

Validación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en Cuba

Validation of LED fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis in Cuba

María R. Martínez Romero,^a Nancy Pedrera Pozo,^a Grechen C. García León,^a Misleidis Sardiñas Aragón,^a Lilian M Mederos Cuervo,^a Raúl Díaz Rodríguez.^a

^a **Conceptualización, idea y diseño del estudio, curación de datos, análisis formal e interpretación de los resultados. Revisión crítica de la versión final y su aprobación. (0000-0001-5947-732X).** Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias.

Conceptualización, idea y diseño del estudio, y recogida de datos. Redacción del borrador del artículo y de su versión final. (0000-0002-2314-2912). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Departamento Docencia.

Curación de datos y aprobación de la versión final que se publicará. (0000-0002-9593-6711). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias.

Análisis y curación de datos. Aprobación de la versión final que se publicará. (0000-0002-9798-5031). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias.

Análisis y curación de datos. Aprobación de la versión final que se publicará. (0000-0001-7431-2216). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias.

Conceptualización, idea y diseño del estudio, revisión crítica del borrador y aprobación de la versión final que se publicará. (0000-0001-91 07-124X). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias.

Recibido: 07 de julio de 2021;

Aceptado: 08 de septiembre de 2021;

RESUMEN

La microscopía de fluorescencia LED (MF LED) ha sido recomendada por la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de la tuberculosis (TB). El objetivo fue validar esta técnica en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRITBLM). Se realizó un estudio de validación de la MF LED en el LNRITBLM del Instituto “Pedro Kouri”, de febrero-julio de 2018. Se incluyeron un total de 98 láminas: 49 frotis que tuvieron cultivo positivo a micobacterias y 49 láminas con cultivo negativo. Se compararon los resultados de la MF LED con los de la microscopía de campo brillante (MCB) y microscopía de fluorescencia convencional (MFC). Con la MF LED y MFC se identificaron 14 láminas positivas que habían sido negativas por MCB, incrementándose la positividad a 13,3%. Por ambas técnicas fluorescentes se detectaron más frotis (18/98) con escasos bacilos ácido alcohol resistentes que por la MCB (8/98). La concordancia entre MF LED y MCB se consideró buena ($k=0,6773$) y entre MF LED y MFC muy buena ($k=0,8711$). La sensibilidad de la MF LED fue mayor (77,55%) que la MCB (48,98%). Se confirmó la mayor sensibilidad de la MF LED, validando esta técnica como una alternativa a la tinción de Ziehl Neelsen en el LNRITBLM. Su implementación en Cuba sería de gran utilidad en la detección y seguimiento del tratamiento de los casos, así como el manejo de los pacientes con sospecha de TB.

Palabras claves: microscopía de fluorescencia LED, micobacterias, microscopía de campo brillante, cultivo.

ABSTRACT

LED fluorescence microscopy (MF LED) has been recommended by the World Health Organization for tuberculosis (TB) diagnosis. The aim was to validate this technique in the National Reference Laboratory for Tuberculosis, Leprosy and Mycobacteria (NRLTBLM). A validation study of the MF LED was carried out at the NRLTBLM of the “Pedro Kouri” Institute, from February-July 2018. A total of 98 slides were included: 49 smears that had a positive culture for mycobacteria and 49 slides with a negative culture. The results of the LED FM were compared with bright field microscopy (BFM) and conventional fluorescence microscopy (CFM). With the LED FM and CFM, 14 positive smears were identified that had been negative by BFM, the positivity rate being increased to 13,3%. By both fluorescent techniques, more smears (18/98) were detected with scanty acid fast bacilli than the BFM (8/98). The agreement between MF LED and BFM was considered good ($k=0,6773$) and between MF LED and CFM very good ($k=0,8711$). The sensitivity of the MF LED was higher (77,55%) than the BFM (48,98%). The higher sensitivity of the MF LED was confirmed, validating this technique as an alternative to Ziehl Neelsen staining in the NRLTBLM. Its implementation in Cuba would be very useful in detecting and monitoring the follow up cases, as well as the management of patients with suspected TB.

Keywords: LED fluorescence microscopy, mycobacteria, bright field microscopy, culture.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo y la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso (clasificado por encima del VIH /sida). La TB es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). La enfermedad típicamente afecta los pulmones (TB pulmonar) pero también puede afectar otros sitios (TB extrapulmonar). Aproximadamente una cuarta parte de la población mundial está infectada por *Mtb*. (Global TB Report, 2020)

La baciloscopía (BK) juega un papel importante en el diagnóstico temprano de la tuberculosis (TB) y las micobacteriosis pues permite identificar los casos altamente infecciosos en la comunidad y es útil en la búsqueda de casos de TB. (ORAS – CONHU, 2018). Sin embargo, su sensibilidad (S) oscila entre 22 y 43% para un solo frotis y se documenta que puede alcanzar hasta 60% en condiciones óptimas en comparación con el cultivo. El umbral de detección de los bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) en muestras de esputo se encuentra entre 10^4 y 10^5 bacilos por mililitro (mL). (ORAS – CONHU, 2018)

El cultivo bacteriológico es más sensible que la BK, pero requiere de técnicas más complejas, que demoran entre 30 y 60 días en demostrar el desarrollo micobacteriano. Por ello, en los últimos decenios se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico que intentan superar las limitaciones de los métodos convencionales de diagnóstico. (Vallego, 2015)

Desde principios de esta década, apareció en el mercado una nueva generación de lámparas: diodos que emiten luz (*Light-Emitting Diodes*: LED, por sus siglas en inglés). Estas lámparas son baratas de producir, emiten luz en casi cualquier tipo de longitud de onda y tienen una vida media de alrededor de 20 000 – 30 000 horas. (Wilson, 2011).

La Organización Mundial de la Salud recomendó en 2011 el uso de la MF LED como alternativa de la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN). Estudios realizados a nivel mundial han documentado un nivel similar o superior de sensibilidad y especificidad para MF LED en comparación con la microscopía convencional basada en tinción ZN para la detección de casos de tuberculosis con BK positiva. Además, se reportó que la MF LED consumía menos tiempo de lectura por portaobjetos porque se examinan con menos aumento que la tinción de ZN cubriendo un área mucho mayor. Por otro lado, en comparación con la microscopía convencional, MF LED necesita menos mantenimiento y se puede operar incluso con pilas. (Imaz, 2017; Goel, 2018)

Cuba, es uno de los países con más baja tasa de incidencia (y de notificación) de TB en la región de Las Américas. Se ha logrado una disminución de la tasa de incidencia de TB (en todas sus formas) desde 10,1 por 100 000/año en 2000 hasta 5,7 por 100 000/año en 2019. (Anuario Estadístico Salud. Cuba, 2018) La solidez de su Programa Nacional de Control y Eliminación de la TB (PNCET) unido a un sistema de salud fortalecido, permite pronosticar que Cuba está en condiciones de poder alcanzar la eliminación de la enfermedad como problema de salud para la fecha propuesta. Sin embargo, para alcanzar este objetivo en las fechas propuestas, se hace necesario implementar técnicas de laboratorio que aumenten la sensibilidad y rapidez en la detección de casos.

El objetivo de este estudio fue validar y comparar la MF LED con las técnicas microscópicas convencionales utilizadas en el diagnóstico bacilosκόpico de TB en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRITBLM) del Instituto “Pedro Kouri” (IPK).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de validación diagnóstica secundaria y parcial en el LNRITBLM del IPK, La Habana, Cuba, de acuerdo a la metodología seguida por Minion y colb. (Minion, 2011), para verificar el método en las condiciones del laboratorio, conocer su factibilidad y poder extenderlo al resto de la red del país. El tamaño de la muestra de estudio quedó conformado con los esputos que cumplieron con los criterios de inclusión en el período comprendido desde febrero a julio de 2018 (98 láminas).

Para evitar el sesgo de la información se incluyeron dos observadores al realizar la lectura de las láminas, los cuales recibieron un entrenamiento internacional sobre la MF LED por parte de una especialista en la temática del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica. Para los resultados finales, se utilizó la media de la lectura de los dos observadores.

Criterios de inclusión: todas las muestras de esputos mucosos o mucopurulentos, con volumen superior a 2 mL, adecuadamente identificados y que se les realizó el cultivo.

Criterios de exclusión: muestras de esputo derramadas o no identificados adecuadamente, con volumen inferior a 2 mL y que no se les realizó cultivo bacteriológico.

El procedimiento para realizar la MCB y las tinciones fluorescentes, así como la lectura de las láminas se realizó de acuerdo a las normas internacionales de la OMS. (ORAS – CONHU, 2018).

Para la lectura de la MCB se utilizó el microscopio Axiostar plus (Carl Zeiss, Alemania). Para la MF LED se utilizó un adaptador ParaLens (QBC Diagnostics, EE.UU.) en un microscopio PrimoStar (Carl Zeiss). En la ejecución de la MFC se empleó un microscopio de fluorescencia BX41 (Olympus, Japón).

El procesamiento de las muestras para el cultivo: la inoculación en los medios de cultivo para micobacterias, incubación, lectura e identificación se realizaron de acuerdo a los Procedimientos Normados de Operación del Laboratorio y PNCET. (PNCET. Manual de normas y procedimientos, 2015)

Para realizar la validación diagnóstica de la MF LED con las técnicas microscópicas convencionales empleadas para el diagnóstico de *Mtb*, se esperó el resultado del cultivo en Löwenstein Jensen (LJ) y se incluyeron todos los frotis que tuvieron cultivo positivo (49) e igual número de láminas con cultivo negativo (49).

Análisis estadístico de los resultados: para la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y el índice de Youden se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDAT, versión 3.1. Para este análisis se excluyeron los cultivos contaminados y se utilizó el cultivo bacteriológico como prueba de referencia. Para estimar la concordancia (C) entre las técnicas de microscopías se utilizó el índice de kappa (k), según lo recomendado por Landis y Koch. (Landis, 1977), como se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 1. Intervalos de concordancia y su valoración entre las técnicas utilizadas según Landis y Koch.

Índice de Kappa	Nivel de concordancia
<0,00	Sin acuerdo
0,01- 0,20	Baja
0,21- 0,40	Aceptable
0,41- 0,60	Moderada

Tabla 1. Continuación

Índice de Kappa	Nivel de concordancia
0,61- 0,80	Buena
0,81- 1,00	Muy buena

Aspectos éticos: el protocolo de investigación se evaluó y aprobó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de Investigación-IPK (Código de aprobación: CEI-IPK 42-18).

RESULTADOS

Es importante señalar que hubo 99% de coincidencia entre los dos observadores que realizaron la lectura de las láminas y lo que se describe a continuación es la media de las lecturas de ambos microscopistas.

En la **Tabla 2** se muestra la comparación de los resultados de las tres técnicas de microscopía utilizadas. Por la MF LED y MFC, se identificaron 38 (37,8%) láminas positivas a BAAR, de ellas 18 paucibacilares (10 más que por la MCB), confirmando la mayor sensibilidad de las microscopías que utilizan la tinción con auramina O. Por la MCB, fueron positivas 24 (24,5%) láminas; sin embargo, al comparar este resultado con los de las MF LED y MFC, las diferencias no fueron significativas ($p= 0,1590$).

Tabla 2. Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED con la microscopía de campo brillante y la microscopía de fluorescencia convencional. LNRI – TB – IPK. Febrero – Julio, 2018.

Microscopía	Láminas Negativas	Láminas Positivas				Total positivos
		Paucibacilares	+	++	+++	
Campo Brillante	74	8	3	2	11	24 (24,5%)
Fluorescencia LED	60	18	4	2	14	38 (37,8%)
Fluorescencia Convencional	60	18	4	2	14	38 (37,8%)

Leyenda: Paucibacilares: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces

En la **Tabla 3** se muestra la comparación de los resultados de la MF LED con la MCB, según grados de codificación. Con la MF LED se detectaron 14 láminas positivas a BAAR que resultaron negativas con la MCB (12 paucibacilares, uno positivo +, y otro fuertemente positivo, +++), por lo que se incrementó la tasa de positividad a 13,3% y se observaron más frotis con escasos BAAR (18/98) que la MCB (8/98), lo que confirmó la mayor sensibilidad de esta técnica.

Tabla 3. Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED con la microscopía de campo brillante según grados de codificación. LNRI-TB-IPK. Febrero-Julio 2018.

Microscopía de Campo Brillante	Microscopía de Fluorescencia LED					Total
	Negativos	Paucibacilares	+	++	+++	
Negativos	60	12	1	0	1	74
Paucibacilares	0	6	2	0	0	8
+	0	0	1	1	1	3
++	0	0	0	1	1	2
+++	0	0	0	0	11	11
Total	60	18	4	2	14	98

Leyenda: Paucibacilares: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces

La **Tabla 4** muestra la comparación entre la MF LED y la MFC. Se identificaron tres láminas que fueron codificadas como paucibacilares por la MF LED que resultaron negativas por la MFC, y el mismo número que se identificó como negativa por la MF LED, se codificó como paucibacilar por la MFC.

Tabla 4. Comparación de los resultados de la microscopía de fluorescencia LED con la microscopía de fluorescencia convencional según grados de codificación. LNRI-TB-IPK. Febrero-Julio 2018.

Microscopía de Fluorescencia convencional	Microscopía de Fluorescencia LED					Total
	Negativos	Paucibacilares	+	++	+++	
Negativos	57	3	0	0	0	60
Paucibacilares	3	15	0	0	0	18
+	0	0	4	0	0	4
++	0	0	0	2	0	2
+++	0	0	0	0	14	14
Total	60	18	4	2	14	98

Leyenda: Paucibacilares: codificación que se le otorga a las muestras con escasos BAAR/ +: una cruz/ ++: dos cruces/ +++: tres cruces

La C entre la MF LED y MCB, según la clasificación de Landis y Koch, fue buena ($k=0,6773$). Al comparar las dos técnicas fluorescentes se consideró muy buena ($k=0,8711$). Al confrontar la proporción de frotis verdaderos positivos a BAAR (tuvieron crecimiento de *Mtb* en el medio de cultivo), hubo diferencia significativa entre las láminas observadas por

MF LED (38,776%) y las observadas por la MCB (24,490%) obteniéndose un valor de $p=0,0459$. Al realizar el mismo análisis entre los dos métodos de microscopía fluorescente, coincidió que la proporción de láminas verdaderas positivas a BAAR fue de 38,776, por lo que no existieron diferencias entre ambas proporciones ($p=0,8834$).

Las sensibilidades de la MF LED y MFC fueron similares: 77,55% y 75,51%, respectivamente, pero mayores comparadas con la MCB (48,98). El índice de Youden (IY) para la MF LED (0,78) fue ligeramente inferior (0,73) con relación a la MFC, pero muy superior que el obtenido por la MCB (0,49) (**tabla 5**).

Tabla 5. Resultados de los indicadores de desempeño de la microscopía de fluorescencia LED, la microscopía de campo brillante y la microscopía de fluorescencia convencional. LNRI – TBLM – IPK. Febrero – Julio 2018.

Indicadores de desempeño	Tipo de Microscopía		
	de Fluorescencia LED	Campo brillante	Fluorescencia Convencional
Sensibilidad	77,55%	48,98%	75,51%
Especificidad	100,00%	100,00%	97,96%
Valor Predictivo +	100,00%	100,00%	97,37%
Valor Predictivo -	81,87%	66,22%	80,00%
Índice de Youden	0,78	0,49	0,73

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que se realizó en Cuba donde se comparó la MF LED con dos métodos de microscopía (MCB y MFC) que se utilizan en el diagnóstico de TB. Se confirmó la mayor sensibilidad de las microscopías que utilizan la tinción con auramina O, haciendo énfasis en la MF LED, que la de campo brillante utilizando la tinción de ZN, pues se identificaron mayores láminas positivas con escasos BAAR que previamente fueron identificadas como negativas por la MCB.

En 2011, la OMS recomendó la MF LED para el diagnóstico de la TB, así como la sustitución de la MFC por la MF LED con tinción de auramina O, en todos los centros de salud en donde se utiliza la fluorescencia convencional y a su vez indicó que esta se introdujera gradualmente como una alternativa para MCB con tinción de ZN en todos los laboratorios. (Marzouk, 2013; Imaz, 2017)

La MF LED es una de las técnicas disponibles en el mercado actualmente, tiene el potencial de mejorar algunas de las desventajas de MFC y MCB (Kuhn, 2010). El uso de diagnósticos con técnicas más sensibles, incluida la microscopía fluorescente (como el sistema ParaLens QBC), se ha limitado en países de bajos recursos por la falta de infraestructura adecuada, capacitación del personal del laboratorio, así como la falta de fondos. Sin embargo, esta técnica es potencialmente más sensible y menos laboriosa que la MCB utilizando el ZN u otros métodos como el de Kinyoun para la identificación de BAAR. Por lo tanto, los microscopistas que estén entrenados en el uso de métodos convencionales con tinción fluorescente y microscopía de campo oscuro, no tendrían dificultades para leer láminas con los ParaLens. Por otro lado se evitaría la compra de un segundo microscopio ya que el

adaptador convierte un microscopio de luz brillante en uno de fluorescencia LED, disminuyendo los costos (Kuhn, 2010).

Los beneficios operativos de los microscopios LED son de gran interés para laboratorios de países escasos recursos económicos. Su uso podría mejorar significativamente el flujo de trabajo y maximizar la utilización del espacio en el laboratorio, además de los beneficios observados en los climas tropicales relacionados con a la ausencia de climatización en espacios cerrados. Por otro lado el bajo precio de compra y costos por mantenimiento del equipo, mayor vida útil del diodo y ausencia de componentes tóxicos, son todos factores que influirían para el posterior uso de esta herramienta en los laboratorios para mejorar calidad del diagnóstico por BK. (Minion, 2011)

En este trabajo se incrementó la tasa de detección de BAAR utilizando la MF LED, similar hallazgo reportó Goel y cols en un estudio realizado en la India (Goel, 2018). Estos hallazgos acreditan la MF LED, como una herramienta para aumentar la S y tasa de detección de casos. Sin embargo es importante tener en cuenta otros factores como: la formación del personal, una mejor capacidad de trabajo y una buena infraestructura del laboratorio. (Goel, 2018)

Otro hallazgo significativo fue el aumento de la tasa de detección en frotis con escasos BAAR (paucibacilares) con la MF LED, similar a lo reportado por otros autores (Goel, 2018; Chair, 2013). La mejor capacidad de absorción del ácido micólico para el carbol auramina (usado en LED-FM) en comparación con carbol fuschina (utilizado en la tinción de ZN convencional) resultando en la tinción de un mayor número de bacilos, alta potencia para examinar mayor número de campos ópticos, la identificación más fácil de los bacilos, así como la observación con un contraste más nítido, son atributos de la MF LED que lo hace más sensible que el MCB que utiliza la tinción de ZN. (Goel, 2018)

Marzouk y cols que realizó un estudio con 180 muestras positivas a *Mtb* por el cultivo y el mismo número de muestras negativas, la S de MF LED y MFC (82,2% y 79,4%, respectivamente) que obtuvieron, fue mayor a la que se obtuvo en este trabajo. Sin embargo, la especificidad para las microscopias fluorescentes en la presente investigación fue similar a la que obtuvieron los mismos autores, 97,2% para ambas técnicas. (Marzouk, 2013)

La concordancia de las técnicas fluorescentes utilizadas en este estudio fue menor a la que reportó Kuhn y cols en un estudio multicéntrico, donde participan microscopistas de tres países (Bangladesh, Trinidad y Etiopia) y se comparó la MF LED utilizando el adaptador ParaLens QBC contra la MFC obteniéndose 100% de C. En esa investigación se utiliza el adaptador con objetivo de 60x y se investigan menos láminas (25) con resultados conocidos del cultivo (5 láminas negativas y 20 frotis positivos con diferentes grados de positividad), lo cual pudo haber influido en el resultado. (Kuhn, 2010).

Con este estudio, se confirma el mayor rendimiento de la MF LED, por lo que este método pudiera ser una alternativa a la tinción de ZN en el LNRITBLM del IPK, y su implementación, como método diagnóstico, sería de gran utilidad en la detección y seguimiento del tratamiento de los casos, así como el manejo de los pacientes con sospecha de TB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chaidir, L., Parwati, I., Annisa, J., Muhsinin, S., Meilana, I., Alisjahbana, B, et al. (2013). Implementation of LED fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary and HIV-associated tuberculosis in a hospital setting in Indonesia. *PLoS One*, 2013;8:e61727.
- Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. En: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
- Goel, S., Pandey, R., Kumar, M., Kankaria, A. y Khaneja, R. (2018). Impact of introducing light-emitting diode fluorescence microscopy services for diagnosis of pulmonary tuberculosis under Revised National Tuberculosis Control Program India. *Lung India*, 35, 307-11.
- Imaz, M., Allassia, S., Aranibar, M., Gunia, A., Poggi, S., Togneri, A. (2017). Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina. *Biomed*, 37(2), 164-74.
- Kuhn, W., Armstrong, D., Atteberry, S., Dewbrey, E., Smith, D., Hooper, N. (2010). Usefulness of the Paralens™ fluorescent microscope adaptor for the identification of mycobacteria in both field and laboratory settings. *The Open Microbiol J*, 4, 30-3. En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2885593/>
- Landis, J.R., Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33 (1), 159-74.
- Marzouk, M., Ferjani, A., Dhaou, M., Ali, M.H., Hannachi, N., Boukadida, J. (2013). Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid-fast bacilli in an area with high tuberculosis incidence. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 76(3), 306-
- Minion, J., Pai, M., Ramsay, A., Menzies, D., y Greenaway, C. (2011). Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid fast bacilli in a low-incidence setting. *PLoS ONE*, 6(7). En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811622>
- Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. (2020), ISSN: 1561-4433. *Anuario Estadístico de Salud*, La Habana, Cuba.
- Ministerio de Salud Pública. Resolución Ministerial 277/2014. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de normas y procedimientos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 2015. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/programa_2015.pdf.
- ORAS – CONHU, (2018). *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: manual de actualización de la baciloscopia*, Lima, Perú.
- Vallego, V.P., Rodríguez, J.C., Searle, M.A, Farga, C.V. (2015). Ensayo Xpert/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. *Rev Chil Enferm Respir*, 31, 127-31.
- Wilson, M.L. (2011), Recent Advances in the Laboratory Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Drug Resistance. *CID*, 52(11):1350-5.