidad del 45-100%.⁽³⁵⁾

La NAAT es costosa, requiere instrumentos caros, personal experto y alto volumen de muestras para que sea costo-efectiva. Actualmente Los Centros de Control y Prevención de enfermedades (CDC and prevention) recomienda que la NAAT sea realizada sobre la primera muestra de esputo de todos los casos sospechosos de Tb independientemente del resultado del frotis. Sin embargo la implementación rutinaria de NAAT sobre todas las primeras muestras clínicas sometidas para cultivos de micobacterias sin una consideración del historial clínico parece poco práctico y costoso.⁽³²⁾

Recientemente varias sondas genéticas y sistemas de amplificación para el diagnóstico de Tb han sido desarrollados y varios de estos están disponibles como kits comerciales para la detección directa e identificación del MTBC así como de las MNT a partir de muestras clínicas. Nuevas técnicas tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento, sondas de ADN quimio luminiscente, amplificación de ácidos nucleicos y secuenciación de los genes de la región 16S del rARN son más sofisticados, muy caros y

requieren equipo costoso. La prueba GenoType® CM/AS (Hain Lifescience Nehren Germany) es un nuevo kit comercial desarrollado para diferenciar e identificar diferentes especies de MNT y las del MBTC. Que implica la amplificación del ADN, dirigida contra la región genética 23S del rARN, seguido por hibridación inversa con sondas de oligonucleótidos específicas inmovilizadas sobre una tira de membrana. Hay dos kits el CM el cual identifica 15 especies de micobacterias incluyendo el MTBC, mientras que el kit AS diferencia 16 especies de MNT adicionales menos comunes.⁽⁴²⁾

En el estudio de Seagar et al se evaluó la prueba GenoType Mycobacteria Direct ® (GTMD) para la detección simultánea de MTBC y cuatro micobacterias atípicas en 54 muestras respiratorias con frotis positivos y los hallazgos fueron comparados con los resultados del cultivo; en 43 muestras la amplificación del ARN fue exitosa con el GTMD, con resultados concordantes con identificación por cultivo. Todos los casos de micobacterias tuberculosas fueron detectados. Un resultado positivo con GTMD identifica rápidamente a los pacientes con infección por MTBC o proporciona la identificación específica de otras cuatro micobacterias atípicas. Esto permite montar pruebas de susceptibilidad a las drogas más rápido, e implementar el tratamiento dirigido de forma temprana.⁽⁴⁰⁾

En otro estudio realizado por Kiraz et al se evaluó también la prueba GTMD para detección directa del MTBC a partir de muestras de esputo y comparó con los métodos convencionales; fueron procesadas 115 muestras para detectar BAAR. Los resultados mostraron que 86 de las muestras fueron positivas por microscopía directa, 84 fueron positivas por cultivo BACTEC 12B y 73 por cultivo Löwenstein-Jensen (LJ) y 95 por la prueba GTMD esta última con sensibilidad y especificidad para MTBC de 97% y 58% respectivamente. Cuando los resultados de los cultivos y los hallazgos clínicos de los pacientes fueron evaluados conjuntamente, la sensibilidad y especificidad de la GTMD fue del 97% y 90% respectivamente. Lo anterior sugiere que la GTMD es útil para el diagnóstico temprano de los casos clínicos y radiológicos sospechosos de Tb en los frotis negativos a Mycobacterium.⁽⁴³⁾

2. Planteamiento del problema.

La tuberculosis pulmonar ha prevalecido por cientos de años a pesar de los avances y esfuerzos centrados en el diagnóstico temprano de los casos para limitar el contagio, sobre todo entre grupos de alto riesgo sigue siendo un problema de salud a nivel mundial que aún no se ha podido controlar.

A partir de la pandemia de la infección por VIH, el número de casos nuevos de tuberculosis se ha incrementado; esto repercute en los sistemas de salud en todos los ámbitos. México sigue siendo un país con una incidencia alta de la enfermedad y al igual que muchos otros países en las últimas dos décadas han emergido cepas MDR, XDR y lo que es peor a fechas recientes ya cepas con resistencia a todos los fármacos antituberculosos.

El Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza” recibe una población significativa de pacientes infectados con VIH con riesgo muy elevado de adquirir y desarrollar infección por Tb; el riesgo de desarrollar formas diseminadas también es alto y consecuentemente la mortalidad se incrementa, por lo tanto el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado impactará tanto en la diseminación de la enfermedad como en la morbi mortalidad.

La tendencia actual es establecer el diagnóstico lo antes posible, tratar los pacientes oportunamente y evitar el contagio de la enfermedad. Hasta el momento el estándar de oro para el diagnóstico es el cultivo. Existen nuevas técnicas para la identificación inmediata de las micobacterias a partir de baciloscopias positivas y negativas con sensibilidad y especificidad equiparables al cultivo y que aún no han sido probadas en nuestro país ni en poblaciones especiales como pacientes infectados con VIH, por tal motivo se desarrolló este trabajo de investigación para demostrar la correlación de la prueba GTMD en muestras directas de secreción pulmonar comparada con el cultivo.

3. Pregunta de investigación.

¿Existe correlación en el resultado de la prueba GenoType Mycobacteria Direct® (GTMD) en muestras directas de secreción pulmonar comparada con el aislamiento por cultivo en pacientes con sospecha de tuberculosis?

4. Justificación.

La detección de micobacterias del complejo tuberculoso en pacientes con sospecha de Tb pulmonar entre los enfermos atendidos en este hospital, es una necesidad al menos por las siguientes dos ventajas clínicas potenciales:

- Tratamiento oportuno y dirigido.
- Optimizar las medidas preventivas para limitar el contagio.

Por lo tanto la realización del presente trabajo permitirá evaluar la utilidad de una prueba molecular rápida en la población atendida.

5. Objetivo:

Conocer la correlación de los resultados obtenidos por GTMD en muestras directas de secreción pulmonar comparada con los aislamientos del cultivo para el diagnóstico de Tuberculosis.

6. Hipótesis de trabajo:

Los resultados obtenidos con la prueba GTMD en muestras directas de secreción pulmonar se correlacionan con los aislamientos de cultivo en pacientes con sospecha de tuberculosis.

7. Material y Métodos.

Tipo de estudio. Estudio observacional transversal prospectivo descriptivo.

Universo de trabajo: Pacientes con sospecha de Tuberculosis pulmonar.

Criterios de inclusión:

1. Edad de 18 años o más.
2. Ambos géneros.
3. Casos probables de tuberculosis pulmonar definido por: presencia de tos con expectoración o hemoptisis, de dos o más semanas de evolución en las cuales deben agotarse los recursos de diagnóstico previo al inicio de tratamiento según la NOM-006-SSA2-2013 ⁽⁴⁴⁾
4. Muestras de origen pulmonar descontaminadas: expectoración, lavado bronqueo-alveolar, aspirado bronquial, procesadas en laboratorio de Infectología en el periodo de tiempo septiembre-diciembre 2014.

Criterios de no inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico previo de tuberculosis pulmonar.
2. Pacientes que hayan recibido tratamiento antituberculoso en los 12 meses previos.

Criterios de eliminación:

1. No los hay.

Ámbito: Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”. Es un hospital de 3er nivel de atención que incluye los servicios de Infectología y laboratorio de microbiología.

Tipo de muestreo: Consecutivo por conveniencia.

Variables clínico-epidemiológicas: Edad, género, lugar de origen, lugar de residencia, comorbilidades, tabaquismo, combe, tipo de muestra.

Variables microbiológicas:

Mycobacterium tuberculosis.

- **Definición conceptual:** Bacilo aerobio ácido alcohol resistente, capaz de desarrollar su crecimiento en medios de cultivo selectivos sólidos (Löwenstein-Jensen) y líquidos (Middlebrook 7H10 y 7H11).⁽⁴⁵⁾
- **Definición operacional:** La identificación de *Mycobacterium tuberculosis* puede llevarse a cabo mediante pruebas bioquímicas: prueba de niacina positiva, inhibición de catalasa a 68° negativa y reducción de nitrato positiva. O bien mediante pruebas moleculares a través de la amplificación de una región específica del cromosoma del bacilo que puede ser luego identificado por sondas.⁽⁴⁶⁾
- **Tipo de variable:** Cualitativa nominal.
- **Escala de medición:** Si o No.

Cultivo para *Mycobacterium tuberculosis.*

- **Definición conceptual:** Técnica de laboratorio que permite el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en medio sólido o líquido. Según la NOM-006-SSA2-2013⁽⁴⁴⁾
- **Definición operacional:** Mediante el cultivo es posible hacer que los bacilos presentes en las muestras de los pacientes se multipliquen *in vitro*, hasta que se muestre formando colonias en un medio sólido, turbidez en un caldo o hasta que algún sensor incorporado en el medio cambie de color o emita fluorescencia cuando el bacilo consume O₂ o libera CO₂. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS).⁽⁴⁶⁾
- **Tipo de variable:** Cualitativa nominal.
- **Escala de medición o indicador:** Positivo o Negativo.

Prueba GTMD.

- **Definición conceptual:** Es una prueba que permite la identificación genética, directamente desde especímenes clínicos pulmonares y extra pulmonares (excepto sangre) descontaminados, de las siguientes cinco especies de micobacterias: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*,

Mycobacterium kansasii, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium tuberculosis* complex.

- **Definición operacional:** Mediante el aislamiento de ARN en especímenes descontaminados, con captura a través de partículas magnéticas, posteriormente amplificación a través de la técnica de amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) e hibridación inversa.
- **Tipo de variable:** Cualitativa nominal.
- **Escala de medición:** Positivo o Negativo.

Método: Se incluyeron secreciones pulmonares; la recolección y el transporte de muestras se llevó a cabo por personal de laboratorio del área de microbiología de acuerdo a los lineamientos de la OPS.⁽⁴⁷⁾

Procesamiento y descontaminación. Todas las muestras fueron descontaminadas con método de Petroff modificado, con la técnica estándar de acuerdo a los lineamientos de la OPS.⁽⁴⁶⁾ Se evaluó el proceso de descontaminación mediante una prueba de esterilización. (Anexo 1)

Examen microscópico. Previa descontaminación de la muestra a través del método de Petroff modificado; con un aplicador estéril o asa bacteriológica se colocó una alícuota directamente sobre un portaobjetos, para ser teñidas con técnica de ZN utilizando el procedimiento estándar, la visualización al microscopio se realizó con objetivo de inmersión (100x), el número de BAAR presentes se registran como + (10-99 BAAR en 100 campos observados) ++ (1-10 BAAR en 50 campos observados) y +++ (más de 10 BAAR en 20 campos observados), de acuerdo a los lineamientos de la OPS.⁽⁴⁷⁾ (Anexo 2)

Cultivo. Una alícuota se sembró en medio sólido (Löwenstein-Jensen) y en medio líquido Middlebrook 7H9 (BACTEC™ MGIT™). De acuerdo a los lineamientos de la OPS.⁽⁴⁶⁾ (Anexo 3)

Identificación a partir del cultivo. Los aislamientos de los cultivos se identificaron mediante GentoType Mycobacterium CM Hain Lifescience® que permitió la identificación de 15 diferentes especies de micobacterias (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium interjectum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium peregrinum*,

Mycobacterium marinum/ Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium xenopi and MBTC). GentoType Mycobacterium MTBC Hain Lifescience® que permitió identificar las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Si la identificación no fue posible con esta prueba se utilizó GentoType Mycobacterium AS Hain Lifescience® para la identificación de especies de micobacterias adicionales: *Mycobacterium simiae, Mycobacterium mucogenicum, Mycobacterium goodii, Mycobacterium celatum, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium genavense, Mycobacterium lentiflavum, Mycobacterium heckeshornense, Mycobacterium szulgai/Mycobacterium intermedium, Mycobacterium phlei, Mycobacterium haemophilum, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium gastris, Mycobacterium asiaticum and Mycobacterium shimoidei*. Ambas pruebas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos líquidos y sólidos fueron considerados negativos si no hubo desarrollo después de 6-8 semanas de incubación respectivamente. (Anexo 4)

Identificación a partir de la prueba GTMD. La prueba se realizó de acuerdo las instrucciones del fabricante y como fue descrita previamente en las publicaciones de Seagar y cols.⁽⁴⁰⁾ y Kiraz y cols.⁽⁴³⁾ A partir de las muestras descontaminadas; el procedimiento completo fue dividido en cuatro etapas: (1) Después de la lisis a base de calor y sonicación de las células, se usaron partículas magnéticas para capturar la región 23S del rARN en una reacción de acoplamiento. (2) Después de dos etapas de lavado una reacción de amplificación isotérmica del ARN mediante técnica NASBA a 41°C durante una hora para amplificar secuencias de la plantilla a ssARN. (3) Los productos amplificados y desnaturalizados fueron subsecuentemente identificados por hibridación inversa con sondas de genes inmovilizados. (4) La detección colorimétrica de los amplicones hibridados se llevó a cabo utilizando fosfatasa alcalina/estreptavidina conjugada y el substrato apropiado. El control interno de ARN se incluyó con cada muestra evaluada, los controles positivos y negativos se incluyeron en cada prueba. El control positivo contuvo ARN de *Mycobacterium avium*, para evaluar el rendimiento de la prueba y el control negativo indicó si hubo contaminación de muestra a muestra. El material utilizado se encontró libre de ARNasas. La contaminación con ARN se limitó limpiando bancos y equipos con solución descontaminante RNaseZap® (Life Technologies®) antes de su uso. Para preservar el ARN se utilizó Ambion® RNA Storage Solution (Life Technologies®) que es una solución buffer que provee mayor estabilidad del ARN que el buffer estándar con EDTA de 0.1mM. Está compuesta por citrato de sodio de

1mM, pH de 6.4 +/- 0.2 es proporcionado en una botella que contiene 50ml. Posterior a la re suspensión del sedimento que contiene el ARN en la solución antes citada; este se crio preservó a -80°C en un ultra congelador hasta su uso con la técnica NASBA. Para interpretar los resultados de las pruebas se utilizaron hojas de plantillas que muestran las posiciones de las líneas en cada tira (suministradas con el kit). El tiempo de evaluación aproximado fue de 5 horas y los resultados finales fueron vaciados en una hoja de trabajo diario. El procesamiento de la muestra hasta la etapa de lisis celular se llevó a cabo en el área de biología molecular donde se cuenta con cabina de bioseguridad clase II. (Anexo 5)

Análisis estadístico.

Análisis univariado: Se calcularon medidas de tendencia central y de dispersión para variables continuas, así como frecuencias simples.

Análisis bivariado: Las variables cualitativas se compararon mediante χ^2 . Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, intervalos de confianza al 95%, se consideraron valores de $P < 0.05$ como significativos.

Factibilidad: Las muestras de secreción pulmonar fueron colectadas y procesadas en el laboratorio de microbiología; en el área de biología molecular donde se cuenta con cabina de bioseguridad clase II, requerida para el procesamiento de la muestra hasta la etapa de lisis celular.

Infraestructura: Se requiere un laboratorio de microbiología con nivel de bioseguridad 3.

Aspectos éticos: El estudio cumplió con los principios de equidad, justicia e imparcialidad de acuerdo a las directrices del informe Belmont. Por otra parte cumplió también con la legislación mexicana (Ley General de Salud, Capitulo sobre la investigación en seres humanos), catalogándola con riesgo mínimo ya que implica la recolección de secreciones respiratorias, no se requirió consentimiento informado pues al momento del ingreso hospitalario se otorgó un consentimiento para los procedimientos invasivos, en este protocolo solo se trabajó con las muestras respiratorias solicitadas por su médico tratante. Finalmente estuvo acorde con la declaración de Helsinki.

Recursos Humanos: Médico Epidemiólogo, Médico Infectólogo, Química Bacterióloga Parasitóloga, Residente de Infectología. **Recursos financieros:** No requirió. La prueba fue donación del fabricante.

8. Resultados:

Se estudiaron a un total de 51 pacientes, de los cuales el 63% eran del sexo masculino y el 37% del sexo femenino. La media de la edad fue de 42.8 años con una desviación estándar de 16.4. Por grupo de edad el 71% de los pacientes tenían entre 20 y 50 años y el 29% eran mayores de 50 años de edad. (Tabla 1)

De las 51 muestras tomadas el 61% fueron de expectoración, y el 39% lavado bronquioalveolar. El 22% fueron positivas en el cultivo para *Mycobacterium tuberculosis*; mientras que para la prueba de GTMBD el 20% fueron positivas. (Tabla 1) Para la prueba GTMBD, 7 hombres y 3 mujeres tuvieron una prueba positiva, mientras que para el cultivo 7 hombres y 4 mujeres tuvieron resultado positivo.

Los hombres tienen un riesgo relativo (RR) de 1.49 con un intervalo de confianza al 95%(IC_{95%}) de 0.33-6.63, de presentar una prueba positiva para GTMBD en comparación con las mujeres, con un valor de P de 0.725. (Tabla 2) Los hombres tienen un RR de 1.05 de presentar un resultado positivo en cultivo de expectoración en comparación con las mujeres, con un valor de P de 1.00. (Tabla 2)

En cuanto al tipo de muestra, para la prueba GTMBD, 4 fueron positivas en expectoración y 6 fueron positivas en lavado bronquioalveolar, con un RR de 0.34 (IC_{95%} 0.08-1.43) de ser positivas en expectoración en comparación con lavado bronquioalveolar con un valor de P de 0.163. Para el cultivo, 7 fueron resultados positivos en expectoración, mientras que 4 fueron positivas en lavado bronquioalveolar, con un RR de 1.16 (IC_{95%} 0.29-4.64) de ser positivas en expectoración en comparación con lavado bronquioalveolar con un valor de P de 1.00. (Tabla 2)

Para la prueba GTMBD, el grupo de pacientes de 20 a 50 años de edad, 5 tuvieron una prueba positiva, y del grupo de pacientes mayores de 50 años, 5 tuvieron una prueba positiva; con un RR de 0.32 (IC_{95%} 0.07-1.34) en pacientes de 20 a 50 años de edad en comparación con los pacientes mayores de 50 años de edad. (Tabla 2)

Para el cultivo de expectoración en el grupo de pacientes de 20 a 50 años de edad, 6 tuvieron un cultivo positivo, mientras que para el grupo de pacientes mayores de 50 años, 5 tuvieron un cultivo positivo; con un RR de 0.40 (IC_{95%} 0.10-1.59) en pacientes de 20 años a 50 años de edad en comparación con pacientes mayores de 50 años. (Tabla 2)

En el análisis de pruebas diagnósticas se comparó la prueba GTMBD con el estándar de oro (cultivo) encontrándose una sensibilidad de esta nueva prueba de 63.6% y una especificidad de 92.5%. Con Un Valor Predictivo Positivo (VPP) de 70% y un Valor Predictivo Negativo (VPN) de 90.2% ($p < 0.001$). (Tabla 3)

Estratificando por tipo de muestra, se encontró que en las muestras de expectoración, con esta nueva prueba, se tiene una sensibilidad del 57% y una especificidad del 100%, aunque una de las casillas de la tabla de contingencia tuvo un valor de cero, lo que modifica de manera importante el resultado de la especificidad. Con un VPP de 100% y un VPN 88.9%. Mientras que en las muestras de lavado bronquioalveolar, la prueba GTMBD tuvo una sensibilidad de 75% y una especificidad del 81% con un VPP de 50% y un VPN de 92.9%. (Tabla 3).

9. Discusión.

En este estudio predominó el género masculino, entre 20 y 50 años de edad; el mayor número de muestras respiratorias fueron expectoraciones, con un incremento en el riesgo de presentar tanto el cultivo como la prueba GTMD positivos en hombres comparativamente con las mujeres para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Al realizar el análisis estadístico de la prueba diagnóstica GTMD evaluada en este estudio comparada con el cultivo para el diagnóstico de Tuberculosis; encontramos que la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) fueron del 63.6, 92.5, 70 y 90.2% respectivamente, a diferencia de lo reportado en el estudio de Seagar y cols ⁽⁴⁰⁾ en 54 muestras respiratorias con frotis positivos, quienes encontraron que la prueba GTMD comparado con el cultivo alcanzó sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 80.5, 75, 97 y 27.3% respectivamente.

Kiraz y cols ⁽⁴³⁾ comparó la prueba GTMD con el cultivo en 115 muestras respiratorias con frotis negativos, reportando sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 97, 89, 97 y 89% respectivamente; distinto de lo encontrado en nuestro estudio.

Syre y cols ⁽⁴⁸⁾ comparó el GTMD en 61 muestras de esputo con frotis positivo por auramina, encontrando una sensibilidad y especificidad de 93.3 y 90% respectivamente. Neonakis y cols ⁽⁴⁹⁾ comparó la prueba GTMD en 125 muestras respiratorias, de las cuales 48 muestras eran Ziehl Neelsen (ZN) positivas encontrándose una sensibilidad del 93.7%, y 48 muestras con frotis negativo alcanzando una sensibilidad del 89.6%.

Franco Álvarez de Luna ⁽⁵⁰⁾ comparó el GTMD con Cobas Amplicor MTB estudiando 128 muestras respiratorias y extra pulmonares, demostró que la sensibilidad y especificidad de la GTMD fue del 92 y 100% respectivamente a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio.

En el estudio de Bicmen y cols ⁽⁵¹⁾ reporta similares hallazgos comparados con los nuestros, donde encontró que la prueba GTMD en 1570 muestras pulmonares con frotis negativos tiene una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 63.2, 99.4, 95.7 y 92.8% respectivamente.

Como se pudo observar en los estudios previos la sensibilidad y especificidad de la prueba GTMD para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar oscila entre 90 y 100% a excepción del estudio de Bicmen y cols ⁽⁵¹⁾ donde se reporta sensibilidad, especificidad, VPP y VPN muy similar a nuestro estudio de investigación, esta discrepancia de resultados puede estar en relación a que la prueba GTMD en la mayoría de ellos fue realizada a partir de muestras con frotis positivos, que evidentemente condiciona rendimiento diagnóstico mayor.

Por otro lado en ninguna de las muestras evaluadas en nuestro estudio se logró detectar micobacterias no tuberculosas (MNT), a pesar que algunos de los pacientes incluidos estaban infectados por el VIH, quizá este en relación a que desconocemos la incidencia de las MNT en nuestro hospital aunado a que comparativamente con el complejo tuberculoso lo reportado en la literatura es < 1%. Esto puede condicionar bajo rendimiento de la prueba para su diagnóstico.

A pesar que la prueba GTMD es una técnica rápida, y relativamente sencilla, con capacidad de emitir un resultado en un día y que pudiera ser prometedora en el diagnóstico temprano de tuberculosis pulmonar, el presente estudio determinó que tiene bajo rendimiento diagnóstico en muestras con frotis negativos por su baja sensibilidad, con los resultados que obtuvimos en nuestro trabajo de investigación, no se recomienda esta prueba como método diagnóstico en aquellos pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar y frotis negativo.

Por el contrario se recomienda continuar su seguimiento y considerar las precauciones necesarias respecto a la transmisibilidad de la enfermedad hasta que el reporte del cultivo sea emitido como negativo y el paciente se encuentre asintomático. Se requieren nuevas herramientas diagnósticas para el diagnóstico temprano del complejo de *M. tuberculosis* y MNT en pacientes con frotis negativos que necesitan ser investigados en estudios posteriores y con un mayor número de muestra.

10. Tablas de los resultados.

Tabla 1. Características de la población estudiada.

Características demográficas	
Género n (%)	
Hombres	32 (63%)
Mujeres	19 (37%)
Grupo de edad (años) n (%)	
20-50	36 (71%)
>50	15 (29%)
Tipo de Muestra n (%)	
Expectoración	31 (61%)
Lavado Bronquio alveolar	20 (39%)
Muestras positivas n (%)	
GTMD	10 (20%)
Cultivo	11 (22%)

n= Número de pacientes. GTMD= GenoType Mycobacteria Direct®

Tabla 2. Distribución del grupo de pacientes estudiados.

	N	RR (IC_{95%})	p
GTMD			
Hombre/Mujer	7/3	1.49 (0.33-6.63)	0.72
Expectoración/LBA	4/6	0.34 (0.08-1.43)	1.16
Cultivo			
Hombre/Mujer	7/4	1.05 (0.26-4.19)	1.00
Expectoración/LBA	7/4	1.16 (0.29-4.64)	1.00
GTMD positiva por grupo de edad (años)			
20-50 / > 50	5/5	0.32 (0.07-1.34)	0.13
Cultivo positivo por grupo de edad (años)			
20-50 / > 50	6/5	0.40 (0.10-1.59)	0.26

LBA= Lavado Bronquio alveolar. RR= Riesgo relativo. GTMD= GenoType Mycobacteria Direct®. IC_{95%}= Intervalo de confianza 95%.

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y negativos de la GTMD comparada con el cultivo y estratificación por tipo de muestra.

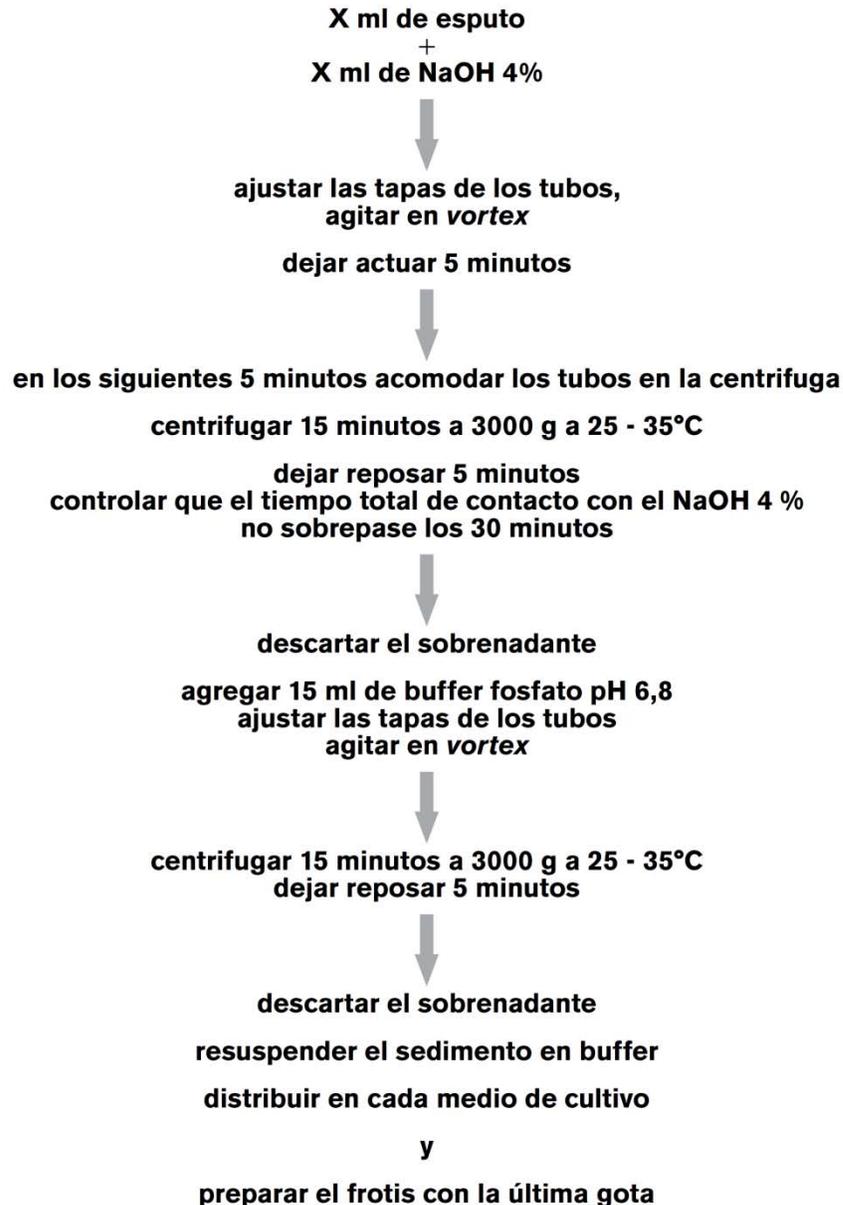
Prueba diagnóstica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	P
GTMD	63.6	92.5	70	90.2	< 0.001
GTMD Expectoración	57.1	100	100	88.9	< 0.001
GTMD LBA	75	81.2	50	92.9	0.06

GTMD= GenoType Mycobacteria Direct®. VPP= Valor predictivo positivo. VPN= Valor predictivo negativo. LBA= Lavado Bronquio alveolar.

11. Anexos:

Anexo 1.

MÉTODO DE PETROFF MODIFICADO



Nota es conveniente reducir el contacto con el descontaminante a 15-20 minutos y la concentración de NaOH al 2%, si en estas condiciones se mantiene bajo el nivel de contaminación (menor al 4%)

Anexo 2.

PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO	
	ORDENAR LAS MUESTRAS
	MARCAR LOS PORTAOBJETOS
	PARTIR EL APLICADOR
	SELECCIONAR LA PARTÍCULA MÁS PURULENTA
	DEPOSITAR EN EL PORTAOBJETOS
	EXTENDER LA MUESTRA UNIFORMEMENTE
	FIJAR EL EXTENDIDO CUANDO ESTÉ TOTALMENTE SECO

Anexo 2.

TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN



CUBRIR CON FUCSINA FILTRADA



CALENTAR HASTA EMISIÓN DE VAPORES TRES VECES DURANTE 5 MINUTOS



LAVAR CON AGUA



CUBRIR CON DECOLORANTE DURANTE 3 MINUTOS



LAVAR CON AGUA



CUBRIR CON AZUL DE METILENO DURANTE 1 MINUTO



LAVAR CON AGUA



SECAR AL AIRE

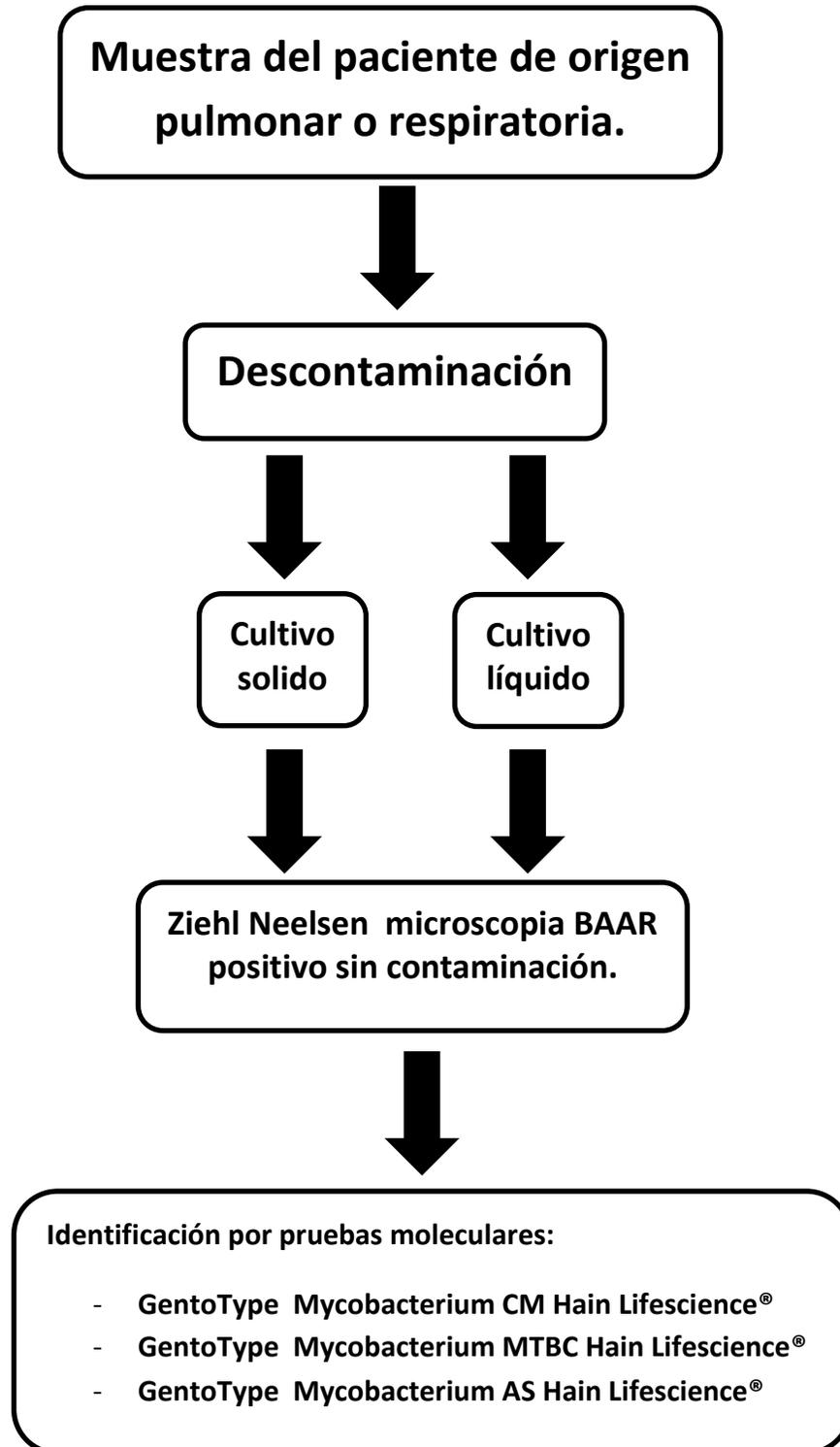
Anexo 3.

Inoculación de los medios de cultivo.

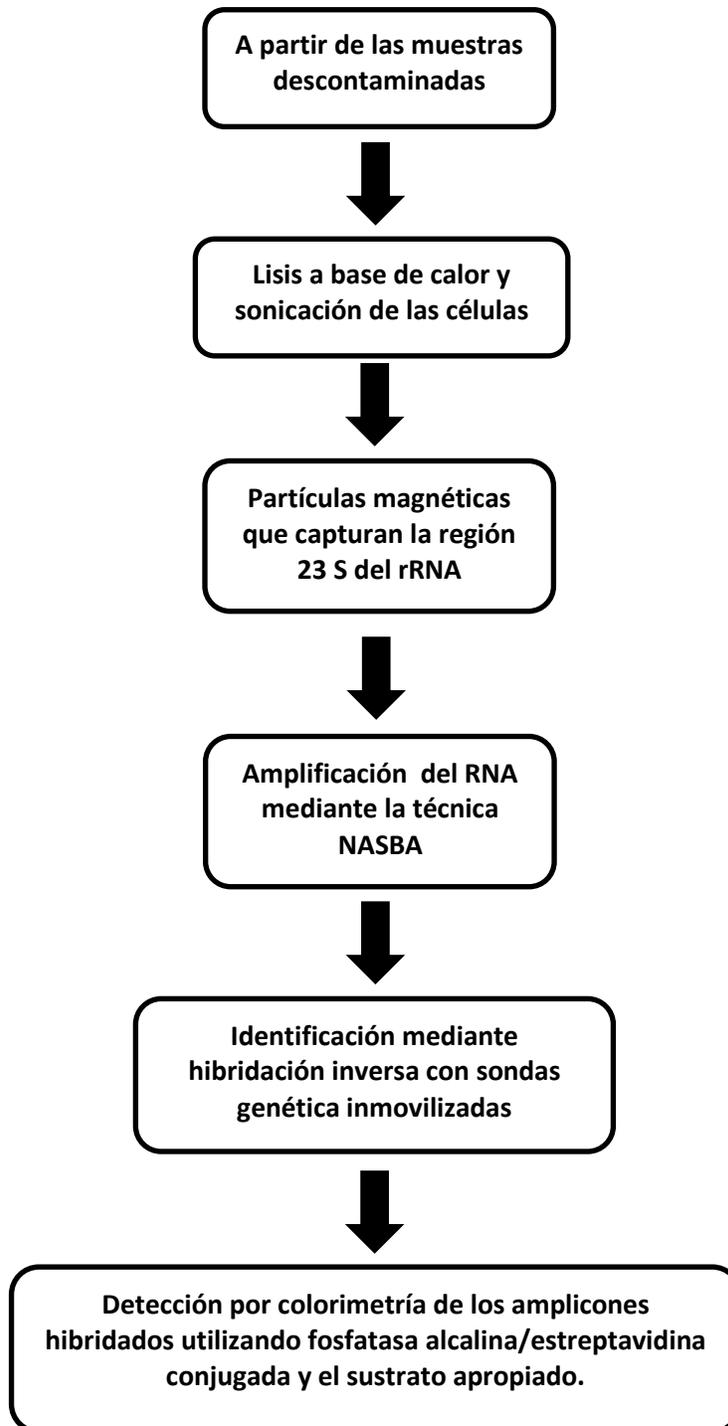
1. Abrir el primer tubo de centrifuga. Con una pipeta distribuir todo el sedimento sembrando entre 0,2 y 0,5 ml (6 - 8 gotas) en cada tubo con medio de cultivo identificado con el número de la muestra. Descartar la pipeta en el recipiente destinado a este fin.
2. Proceder de igual forma con cada tubo conteniendo las muestras procesadas. No abrir un tubo sin haber cerrado el anterior. Descartar la pipeta o el asa utilizada con cada muestra antes de pasar a la siguiente.
3. Permitir que los frotis se sequen dentro de la cabina de seguridad biológica.
4. Repetir todo el procedimiento con las muestras de la siguiente serie.

Anexo 4.

Identificación a partir del cultivo.



Anexo 5.



Hoja de recolección de datos

Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct[®] (GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo para el diagnóstico de tuberculosis.

Nombre _____

N° afil _____

Edad _____

Género _____

Origen _____

Residencia _____

Comorbilidad _____

Tabaquismo _____

Combe _____

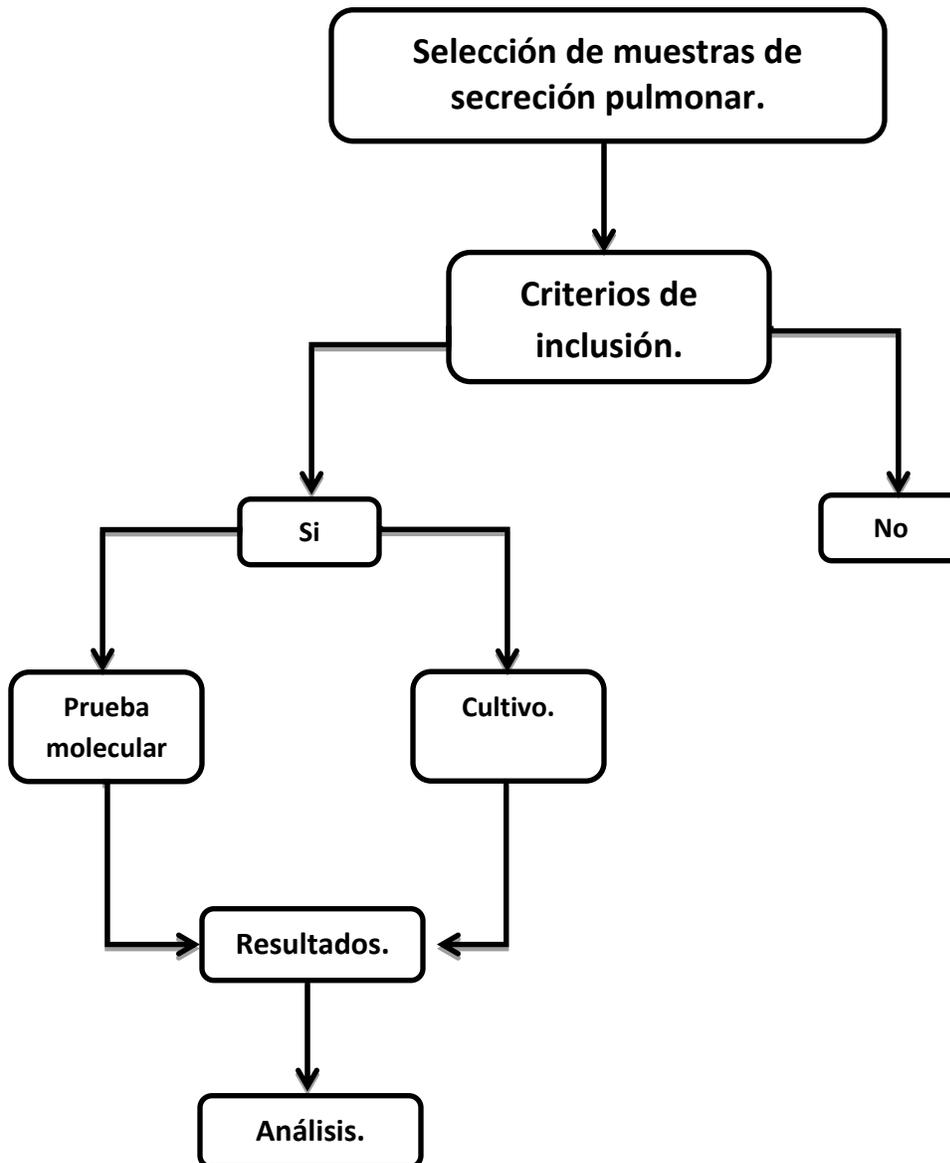
Tipo de muestra respiratoria: _____

Resultado de la prueba GTMD: _____

Aislamiento del Cultivo: _____

Flujo grama de Trabajo.

Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct[®] (GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo para el diagnóstico de tuberculosis.



Cronograma de Actividades.

Correlación de la prueba GenoType Mycobacteria Direct® (GTMD) en muestras de secreción pulmonar Vs cultivo para el diagnóstico de tuberculosis.

ACTIVIDAD	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Agosto	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Agosto	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	
Búsqueda bibliográfica	X	x	x	x	X	x	X	X	x	x	x	X	X	X											
Elaboración del protocolo	X	x	x	x	X	x	X	X	x	x	x	x	X	x	x										
Evaluación por comité institucional																X									
Recopilación de la información																			x	x	x	x			
Análisis de resultados																								x	
Discusión																								x	
Difusión de resultados																									X

2013

2014

2015

Referencias bibliográficas:

1. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1376–1395.
2. Sia IG, Wieland ML. Current concepts in the management of tuberculosis. *Mayo Clin Proc.* 2011; 86: 348-361.
3. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet.* 2011; 378: 57–72.
4. O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31: 475–527.
5. Lynch JB. Multidrug-resistant tuberculosis. *Med Clin N Am.* 2013; 97: 553–579.
6. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report.* Geneva, Switzerland. 2012.
7. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2013; 368: 745-55.
8. Zar HJ, Udwadia ZF. Advances in tuberculosis 2011–2012. *Thorax.* 2013; 68: 283–287.
9. Norbis L, Miotto P, Alagna R, Cirillo DM. Tuberculosis: lights and shadows in the current diagnostic landscape. *New Microbiol.* 2013; 36: 111-120.
10. Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, *et al.* Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 349–61.
11. Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert® MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope?. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010; 10: 937–946.

12. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, Mchugh TD, Ford N, *et al.* Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis.* 2012; 205 suppl 2: 147–158.
13. Connell DW, Berry M, Cooke G, Kon OM. Update on tuberculosis: TB in the early 21st century. *Eur Respir Rev.* 2011; 20: 71–84.
14. Yılmaz G, Eroğlu C, Kurt H, Atasever M, Saniç A. Performance of genotype-MTBDR test directly on clinical specimens. *J Microbiol Infect Dis.* 2012; 2: 135-141.
15. Kunnath-Velayudhan S, Gennaro ML. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. *Clin Microbiol Rev.* 2011, 24: 792-805.
16. Warner DF, Mizrahi V. Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 558-570.
17. Arias M. Avances en el diagnóstico de la infección tuberculosa. *Arch Bronconeumol.* 2011; 47: 521–530.
18. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Plataforma única de información, módulo Tuberculosis. SUIVE 2012. DGE/SSA.
19. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 463-496.
20. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 180-199.
21. Huf G, Kritski A. Evaluation of the clinical utility of new diagnostic tests for tuberculosis: the role of pragmatic clinical trials. *J Bras Pneumol.* 2012; 38: 237-245.
22. Panteix G, Gutierrez MC, Boschirolu ML, Rouviere M, Plaidy A, Pressac D, *et al.* Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *J Med Microbiol.* 2010; 59: 984–989.

23. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013; 5: 1-8.
24. Romero R. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª edición. México DF: Editorial Médica Panamericana, 2007: 564-566. ISBN 978-968-7988-48-1.
25. Ahmad N, Drew WL, Plorde JJ. Microbiología Médica. 5a edición. México DF: Editorial McGraw Hill, 2011: 374-386. ISBN 978-607-15-0554-5.
26. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Manzur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Biomed Res Int*. 2014: 1-21.
27. Haldar S, Bose M, Chakrabarti P, Dagainawala HF, Harinath BC, Kashyap RS, *et al*. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis - the Indian experience. *Tuberculosis*. 2011; 91: 414-426.
28. Häscheid T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidiae*. *Trans R Soc of Trop Med Hyg*. 2008; 102: 520-521.
29. Wilson ML. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and drug susceptibility testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137: 812–819.
30. Wilson ML. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and drug resistance. *Clin Infect Dis*. 2011; 52: 1350–1355.
31. Rodrigues C, Vadwai V. Tuberculosis: laboratory diagnosis. *Clin Lab Med*. 2012; 32: 111-127.
32. Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 772-776.

33. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chem. 2001; 47: 809-814.
34. Fernández de Vega FA. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006; 24 suppl 1: 53-57.
35. Domínguez J, Blanco S, Lacomá A, García-Sierra N, Prat C, Ausina V. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008; 26 suppl 9: 33-41.
36. Richter E, Weizenegger M, Fahr AN, Rüsç-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4303-4306.
37. Richter E, Rüsç-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of GenoType mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures. J Clin Microbiol. 2006; 44: 1769-1775.
38. Mäkinen J, Marjamäki M, Marttila H, Soini H. Evaluation of a novel strip test, GenoType mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. Clin Microbiol Infect. 2006; 12: 481-483.
39. Padilla E, González V, Manterola JM, Pérez A, Quesada MD, Gordillo S, *et al.* Comparative evaluation of the new versión of the INNO-LiPA mycobacteria and GenoType mycobacterium assay for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3083-3088.
40. Seagar AL, Prendergast C, Emmanuel FX, Rayner A, Thomson S, Laurensonm IF. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for the simultaneous detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in smear positive respiratory specimens. J Med Microbiol. 2008; 57: 605-611.

41. Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29 suppl 1: 34-40.
42. Singh AK, Maurya AK, Umrao J, Kant S, Singh-Kushwaha RA, Nag VL, *et al*. Role of GenoType® mycobacterium common mycobacteria/additional species assay for rapid differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* complex and different species of no-tuberculous mycobacteria. *J Lab Physicians*. 2013; 5: 83-89.
43. Kiraz N, Saglik I, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *J Med Microbiol*. 2010; 59: 930–934.
44. Secretaría de Salud. Norma oficial mexicana para la prevención y control de la tuberculosis. NOM-006-SSA2-2013. México DF: 2013.
45. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª edición. México DF: Editorial Manual Moderno, 2008: 337-352. ISBN 9789707293380
46. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II Cultivo. 2008.
47. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I Baciloscopia. 2008.
48. Syre H, Myneedu VP, Arora VK, Grewal HM. Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid amplification tests, the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and the GenoType Mycobacteria direct test. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 3635-3639.
49. Neonakis IK, Gitti Z, Petinaki E, Baritaki S, Baritaki M, Spandidos DA. Evaluation of GenoType Mycobacteria Direct assay in comparison with Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and GenoType MTBDRplus for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J. Clin Microbiol*. 2009; 47: 2601-2603.

50. Franco-Alvarez de Luna F, Ruiz P, Gutierrez J, Casal M. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples. J Clin Microbiol. 2006; 44: 3025-3027.

51. Bicmen C, Gunduz AT, Coskun M, Senol G, Cirak AK, Ozsoz A. Molecular detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four clinically important nontuberculous mycobacterial species in smear-negative clinical samples by the GenoType Mycobacteria Direct test. J Clin Microbiol. 2011; 49: 2874-2878.