

ISSN 0120-4157

# Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

## PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

### Citación provisional:

**Arteta AA, Arias LF, Cadavid CE.** Coloración de Ziehl-Neelsen en el laboratorio de patología, rendimiento y aporte diagnóstico en lavado broncoalveolar.

*Biomédica*. 2022;42 (3).

Recibido: 06-11-21

Aceptado: 04-05-22

Publicación en línea: 09-05-22

**Coloración de Ziehl-Neelsen en el laboratorio de patología, rendimiento y aporte diagnóstico en lavado broncoalveolar**

**Ziehl-neelsen stain in the pathology lab, performance and diagnostic aid in bronchoalveolar lavage**

**Coloración de Ziehl-neelsen en lavado broncoalveolar**

Ariel A. Arteta <sup>1,2</sup>, Luis F. Arias <sup>1,2,3</sup>, Claudia E. Cadavid <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigaciones en Patología, Universidad de Antioquia Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Laboratorio Clínico, Área de Microbiología Clínica, Hospital San Vicente fundación, Medellín, Colombia

Correspondencia:

Ariel Antonio Arteta, Departamento de Patología, Universidad de Antioquia, Calle 67 # 53-108, Medellín, Colombia.

Tel: +57 4 2192409

ariel.arteta@udea.edu.co

Contribución de los autores:

Ariel A. Arteta y Luis F. Arias: se encargaron de la revisión de las láminas histológicas.

Claudia E. Cadavid revisó los datos de los resultados de las pruebas en el laboratorio clínico.

Todos los autores participaron en el diseño del estudio y en la escritura del manuscrito.

Introducción. La coloración de Ziehl-Neelse, con más de 100 años de uso, continua vigente mundialmente.

Objetivo. Comparar el rendimiento de las pruebas diagnósticas utilizadas para la determinación de micobacterias en el laboratorio clínico y de patología en especímenes de lavado broncoalveolar.

Materiales y métodos. Se revisaron retrospectivamente 737 especímenes de lavado broncoalveolar en el Hospital San Vicente Fundación (Medellín – Colombia), procesados en los años 2019 y 2020, comparando las características de tres pruebas diagnósticas realizadas en paralelo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para micobacterias y detección de resistencia, cultivo y coloración de Ziehl-Neelse, esta última realizada en el laboratorio de patología.

Resultados. 93/737 pacientes fueron catalogados como enfermos, ante la positividad de alguna de las tres pruebas. El cultivo, la PCR y la coloración de Ziehl-Neelse, tuvieron una sensibilidad de 0.80, 0.76 y 0.51, respectivamente. Sin embargo, sólo 5/75 (6.5%) de los cultivos positivos, tuvieron este resultado a las cuatro semanas y el resto a las ocho semanas. La realización de la prueba de PCR con la coloración de Ziehl-Neelse en paralelo mejoró la sensibilidad de la PCR por sí sola, de 0.76 a 0.88, diferencia que fue estadísticamente significativa ( $p = 0.022$ )

Conclusión. Al menos en los especímenes de lavado broncoalveolar, el cultivo sigue siendo la prueba con mejor sensibilidad. El uso en paralelo de la prueba de PCR y Ziehl-Neelse mejora significativamente la sensibilidad de la PCR, si esta última se realizara de manera solitaria, a pesar del relativo mayor tiempo en la entrega del resultado de la coloración de Ziehl-Neelse.

Palabras clave: tuberculosis/diagnóstico; lavado broncoalveolar; sensibilidad y especificidad; Colombia.

Introduction: With more than 100 years of use, the Ziehl-Neelsen stain is still current used worldwide

Objective: To compare the performance of the diagnostic test use to demonstrate mycobacteria in the clinic and pathology lab, in bronchoalveolar lavage samples

Materials and methods: We retrospectively review 737 bronchoalveolar lavage samples from 2019 to 2020 in the San Vicente Fundación hospital (Medellín – Colombia), comparing the performance of three test done in parallel, mycobacteria PCR, culture and the Ziehl-Neelsen stain, the latter done in the pathology lab.

Results: 93/737 patients were classified as sick, due the positivity in any of the three test. Culture, PCR and the Ziehl-Neelsen stain had a sensibility of 0.80, 0.76 y 0.51, respectively. However, only 5/75 (6.5%) of the positive cultures, had a positive results within the first four weeks and the rest in eight weeks. The combined PCR test and Ziehl-Neelsen stain in parallel, improved the sensibility of the PCR test alone from 0.76 a 0.88, change that was statistically significant ( $p = 0.022$ ).

Conclusion: At least in bronchoalveolar lavage samples, culture is still the test with better sensibility. The use in parallel of the PCR test and the Ziehl-Neelsen stain improved in a statistically significant manner the PCR test perform alone, nevertheless the higher turnaround time of the Ziehl-Neelsen stain.

Keywords: Tuberculosis/diagnosis; bronchoalveolar lavage; sensitivity and specificity; Colombia.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad contagiosa, crónica granulomatosa, potencialmente mortal, causada por bacterias Gram-positivas, ácido-alcohol resistentes, del género *Mycobacterium* que en los humanos afecta predominantemente los pulmones (1). Durante la historia de la humanidad TB ha tenido cambios en su incidencia. La enfermedad se presentaba de manera esporádica hasta el siglo 18, incrementando el número de casos durante la revolución industrial, posiblemente debido al el incremento en la densidad poblacional y la diseminación de condiciones de vida desfavorables (2), para luego disminuir con la introducción de la vacuna en 1921 y el descubrimiento y desarrollo de medicamentos antimicrobianos efectivos contra la infección (3). Colombia es un país cuyas condiciones sociales y económicas desfavorables, favorecen la presentación de TB. TB es la novena causa de muerte en el mundo y la primera causa de muerte por un único agente infeccioso, exceptuando pandemias, con cerca de 1.2 millones de muertes para 2019 en pacientes HIV (-) y 208 000 muertes en pacientes HIV(+) (4). Para el año 2018 en Colombia, se reportaron 14 436 casos de todas las formas de TB, estimándose una incidencia de 26.9 x 100 000 habitantes. La forma de TB pulmonar representó la mayoría de los casos con 82.7% (n= 11 940 casos), y la coinfección de TB-VIH el 9.7% (n=1336 casos). La tasa de incidencia de TB en Colombia muestra una clara tendencia al alza en los últimos 6 años, pasando de 23 x 100 000 habitantes en 2013 a 26.9 x 100 000 en 2018 (4). Esta tendencia al alza puede ser inclusive mayor en la actualidad, por factores como el incremento relativo de la población en situación de vulnerabilidad, el incremento en la población en condición de pobreza y desnutrición, el aumento de migrantes de países vecinos y de habitantes de calle, entre otras.

Pero no sólo las condiciones sociales aumentan la incidencia de TB, en la actualidad el control inmunológico de la primoinfección está siendo puesto a prueba por situaciones como el incremento en el número de pacientes HIV (+), el uso de esteroides como parte del tratamiento para la infección por SARS-Cov-2, la multiresistencia de las micobacterias y el uso de medicamentos inmunosupresores en pacientes trasplantados o como parte del tratamiento de enfermedades reumatológicas y neoplásicas (5-8). Por esto, necesitamos de abordajes diagnósticos que nos permitan la demostración rápida y precisa de la micobacteria, mediante técnicas de laboratorio que resulten complementarias. En Colombia la definición operativa de caso de TB, está contemplada en la resolución 227 de 2020 del ministerio de salud y protección social. Esta resolución, define la categoría de caso confirmado en 3 tipos; 1) Confirmado por laboratorio: resultado positivo para alguna de las pruebas de laboratorio (coloración de ZN, cultivo o prueba molecular), 2) Confirmado por clínica: caso en el que las pruebas de laboratorio son negativas, pero los hallazgos clínicos, radiológicos e histopatológicos son sugestivos de la enfermedad y el paciente responde positivamente a la prueba terapéutica y 3) Confirmado por nexo epidemiológico: caso que a pesar de tener pruebas bacteriológicas negativas, ha tenido contacto estrecho con un pacientes diagnosticado con TB y que tiene hallazgos clínicos, radiológicos e histopatológicos sugestivos de la enfermedad además de respuesta positiva a la prueba terapéutica (4).

Una de las coloraciones más utilizadas en el mundo para confirmar la presencia de micobacterias es la coloración de Ziehl-Neelsen (ZN) (figura 1.) (9). Desde hace algún tiempo dentro del laboratorio de patología y como parte del procedimiento estándar de operación, se realiza de manera sistemática la



coloración de Ziehl-Neelsen a todos los especímenes de lavado bronco-alveolar (LBA) que se reciben. Muy pocos estudios locales han analizado este tema en muestras de LBA, encontrando una sensibilidad y especificidad para la PCR de 100% y 99% respectivamente, ubicando a la PCR como el “Gold Standard” (10). A pesar de esto, los resultados de cual prueba es el “Gold Standard” para la detección de micobacterias en LBA son contradictorios entre la PCR y el cultivo, lo cual puede ser un reflejo de la variabilidad de las técnicas en las fases preanalíticas y analíticas. Los autores consideramos que antes de definir una de las pruebas como el “Gold Standard”, y que los resultados de las pruebas sean mutuamente excluyentes, para el caso de la detección de micobacterias en LBA, en el contexto clínico de pacientes sintomáticos respiratorios, tal cual lo define la resolución 227 de 2020 del ministerio de salud y protección social, las pruebas son complementarias. Adicionalmente, la definición operativa de caso de TB en Colombia define que la positividad debe ser en “alguna” de las pruebas, sin especificar una en particular.

Teniendo esto en cuenta, diseñamos este estudio con el objetivo de comparar las características, como método diagnóstico, de la coloración de Ziehl-Neelsen realizada en el laboratorio de patología, con la prueba de PCR y cultivo que se realiza en el laboratorio clínico de manera paralela, en especímenes de LBA.

## **Materiales y métodos**

### ***Identificación de casos***

Inicialmente se identificaron todos los especímenes de lavado bronco-alveolar (LBA), que fueron enviados al laboratorio clínico para estudio de cultivo y PCR con la finalidad de la identificación del complejo *M. tuberculosis* y detección de genes de resistencia, en los años 2019 y 2020, identificándose 1308 pacientes

(figura 2). De estos 1308 pacientes, sólo fueron incluidos los pacientes que además de PCR y cultivo en el laboratorio clínico, tenían parte de este LBA enviado al laboratorio de patología para análisis citológico, más estudio complementario con coloración de Ziehl-Neelsen. Fueron excluidos menores de 18 años, pacientes con muestras no satisfactorias y aquellos pacientes que no tenían las 3 pruebas diagnósticas a partir del mismo espécimen de LBA, producto del mismo procedimiento. De los 1308 pacientes iniciales y luego de utilizar los criterios de inclusión y exclusión para cumplir con el objetivo del estudio, se analizaron 737 pacientes. Las proporciones de las características clínicas de los pacientes se compararon utilizando la prueba de  $\chi^2$  de Pearson, con un intervalo de confianza de 0.95, considerando significativo un valor de  $p < 0.05$ . Las pruebas diagnósticas fueron comparadas en términos de sensibilidad, especificada y razones de verosimilitud, con un intervalo de confianza de 0.95 dado el caso. Además, calculamos la sensibilidad de las pruebas utilizadas en serie y en paralelo. Todos estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software R versión 4.0.3 (2020-10-10) con el paquete DTComPair.

### ***Coloración de Ziehl-Neelsen***

La coloración de ZN en el laboratorio de patología se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos de coloraciones especiales del Laboratorio de Patología de la Universidad de Antioquia. Los especímenes de lavado bronco-alveolar, sin importar su cantidad se llevan a la citocentrífuga (Cytospin®) a 600 rpm durante 5 minutos hasta obtener los extendidos para la coloración de rutina y coloraciones especiales. Para la coloración de ZN, brevemente, las láminas fueron colocadas sobre una rejilla y el botón de células fue cubierto con papel

filtro previa aplicación del carbón fucsina. Luego las láminas fueron flameadas hasta lograr la emanación de vapores y se lavaron con agua corriente.

Después de esto se aplicó alcohol ácido al 1% hasta obtener un color rosado, pálido. Nuevamente se lavaron con agua corriente y se aplicó azul de metileno al 1% por 1 minuto. Las placas fueron lavadas por última vez con agua corriente previo al montaje de la laminilla cubre objeto.

### ***Reacción en cadena de la polimerasa para micobacterias***

Se realizó pretratamiento de las muestras clínicas, extracción del material genético y preparación de la mezcla maestra para PCR multiplex de forma manual siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pasos de amplificación y generación de curvas fusión fueron realizados en el instrumento de PCR en tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad). Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene, Corea, Seúl), que detecta *M. tuberculosis* (IS6110 y MPT64) y resistencia a isoniacida (*katG*, región promotora *inhA*), rifampicina (*rpoB*), fluorquinolonas (*gryA*) y aminoglucósidos (regiones promotoras *rrs* y *eis*). Los análisis de los datos de la curva de fusión se realizaron automáticamente y se interpretaron a través del software de visualización Seegene, versión 2.0 (Seegene Technologies, EE. UU.), utilizando valores de umbral y de corte predefinidos. En las reacciones se incluyó un control interno (IC) con controles de amplificación positivos y negativos. El tiempo de respuesta de la detección fue de aproximadamente 4 horas.

### ***Cultivo para micobacterias***

Cada muestra fue cultivada en medio líquido y en medio sólido. Las muestras para cultivo se concentraron por centrifugación durante 30 minutos, se procesaron por el método estándar N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sodio al

2% (NALC-NaOH) durante 15 minutos a temperatura ambiente (11), seguido de centrifugación por 15 minutos a 3000 x g y resuspensión en buffer fosfato pH 6.8, el cultivo líquido MGIT se inoculó con 500 µL de muestra y 800 µL de PANTA+ OADC BD® (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina) y se incubó por 56 días en el equipo BACTEC MGIT 960, según las instrucciones del fabricante (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA). El cultivo sólido se realizó en medios Lowenstein-Jensen (BBD, Becton-Dickinson) agregando 200 µL de muestra, incubando durante 8 semanas en posición horizontal.

### ***Consideraciones éticas***

Se trata de un estudio cuantitativo, no experimental, descriptivo, retrospectivo, que fue aprobado por el comité de ética institucional, del Hospital San Vicente Fundación. Todos los pacientes incluidos en el estudio residen en Colombia y son mayores de edad.

### **Resultados**

De los 737 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, 93 pacientes tuvieron por lo menos una de las 3 pruebas positivas, Ziehl-Neelsen en el laboratorio de patología, PCR o cultivo en el laboratorio clínico, que se acompañó de respuesta al tratamiento con desaparición de la sintomatología motivo de consulta y datos bacteriológicos de acuerdo con el anexo 3 de la resolución resolución 227 de 2020 del ministerio de salud y protección social. Bajo este concepto, de integración de datos de laboratorio y respuesta clínica al tratamiento, la positividad del total de los pacientes del estudio fue de 12.6%. De estos 93 pacientes con al menos una prueba positiva (cuadro 1.), 43 (46.2%) eran mujeres y 50 (53.8%) hombres. La edad media de

las mujeres fue de 45 años y la de los hombres fue de 46.3 años. De los 93 pacientes positivos, 18 pacientes (19.3%) eran HIV positivos, estos últimos con edad promedio de 37.5 años. De los pacientes HIV positivos 16 eran hombres. La diferencia en la proporción de hombres y mujeres positivos para HIV fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a la positividad de las pruebas, las 3 pruebas fueron positivas en 39/93 pacientes. El cultivo fue positivo en 75/93 (80.6%) de los pacientes enfermos con una positividad general de 75/737 (10.1%). Analizando la positividad del cultivo en los pacientes HIV positivos, 17/18 (94.4%) de los pacientes HIV positivos tuvieron cultivos positivos. Para el caso de la PCR, esta prueba fue positiva en 70/93 (75.2%) de los pacientes enfermos, para una positividad global de 70/737 (9.5%) y en cuanto a la relación con los pacientes HIV positivos, 15/18 (83.3%) tuvieron positividad en esta prueba. La coloración de ZN en el laboratorio de patología fue positiva en 47/93 (50.5%) de los pacientes enfermos, para una positividad global de 47/737 (6.37%) y en la población de pacientes HIV positivos en 12/18 (66.6%). Sólo se presentó un caso, de un paciente de 23 años HIV negativo, en el cual el cultivo y la PCR fueron negativos y la coloración de ZN en el laboratorio de patología fue positiva.

El tiempo de entrega de los resultados fue variable. Sólo 5/75 (6.5%) de los pacientes con cultivos positivos tuvieron positividad en las primeras cuatro semanas y el resto a las ocho semanas. En cuanto al tiempo de entrega de la PCR para micobacterias, este tiene un tiempo máximo de entrega de 4 horas, el cual es medido con un indicador de cumplimiento por parte del laboratorio clínico, indicador que usualmente se encuentra en 99.9% de cumplimiento.

Para la coloración de ZN, por la dinámica de trabajo del laboratorio de patología que usualmente no realiza coloraciones especiales en fines de semana, ni festivos, el tiempo promedio de entrega del resultado fue de 3.3 días.

Comparando las características de las pruebas, y tomando el total de enfermos detectados en conjunto por las tres pruebas (N=93) (cuadro 2), cuando comparamos los resultados del cultivo con el total de enfermos, la sensibilidad del cultivo es de 0.80, con una especificidad de 1.0, razón de verosimilitud positiva de 1.0 y razón de verosimilitud negativa de 0.19. Haciendo el mismo ejercicio para el caso de la PCR, la sensibilidad de la prueba es de 0.76, con una especificidad de 1.0, razón de verosimilitud positiva de 1.0 y razón de verosimilitud negativa de 0.24. Para la coloración de ZN, la sensibilidad de la coloración es de 0.51, la especificidad de 1.0, la razón de verosimilitud positiva de 1.0 y razón de verosimilitud negativa de 0.49.

Al comparar la positividad de las pruebas (cuadro 3), contrastando los resultados del cultivo y la PCR, de los 75/93 resultados positivos obtenidos en el cultivo, 53 de estos resultados positivos en el cultivo también fueron positivos en la PCR, 22 de los positivos en el cultivo fueron negativos en la PCR, y de los resultados negativos de los cultivos, 17 fueron positivos en la PCR y un resultado fue negativo en ambos. Comparando el cultivo con la coloración de ZN, de los 75/93 resultados positivos obtenidos en el cultivo, 44 fueron también positivos en la coloración de ZN, 31 de los resultados positivos en el cultivo fueron negativos en la coloración de ZN, y de los resultados negativos en el cultivo tres casos fueron positivos en la coloración de ZN y 15 casos fueron negativos en ambos. Cuando analizamos los resultados positivos de la PCR

70/93, vemos que de los resultados positivos en la PCR 41 fueron positivos en la coloración de ZN, 29 negativos, y de los resultados negativos, 6 fueron positivos en la coloración de ZN y 17 fueron negativos en ambos. La utilidad de las tres pruebas, utilizadas en serie y en paralelo se analizó utilizando la sensibilidad de la combinación de estas. La sensibilidad en serie y en paralelo del cultivo y de la PCR fue de 0.60 y 0.95 respectivamente, del cultivo y de la coloración de ZN fue en serie de 0.40 y en paralelo 0.90 y de la PCR y la coloración de ZN fue en serie de 0.38 y en paralelo de 0.88. Al comparar los valores de sensibilidad de los cultivos en paralelo y la mejora de la sensibilidad en las diferentes combinaciones (cuadro 4), obtenemos valores estadísticamente significativos para la combinación de Cultivo – PCR y de PCR - ZN.

## **Discusión**

La positividad de las distintas pruebas diagnósticas para la demostración de micobacterias tiene diferentes características dependiendo del tipo de espécimen. Usualmente el cultivo es considerado como el “Gold Standard” para el diagnóstico de TB, y efectivamente en nuestro estudio fue la prueba con mayor positividad (75/93) y sensibilidad 0.80. Sin embargo, 17 pacientes con cultivos negativos tuvieron positividad en la PCR y un paciente fue negativo en el cultivo y en la PCR, pero positivo en la coloración de ZN, lo que resalta la complementariedad de la realización de las pruebas en paralelo.

Adicionalmente, la sensibilidad en la combinación de PCR y coloración de ZN aumenta la sensibilidad en la combinación de pruebas, de la sensibilidad unitaria de la PCR de 0.76 a 0.88 cuando se usan las 2 pruebas, diferencia que es estadísticamente significativa. Resaltamos especialmente la combinación de

estas 2 pruebas, por el tiempo en que se podrían obtener los 2 resultados de estas y el bajo costo de la coloración de ZN, ante la muy baja positividad del cultivo en las primeras 4 semanas (6.5%).

La sensibilidad general de la prueba para el caso de las muestras de esputo varía entre 20-60% y para el caso de LBA en algunos estudios no supera el 20% (12), entendiendo que la positividad global de las pruebas depende de la prevalencia de la enfermedad en el grupo especial de estudio. Análisis recientes en Egipto, en cuanto a sensibilidad de las coloraciones para bacilos ácido alcohol resistentes teniendo al cultivo como “Gold Standard”, obtuvieron resultados de sensibilidad de 72.1% y especificidad de 83.1% (13). La positividad global de nuestros resultados, presentan notable variabilidad al compararlos con un estudio en Pakistán, donde a partir de muestras pulmonares se obtuvo una positividad de 49.7% para la PCR, 47.8% para el cultivo y 40% en la coloración de ZN, estudio en el cual la PCR obtuvo mayor positividad que el cultivo pudiéndose considerar como el “Gold Standard” (14). Específicamente en LBA, un estudio con procesamiento por Cytospin y modificación del método de la coloración de ZN, obtuvo una sensibilidad de la coloración de entre 16.2%-37.8%, muy por debajo de la sensibilidad de nuestro estudio (15).

La explicación de la variabilidad en los resultados de las pruebas, especialmente en cuanto a positividad global y sensibilidad puede deberse a múltiples factores. Factores preanalíticos relacionados con la conservación y transporte de las muestras, pueden afectar los resultados de las técnicas de detección, así como la preparación y conservación de los reactivos para la coloración de ZN, la concentración de las soluciones y factores analíticos como



la experticia del personal que realiza la interpretación de los extendidos (16). Además, la sensibilidad de la prueba está relacionada con la cantidad de bacilos en la muestra, estimándose entre 5000-10000 bacilos por mililitro como el umbral necesario para la positividad de la coloración ZN (17), umbral que se puede ver afectado por la fragmentación de la muestra para poder realizar las tres pruebas en paralelo que se realizan usualmente. Agravando el problema de sensibilidad, los casos de niños y pacientes coinfectados con HIV tienen menores concentraciones de bacilos por mililitro (paucibacilares), por lo cual la coloración de ZN pierde rendimiento en este tipo de pacientes (18,19).

Se necesitan más estudio comparando los especímenes de las diferentes localizaciones anatómicas y las pruebas diagnósticas locales disponibles para la detección de micobacterias, para a través de estos, conocer las limitaciones y bondades de cada una de las pruebas y de su fortaleza al realizarlas en paralelo.

Como conclusión, la realización de la PCR para micobacterias y la coloración de ZN en paralelo, mejora de una manera estadísticamente significativa, la sensibilidad en la detección de micobacterias en especímenes de LBA, y es una estrategia aplicable debido a la relativa rápida obtención de los resultados de PCR y de la coloración de ZN, esta última en comparación con el cultivo, agregándose el bajo costo en general de la coloración de ZN.

### **Conflictos de interés**

Ninguno para declarar.

### **Financiación**

Universidad de Antioquia

## Referencias

1. Khan MK, Islam MN, Ferdous J, Alam MM. An overview on epidemiology of tuberculosis. *Mymensingh Med J.* 2019;28:259–66.
2. Pezzella AT. History of pulmonary tuberculosis. *Thorac Surg Clin.* 2019;29:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.09.002>
3. Bañuls A-L, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *J Med Microbiol.* 2015;64:1261–9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
4. Fadul S. Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública protocolo de vigilancia en salud pública tuberculosis farmacoresistente. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2019.
5. Rodríguez-Castillo JG, Llerena C, Argoty-Chamorro L, Guerra J, Couvin D, Rastogi N, et al. Population structure of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Colombia. *Tuberculosis (Edinb).* 2020;125:102011. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102011>
6. Santos-Pereira A, Magalhães C, Araújo PMM, S Osório N. Evolutionary Genetics of *Mycobacterium tuberculosis* and HIV-1: “The Tortoise and the Hare.” *Microorganisms.* 2021;9:147. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010147>
7. Gopaldaswamy R, Subbian S. Corticosteroids for COVID-19 therapy: potential implications on tuberculosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22:3773. <https://doi.org/10.3390/ijms22073773>
8. Anastasopoulou A, Ziogas DC, Samarkos M, Kirkwood JM, Gogas H. Reactivation of tuberculosis in cancer patients following administration of immune checkpoint inhibitors: current evidence and clinical practice

- recommendations. *J Immunother Cancer*. 2019;7:239.  
<https://doi.org/10.1186/s40425-019-0717-7>
9. Naranjo PJ de, Rodríguez G, A JR, Caldas ML. La coloración de Ziehl-Neelsen en histopatología. *Biomédica*. 1988;8:84-93.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v8i3-4.1964>
  10. Rincón-Caballero OL, Cano-Romero MA, Aristizábal-Bernal BH. Diagnóstico de tuberculosis pulmonar en lavado broncoalveolar: desempeño de la PCR en comparación con las pruebas microbiológicas de rutina. *Med Lab*. 2017;23:475–84. <https://doi.org/10.36384/01232576.26>
  11. Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1991. p. 1384.
  12. Bodal VK, Bal MS, Bhagat S, Kishan J, Deepika, Brar RK. Fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen staining of bronchoalveolar lavage, bronchial washings, bronchoscopic brushing and post bronchoscopic sputum along with cytological examination in cases of suspected tuberculosis. *Indian J Pathol Microbiol*. 2015;58:443–7.  
<https://doi.org/10.4103/0377-4929.168849>
  13. Elbrolosy AM, El Helbawy RH, Mansour OM, Latif RA. Diagnostic utility of GeneXpert MTB/RIF assay versus conventional methods for diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *BMC Microbiol*. 2021;21:144.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02210-5>
  14. Iram S, Zeenat A, Hussain S, Wasim Yusuf N, Aslam M. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - Report from a developing

country. Pak J Med Sci. 2015;31:105–10.

<https://doi.org/10.12669/pjms.311.6970>

15. Zheng L-H, Jia H-Y, Liu X-J, Sun H-S, Du F-J, Pan L-P, et al. Modified cytospin slide microscopy method for rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20:456-61.  
<https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0733>
16. Van Deun A, Hamid Salim A, Aung KJM, Hossain MA, Chambugonj N, Hye MA, et al. Performance of variations of carbolfuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9:1127-33.
17. Tuberculosis Division International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Tuberculosis bacteriology--priorities and indications in high prevalence countries: position of the technical staff of the Tuberculosis Division of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9:355–61.
18. Karstaedt AS, Jones N, Khoosal M, Crewe-Brown HH. The bacteriology of pulmonary tuberculosis in a population with high human immunodeficiency virus seroprevalence. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2:312–6.
19. Khan EA, Starke JR. Diagnosis of tuberculosis in children: increased need for better methods. *Emerg Infect Dis*. 1995;1:115–23.  
<https://doi.org/10.3201/eid0104.950402>

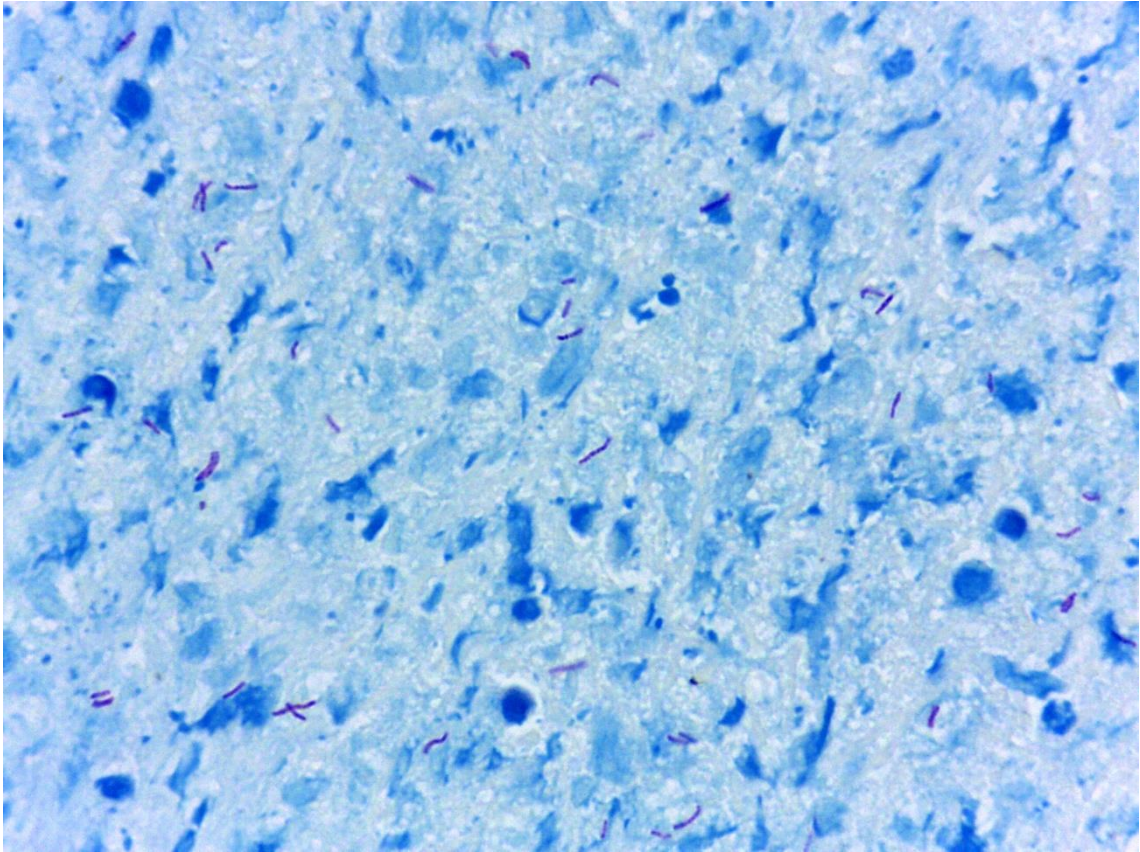


Figura 1. Coloración de Ziehl-Neelsen (100x)

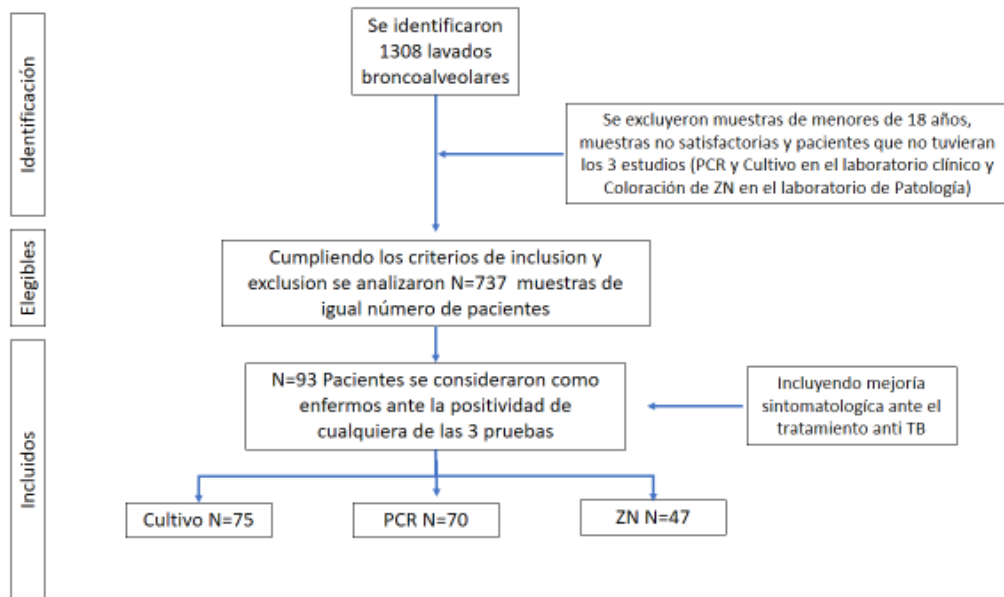


Figura 2. Diagrama de flujo representando los criterios de inclusión y exclusión, y el número de casos identificados, elegibles e incluidos en el análisis. TB: Tuberculosis.

Cuadro 1. Características de los Pacientes Catalogados como Enfermos y de las Pruebas Diagnósticas (N=93)

	Hombres	Mujeres	Valor de p
N=93	50 (53.8%)	43 (46.2%)	0.30
Edad Promedio	46.3	45	0.736
HIV			*0.0008
HIV Positivo (N=18)	16	2	
HIV Negativo (N=75)	34	41	
Cultivo			0.86
Cultivo Positivo (N=75)	40	35	
Cultivo Negativo (N=18)	10	8	
PCR			0.86
PCR Positiva (N=70)	38	32	
PCR Negativa (N=23)	12	11	
ZN			0.59
ZN Positivo (N=47)	24	23	
ZN Negativo (N=46)	26	20	

PCR: reacción en cadena de la polimerasa para micobacterias, ZN: coloración de Ziehl-Neelsen

Cuadro 2. Resultados de las Distintas Pruebas Diagnóstica en los Pacientes Enfermos (N=93)

		Enfermos		
		(+)	(-)	Total
Cultivo	Positivo	75	0	75
	Negativo	18	644	662
		93	644	737

		Enfermos		
		(+)	(-)	
Zn	Positivo	47	0	47
	Negativo	46	644	690
		93	644	737

		Enfermos		
		(+)	(-)	
PCR	Positivo	70	0	70
	Negativo	23	644	667
		93	644	737

PCR: reacción en cadena de la polimerasa para micobacterias, ZN: coloración de Ziehl-Neelsen



Cuadro 3. Comparación de Resultados Positivos entre las Pruebas

		PCR		
		(+)	(-)	Total
Cultivo	Positivo	53	22	75
	Negativo	17	1	18
		ZN		
		(+)	(-)	
PCR	Positivo	41	29	70
	Negativo	6	17	23
		ZN		
		(+)	(-)	
Cultivo	Positivo	44	31	75
	Negativo	3	15	18

PCR: reacción en cadena de la polimerasa para micobacterias, ZN: coloración de Ziehl-Neelsen

Cuadro 4. Comparación de Sensibilidad de las Pruebas

	Serie	Paralelo	Sensibilidad Cultivo	Sensibilidad PCR	Sensibilidad ZN	Valor de p
PCR - Cultivo	0.60	*0.95	*0.80	0.76	NA	0.037
ZN - Cultivo	0.40	*0.90	*0.80	NA	0.51	0.061
PCR - ZN	0.38	*0.88	NA	*0.76	0.51	0.022

PCR: reacción en cadena de la polimerasa para micobacterias, ZN: coloración de Ziehl-Neelsen. \* Señala los 2 valores comparados para la obtención del valor de p