

Evaluación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en personas viviendo con VIH/sida.

María Rosarys Martínez Romero¹
Nancy Pedrera Pozo²
Misleidis Sardiñas Aragón³
Grechen García León⁴

¹ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, La Habana, Cuba, rosarys@ipk.sld.cu

² Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Docencia del Instituto Pedro Kourí, La Habana, Cuba, nancy@ipk.sld.cu

³ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, La Habana, Cuba, misle@ipk.sld.cu

⁴ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, La Habana, Cuba, grechengl@ipk.sld.cu

Resumen:

Introducción: La microscopía de fluorescencia (MF) LED es recomendada por la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de la tuberculosis (TB) desde 2011. **Objetivo:** evaluar el desempeño de la MF-LED para el diagnóstico de tuberculosis (TB) en personas viviendo con VIH/sida (PVVS). **Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNR-TBLM) del Instituto “Pedro Kourí”, de abril 2019 a febrero 2020. Se incluyeron 220 esputos de personas con sospecha de TB. Se compararon los resultados de la MF-LED con la microscopía convencional de Zielh Neelsen (ZN). Se utilizó el cultivo como prueba de referencia. **Resultados:** En 27/220 muestras se confirmó *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) por cultivo. Se identificó bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) en 25 frotis por MF-LED contra 13 por ZN. Por MF-LED se observaron bacilos en 13 láminas que fueron negativas por tinción de ZN y se identificaron 10 láminas con escasos bacilos más que por ZN. La sensibilidad (92,59%) e índice de youden (0,92) de MF-LED fue superior a la del ZN (48,15% y 0,48, respectivamente). La MF-LED identificó BAAR en 16/25 PVVS (59,3%), con conteo de Linfocitos CD4+ menor de 200 células/mL. **Conclusiones:** El mayor rendimiento de la MF LED sugiere que puede ser una alternativa de la tinción de ZN en el LNRI-TBLM. Contar con una técnica más sensible permitirá incrementar la detección de casos con TB pulmonar baciloscopia positiva en PVVS, sobre todo en los pacientes con conteo de Linfocitos T CD4+ bajos.

Palabras claves: Tuberculosis, microscopía de fluorescencia LED, baciloscopia

I. INTRODUCCIÓN

Hasta la aparición de la pandemia del coronavirus (COVID-19), la Tuberculosis (TB) ha sido la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso. La TB es causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). La enfermedad principalmente afecta los pulmones (TB pulmonar) pero también puede afectar otros órganos (TB extrapulmonar). Aproximadamente, una cuarta parte de la población mundial está infectada por *Mtb*. (1)

La principal limitación de los Programas de Control de la TB es la dificultad para realizar el diagnóstico temprano de la enfermedad. Tradicionalmente, la baciloscopía (BK) ha sido el método inicial para el diagnóstico de la TB por su simplicidad, rapidez de procesamiento y bajo costo. Sin embargo, su sensibilidad (S) varía de un 22 - 43% para un solo frotis y puede alcanzar hasta 60% en condiciones óptimas en comparación con el cultivo, lo que limita la utilidad de esta técnica sobre todo, en muestras de esputo con escasos bacilos. Por otra parte, el cultivo en medio sólido es más sensible que la BK, pero requiere de técnicas más complejas que demoran entre 30 y 60 días para que las colonias puedan ser detectadas y se pueda realizar la identificación de especie. (2,3)

La microscopía de fluorescencia (MF) LED (Light-Emitting Diodes, por sus siglas en inglés) se desarrolló principalmente para brindar a los países con recursos limitados acceso a los beneficios de microscopía de fluorescencia. Entre las ventajas de esta técnica están, en primer lugar, que los microscopios ópticos existentes se convierten a fuentes de luz LED con adaptadores, por lo que son menos costosos, requieren menos energía y pueden funcionar con baterías. Otras ventajas de esta técnica es que consume menos tiempo de observación y lectura porque se examinan con menos aumento que la tinción de Ziehl Neelsen (ZN), cubriendo un área mucho mayor. Por otro lado la calidad de la tinción por la microscopía de fluorescente puede ser más fácil de controlar, ya que la calidad del polvo de auramina comercial es menos variable que el de la fucsina básica, además se necesita menos mantenimiento y se puede operar incluso con pilas. (4,5)

El buen desempeño de esta tecnología, llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a recomendar el uso de la MF-LED como una alternativa para la microscopía convencional con la tinción de ZN en laboratorios de alto y bajo volumen de procesamiento de muestras y que esta debe sustituirse de manera escalonada. (5,6)

La Organización Panamericana de la Salud ha contraído el compromiso de apoyar a los países de la Región para acelerar la implementación de la Estrategia Fin de la TB y se conviertan en la primera región del mundo en alcanzar la eliminación de la TB como problema de Salud Pública. El camino hacia la eliminación implica pasar de una baja incidencia a la fase de pre-eliminación. Cuba se encuentra entre los 14 países (tercer lugar) de la región de Las Américas de baja incidencia de TB (≤ 10 casos por cada 100 000 habitantes) que tienen la oportunidad de ser los primeros en avanzar hacia la eliminación de esta temible enfermedad. (7)

En Cuba el Programa Nacional de Control y Eliminación de la TB (PNCET) en conjunto con el Ministerio de Salud Pública, ha preparado un Plan Estratégico Nacional basado en la Iniciativa Mundial de Fin de la TB donde se establecen objetivos, metas, estrategias y prioridades para alcanzar este hito. Uno de los objetivos es implementar técnicas de laboratorio que aumenten la sensibilidad y rapidez en la detección de casos. (8)

El diagnóstico de TB de la red de laboratorios se basa en la BK utilizando la tinción de ZN y el cultivo bacteriológico. En 2014, se introdujo el equipo GeneXpert en el Laboratorio Nacional de Referencia en Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI – TBLM) del Instituto “Pedro Kourí” (IPK), tecnología

recomendada por la OMS como prueba inicial para el diagnóstico de la TB. Posteriormente, se incorporaron al diagnóstico molecular otros tres laboratorios regionales del país. Sin embargo, pese a las ventajas reconocidas de esta metodología (detecta *Mtb* en menos de 2 horas y también la resistencia a rifamicina), debido a dificultades con los recursos financieros sostenibles para adquirir cartuchos y mantenimiento de los equipos, solo está indicada en grupos vulnerables en la mayoría de los países de la región, incluyendo Cuba. De los casos notificados (290 000) en Las Américas en 2019, solo el 25% tuvo acceso al equipo GeneXpert y en Cuba de los 580 notificados en el mismo año, solo el 22%. (7,9)

Por lo que se hace necesario incorporar otras técnicas, recomendadas por la OPS/OMS, para mejorar la detección de casos, como la MF-LED y así colaborar en el avance mundial hacia la eliminación de esta enfermedad como problema de salud pública para 2035. El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento de la MF-LED para el diagnóstico de TB en personas viviendo con VIH/sida (PVVS) en el LNRI – TBLM del IPK en muestras de esputo de pacientes con sospecha de TB.

II. MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal en el LNRI-TBLM del IPK, La Habana. Por ser Cuba un país de baja incidencia de TB (7), se siguió la metodología empleada por Minton y colaboradores (cols) en 2011 en un estudio similar realizado en Canadá. (10)

Criterios de inclusión: todas las muestras de esputo mucoso o mucopurulentos, con volumen superior a 2mL, adecuadamente identificados y a los que se le realizó el cultivo bacteriológico. Se incluyeron todos los cultivos con resultado negativo y aquellos donde se realizó la identificación del Complejo *Mtb*.

Criterios de exclusión: todas las muestras extrapulmonares, especímenes derramados o no identificados adecuadamente, con volumen inferior a 2 mL y a los que se contaminó el cultivo bacteriológico o no se le realizó el mismo y con resultado del cultivo de micobacteria no tuberculosa.

Se incluyeron en el estudio todos los especímenes que cumplieron con los criterios de inclusión, por lo que la muestra final a estudiar quedó conformada por 220 esputos de pacientes con sospecha de TB que se encontraban ingresados o que fueron atendidos en la consulta externa del Hospital de Referencia Nacional de atención al paciente VIH en el período de Abril 2019- Febrero 2020.

El procedimiento para realizar la tinción de ZN y la tinción fluorescente con auramina O, así como la lectura de las láminas se realizó de acuerdo a las normas internacionales. (11) Para la lectura de la tinción de ZN 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).

El procesamiento de las muestras para el cultivo, la inoculación, incubación, lectura e identificación se realizaron de acuerdo a los Procedimientos Normados de Operación del Laboratorio y PNCET. (12)

Para realizar el análisis de los resultados, se esperó el resultado del cultivo en Löwenstein Jensen (LJ), que se utilizó como prueba de referencia. Se incluyeron todos los frotis que tuvieron resultado del cultivo positivo a *Mtb* y los que fueron cultivo negativo.

Análisis estadístico de los resultados: para la S, especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y el índice de Youden (IY) se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDAT, versión 3.1 y el programa estadístico Minitab 14.0. Para este análisis se excluyeron los cultivos contaminados. Para estimar la concordancia (C) entre las técnicas de micros-

copias se utilizó el índice de kappa (k), según lo recomendado por Landis y Koch, como se muestra a continuación. (13)

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
0,61- 0,80	Buena
0,81- 1,00	Muy buena

Aspectos éticos: Por el tipo de estudio que se realizó no se requirió de consentimiento informado de los pacientes involucrados en esta investigación. El trabajo se llevó a cabo en cabinas de bioseguridad clase II, según las normas y procedimientos del laboratorio para el trabajo con micobacterias. Los nombres de los pacientes involucrados se mantuvieron de manera confidencial. No hubo conflicto de intereses entre los autores. Los protocolos de investigación se evaluaron y aprobaron por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de Investigación-IPK (Código de aprobación: CEI-IPK 42-18) (Código de aprobación: CEI-IPK 02-22).

III. RESULTADOS

Con la MF-LED se identificó bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) en 12 frotis de muestras de pacientes (10 paucibacilares y dos que fueron positivo a una +), que habían sido identificado como negativos por la tinción de ZN, confirmando la mayor S de las técnica fluorescente. En dos casos tanto por la MF-LED como por la tinción de ZN la BK fue negativa, para ambos individuos el resultado del cultivo fue positivo a *Mtb*, (con codificación 6 considerada relativamente baja según las normas y procedimientos del PNCETB), por lo que se puede inferir que estuvo por debajo del límite de detección de BAAR de la microscopía fluorescente. (13) Solo se detectó un caso positivo por la tinción con auramina O (paucibacilar) donde cultivo fue negativo y se trató de un paciente en seguimiento del tratamiento.

La S de la MF - LED (92,59%) fue muy superior a la que se obtuvo con la tinción de ZN (48,15%); el IY calculado para la tinción fluorescente fue de 0,92 (valor muy cercano a 1), superior al de la tinción de ZN (0,48) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los Indicadores de desempeño de la MF - LED y tinción de ZN. LNRI – TBLM – IPK. Febrero – Julio 2018.

Indicadores de desempeño	MF-LED	Tinción de ZN
Sensibilidad	92,59%	48,15%
Especificidad	99,48%	100%
Valor predictivo positivo	96,15%	100%
Valor predictivo negativo	98,97%	93,24%
Índice de validez	98,64%	93,64%
Índice de Youden	0,92	0,48

Se comparó el área bajo la curva (AUC) de ambas técnicas. Para la MF-LED se obtuvo el mayor valor de AUC con 0,9617 (IC: 0,9112-1,0123) comparado con la tinción de ZN que fue de 0,7407 (IC: 0,6447-0,8368).

Para relacionar los resultados positivos por la MF-LED y el conteo de Linfocitos T CD4+, se tuvieron en cuenta solo los que tuvieron cultivo positivo a *Mtb*. Por la MF-LED identificó BAAR en 16/27 (59,3%) de los pacientes con menos de 200 células/mL contra 10 (37,0%) por ZN; similar sucedió para los pacientes con Linfocitos T CD4+ entre 200 y 500 células/mL con 9/27 (33,3%) y 3/27 (11,1%), respectivamente, pero al comparar las proporciones estas no fueron significativas. Sin embargo al comparar la proporción del número total de láminas positivas que se identificaron por MF-LED (25/27 para 92,6%) con las que se observaron por la tinción de ZN (13/27 para 48,1%), las diferencias si fueron significativas ($p=0,0010$). La media de Linfocitos T CD4+ para MF-LED y tinción de ZN fueron de 68,1% y 67,3%, respectivamente con una desviación estándar de 132,05 para la tinción fluorescente y 134,02 para la tinción convencional. Tabla 2.

Tabla 2. Relación entre el resultado de la MF – LED y tinción convencional de ZN con el Conteo de Linfocitos T CD4+.

Conteo de Linfocitos T CD4+.	MF-LED		ZN		Valor p
	(N=27)		(N=27)		
	No.	%	No.	%	
Menos 200 Cel/mL	16	59,3	10	37,0	0,1733
200 - 500 Cel/mL	9	33,3	3	11,1	0,1017
Mas 500 Cel/mL	0	0	0	0	-
Total Cel/mL	25	92,6	13	48,1	0,0010
Media	68,1		67,3		
Desviación estándar	132,05		134,02		

Se relacionaron los resultados del conteo de linfocitos T CD4+ con la positividad de la MF-LED según grados de codificación. Es importante señalar que la MF-LED detectó bacilos en los frotis con recuento linfocitos T CD4+ por debajo de 50 cél/mL (con un mínimo de 23,0 cél/mL en frotis paucibacilares; de 25,0 cél/mL en frotis positivos a 1+ y de 24,0 cél/mL en frotis positivos a 3+++). Sin embargo en dos de los casos confirmados con TB por cultivo, la MF-LED no detectó BAAR (pacientes con conteo de linfocitos T CD4+ con un mínimo de 35,0 cél/mL).

Este es el primer estudio que se realizó en Cuba donde se evaluó el rendimiento de la MF-LED en PVVS. Los resultados que se obtuvieron en esta investigación confirman el mejor rendimiento de esta herramienta sobre la tinción de ZN.

La MF-LED tiene el potencial de mejorar algunas de las desventajas de la microscopía de fluorescencia convencional y tinción de ZN. 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 y la falta de fondos. Sin embargo, esta técnica es potencialmente más sensible y menos laboriosa que la tinción de ZN, además 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. (14) Además es que 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. (15)

En este estudio se incrementó la tasa de detección de BAAR utilizando la MF-LED, lo cual coincide con lo que reportó Goel y cols en un estudio realizado en la India. Estos hallazgos acreditan la MF-LED, como una herramienta para aumentar la S y tasa de detección de casos con BK positiva. Sin embargo es importante tener en cuenta la formación del personal, una mejor capacidad de trabajo y una buena infraestructura del laboratorio. (5, 16)

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. El ácido micólico presente en la pared de las micobacterias tiene una mejor capacidad de absorción de la carbol auramina O (usado en MF-LED) en comparación con carbol fuschina (utilizado en la tinción de ZN), resultando en la tinción de un mayor número de bacilos, además la 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 superior a la tinción de ZN. (5,15)

Con este estudio, se confirmó la mayor sensibilidad de la MF-LED para la detección de BAAR en muestras de esputo de pacientes con coinfección con VIH, por lo que este método pudiera ser una alternativa a la tinción de ZN en el LNRI-TBLM 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.

Para la elección entre dos pruebas diagnósticas distintas se puede recurrir a las curvas ROC. En el ámbito sanitario, las curvas ROC también se denominan curvas de rendimiento diagnóstico. Sin embargo hay que tener en cuenta varios aspectos tales como: las pruebas a comparar deben ser medidas simultáneamente y aplicados sobre los mismos sujetos y contrastados contra el mismo estándar de oro; en este estudio se cumplieron todos estos requisitos. La elección se realiza mediante la comparación del área bajo la curva (AUC) de ambas pruebas. Esta área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica. (17) En este estudio el AUC para MF-LED fue mayor que la calculada para la tinción de ZN, lo que significa que existe un 96% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo de TB sea el más correcto que el de una persona sana escogida al azar y se puede sugerir que esta técnica tiene mayor capacidad discriminativa para la detección de BAAR que la tinción de ZN convencional.

El conteo normal de linfocitos T CD4+ en un adulto se encuentra entre 800 a 1050 células por mL (cél/mL), con un espectro de variación (2 desviaciones estándares) de 500 a 1 500 cél/mL. Con menos de 500 células significa que el sistema inmunitario está debilitado, como sucede en PVVS. Estos individuos con un conteo absoluto de células CD4+ < 200 cél/mL son clasificados como sida por los Centros para el Control de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica y por la Organización Mundial de la Salud y están en riesgo de adquirir infecciones oportunistas como la TB. (18) (19)

Al analizar los la relación de los resultados del conteo de linfocitos T CD4+ con la positividad de la MF-LED según grados de codificación, la técnica fluorescente fue capaz de detectar BAAR en PVVS con conteo de Linfocitos T CD4+ entre 200 y 500 cél/mL. Sin embargo en dos de los casos confirmados bacteriológicamente con TB donde la MF-LED no detectó bacilos al examen directo. Se trató de 2 pacientes con codificación 6 al cultivo (considerada relativamente baja según el capítulo de normas y procedimientos del PNCETB de Cuba, esto pudiera deberse a que el número de bacilos en la muestra estuvo por debajo del límite de detección de la técnica fluorescente. (12) Existen otros factores subjetivos

que pudieran estar relacionados, por ejemplo, que la muestra no estuviera homogéneamente distribuida en la lámina y el observador no coincidiera al observar la línea donde estuvieran los bacilos, por otro lado cuando la muestra es muy paucibacilar es difícil identificar bacilos en el frotis, lo cual depende de la experiencia del observador.

En la literatura consultada sólo se encontró un estudio donde se relacionó los resultados de la lectura de la MF-LED con los del conteo de linfocitos T CD4+. Este trabajo se realizó por Albert y cols en Uganda, 2013 que incluyó 627 pacientes y utilizaron tres adaptadores diferentes a los utilizados en esta investigación (Fraen, AFTERTM, LuminTM). Sin embargo, los autores no tuvieron en cuenta los grados de codificación (como en este estudio), solo lo relacionaron con la S, la cual fue más baja en pacientes con recuentos de linfocitos T CD4+ con menos de 100 cél/mL. (20)

IV. CONCLUSIONES

Este estudio constituye el primero realizado en Cuba donde se compara la MF-LED con la tinción de ZN en muestras de esputo en PVVS ZN donde se demuestra las ventajas y mayor sensibilidad de esta herramienta. El mayor rendimiento esta técnica, recomendada por OPS/OMS, sugiere que puede ser utilizada como alternativa a la tinción de ZN y formar parte del algoritmo para el diagnóstico bacilosκόpic de la TB en el LNRI-TBLM del IPK, lo que permitirá incrementar detección de casos con TB pulmonar BK (+) en PVVS, sobre todo en los pacientes con conteo de Linfocitos T CD4+ bajos. La divulgación de estos resultados contribuirá a la introducción de esta técnica de forma gradual en laboratorios regionales de país con alta carga de trabajo que contribuirá al avance hacia la eliminación de la enfermedad, en el marco de la Estrategia Mundial de la Eliminación de la TB para 2035.

REFERENCIAS

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
2. Vallego VP, Rodriguez JC, Searle MA, Farga CV. Ensayo Xpert/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir 2015; 31(2):127-31.
3. Martínez Romero MR, Pedrera Pozo N, García León GC, Sardiñas Aragón M, Mederos Cuervo LM, Díaz Rodríguez R. Validación de la microscopía de fluorescencia LED para el diagnóstico de tuberculosis en Cuba. Rev CENIC Cienc Biol 2021; 52(2): 259-66.
4. Imaz M, Allasia S, Aranibar M, Gunia A, Susana Poggi S, Togneri A. Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina. Bioméd 2017; 37(2):164-74.
5. Goel S, Pandey R, Kumar M, Kankaria A, Khaneja R. Impact of introducing light-emitting diode fluorescence microscopy services for diagnosis of pulmonary tuberculosis under Revised National Tuberculosis Control Program India. Lung India 2018;35:307-11.
6. World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. Policy statement 2011. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2011.8. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44602>

7. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275324479>.

8. Díaz Rodríguez R, Lemus Molina D, Martínez Romero MR. La tuberculosis en Cuba en tiempos de COVID-19: ¿retroceso en su plan de eliminación?. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2020 [citado 2022 Feb 17];72(3): e585. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300014&lng=es. Epub 08-Feb-2021.

9. OMS. Perfil de tuberculosis: Cuba, 2020. Disponible en: https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22CU%22.

10. Minion J, Pai M, Ramsay A, Menzies D, y Greenaway C. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid fast bacilli in a low-incidence setting. *PLoS ONE* 2011;6(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811622>.

11. ORAS – CONHU, (2018). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: manual de actualización de la baciloscopía, Lima, Perú. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-para-diagnostico-bacteriologico-tuberculosis-parte-1-manual-actualizacion>

12. 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.

13. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33(1):159-74.

14. Kuhn W, Armstrong D, Atteberry S, Dewbrey E, Smith D, Hooper N. Usefulness of the Paralens™ fluorescent microscope adaptor for the identification of mycobacteria in both field and laboratory settings. *The Open Microbiol J*. 2010; 4:30-3.

15. Minion J, Pai M, Ramsay A, Menzies D, y Greenaway C. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid fast bacilli in a low-incidence setting. *PLoS ONE* 2011;6(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811622>

16. Chaidir L, Parwati I, Annisa J, Muhsinin S, Meilana I, Alisjahbana B, et al. Implementation of LED fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary and HIV-associated tuberculosis in a hospital setting in Indonesia. *PLoS One* 2013;8(4):e61727. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23620787/>

17. Cerda J y Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica. *Rev Chil Infect* 2012; 29(2):138-41.

18. Noda Albelo AL, Tallet LA, Pérez Lastre JE, Cañete Villafranca R. Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. *Rev Cub de Medic* 2013; 52(2):118-27.

19. Vásquez Y, Ilarraza J, Ruiz N, Benitez M, Moy F. Coinfección tuberculosis y VIH/sida, en el Hospital Militar “Dr. Carlos Arvelo”. *Bol Venez Infectol* 2017; 28(1):66-74.

20. Albert H, Nakiyingi L, Sempa J, Mbabazi O, Mukkada S, Nyesiga B, et al. Operational implementation of LED fluorescence microscopy in screening tuberculosis suspects in an urban HIV clinic in Uganda. *PLoS One*. 2013; 8(9):e72556. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3765165/>