



MINISTERIO
DE SALUD

Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico

San Salvador, El Salvador 2023



MINISTERIO
DE SALUD

Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico

San Salvador, El Salvador 2023

2023 Ministerio de Salud



Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)

Está permitida la reproducción parcial o total de esta obra por cualquier medio o formato, siempre que se cite la fuente y que no sea para la venta u otro fin de carácter comercial. Debe dar crédito de manera adecuada. Puede hacerlo en cualquier formato razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen apoyo de la licencia.

La documentación oficial del Ministerio de Salud, puede Consultarse en el Centro Virtual de Documentación Regulatoria en: <http://asp.salud.gob.sv/regulacion/default.asp>

Ministerio de Salud
Calle Arce No. 827, San Salvador. Teléfono: 2591 7000
Página oficial: <http://www.salud.gob.sv>

Autoridades

Dr. Francisco José Alabi Montoya
Ministro de Salud *Ad honorem*

Dr. Carlos Gabriel Alvarenga Cardoza
Viceministro de Gestión y Desarrollo en Salud *Ad honorem*

Dra. Karla Marina Díaz de Naves
Viceministra de Operaciones en Salud *Ad honorem*

Equipo técnico

Dr. Julio Garay Ramos Lic. René Guevara Hernández	Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Dr. Carlos Roberto Torres Dra. Mayra Sáenz de Hernández	Dirección de Regulación
Licda. Yanira Emperatriz Meléndez Cortez Lic. José Nelson Linares Rosales Licda. Norma Iris Pérez de Rodríguez Licda. Johanna Vanessa Acuña Durán Lic. Francisco Alberto Gutiérrez Blanco Licda. Mirna Guadalupe Godoy Rodríguez	Sección de Micobacterias. Laboratorio Nacional de Salud Pública
Licda. Ana Mirtala Velásquez Hernández	Región Central de Salud
Licda. Rosaura Guadalupe Sánchez Estrada	Hospital Nacional Rosales
Licda. Patricia Beatriz Marroquín García	Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS)
Licda. Patricia Leonor Marroquín Rodas	Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS)
Licda. Marlin Cristabel Renderos	SECOMISCA

Comité consultivo

Lic. Oscar Ernesto Mena Colocho Licda. Laura Lissette Arévalo Ávila	Región Occidental de Salud
Licda. Jaqueline Jiménez	Región Central de Salud
Licda. Ana María de Mendoza Lic. Manuel Enrique García Sandoval	Región Metropolitana de Salud
Licda. Herminia Vásquez Licda. Ana Gloria Martínez de Cerna	Región Paracentral de Salud
Lic. Carlos Esaú Viera Ascencio Licda. Xiomara Iveth Chávez	Región Oriental de Salud
Licda. María de los Ángeles López Salazar	Dirección General de Centros Penales
Licda. Celina del Carmen Herrera Casco Licda. Joselin Flores	Oficina de Laboratorio Clínico. MINSAL

Índice

Acuerdo	7
I. Introducción	8
II. Objetivos	8
III. Ámbito de aplicación	9
IV. Red de laboratorios	9
V. Contenido técnico:	10
1. Baciloscopía	10
2. Cultivo	24
3. Pruebas moleculares	40
4. Prueba LF-LAM	56
5. Bioseguridad	60
6. Control de calidad	66
7. Sistema de registro	72
VI. Disposiciones finales	74
VII. Vigencia	74
VIII. Abreviaturas y siglas	75
IX. Bibliografía	77
X. Anexos	79



San Salvador, 5 de mayo de 2023

Ministerio de Salud

Acuerdo n.º1047

El Órgano Ejecutivo en el Ramo de Salud

Considerando

- I. Que la *Constitución de la República*, en su artículo 65, determina que la salud de los habitantes constituye un bien público. El Estado y las personas están obligados a velar por su conservación y restablecimiento;
- II. Que el *Reglamento Interno del Órgano Ejecutivo*, en el artículo 42, numeral 2), define que compete al Ministerio de Salud: Dictar las normas y técnicas en materia de salud y ordenar las medidas y disposiciones que sean necesarias para resguardar la salud de la población;
- III. Que la *Ley del Sistema Nacional Integrado en Salud*, en los artículos 3 y 13 establecen que “El Sistema”, está constituido por las instituciones públicas y privadas que de manera directa e indirecta se relacionan con la salud, siendo el Ministerio de Salud, el ente rector del mismo, por lo que está facultado para coordinar, integrar y regular el mismo;
- IV. Que con fecha 15 de octubre del año 2019, se emitieron Lineamientos técnicos para el Diagnóstico y Control de la Tuberculosis en el Laboratorio Clínico, cuyas disposiciones técnicas requieren ser actualizadas para mejorar la toma de las diferentes pruebas de laboratorio clínico, a fin de contribuir al diagnóstico, control y tratamiento oportuno de la tuberculosis.

POR TANTO, en uso de las facultades legales, ACUERDA emitir los siguientes

Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico

I. Introducción

El Ministerio de Salud, implementa la actualización de documentos regulatorios que permitan potenciar el trabajo y estandarizar las técnicas que el personal de salud, desarrolla con el fin de mejorar la calidad del servicio brindado a la población.

El trabajo desarrollado en los laboratorios, es importante no solo por su rol en el diagnóstico de las enfermedades transmisibles como la tuberculosis, sino también en el control de la evolución del tratamiento de los pacientes, así como la evaluación epidemiológica y operacional. Tiene como función principal, la detección de fuentes de infección tuberculosa a través de métodos como pruebas moleculares, cultivo, baciloscopia y prueba de flujo lateral para lipoarabinomano (LF-LAM).

La elección de la técnica más conveniente y su estandarización permite la obtención de resultados comparables a lo largo de todo el país, además de facilitar la capacitación, así como la ampliación de la cobertura.

El propósito de los presentes lineamientos, es proporcionar al personal de laboratorio clínico del Sistema Nacional Integrado de Salud (SNIS) y de otras instituciones prestadoras de servicios de salud, información sobre los procedimientos técnicos aplicables para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis.

II. Objetivos

General

Establecer los criterios estandarizados para la realización de las diferentes pruebas de laboratorio clínico, a fin de contribuir al diagnóstico y control de la tuberculosis.

Específicos

1. Proporcionar al personal de laboratorio clínico los criterios técnicos administrativos que establezcan los procedimientos para la realización de las pruebas con estándares de calidad.
2. Estandarizar el informe de análisis de las pruebas y su notificación oportuna en los diferentes sistemas de información en los niveles correspondientes.
3. Fortalecer el cumplimiento de la normativa vigente de bioseguridad en el manejo y proceso de las muestras como medidas de control de infecciones para la protección del personal de salud y del medio ambiente.

III. Ámbito de aplicación

Están sujetos al cumplimiento de los presentes lineamientos técnicos, el personal del Sistema Nacional Integrado de Salud (SNIS).

IV. Red de laboratorios

Los servicios de laboratorio son más eficaces, cuando se integran en una red nacional de laboratorios de tuberculosis que debe involucrar a laboratorios del Sistema Nacional Integrado de Salud, incluyendo a los que prestan servicios en centros penitenciarios, laboratorios privados y de organizaciones no gubernamentales.

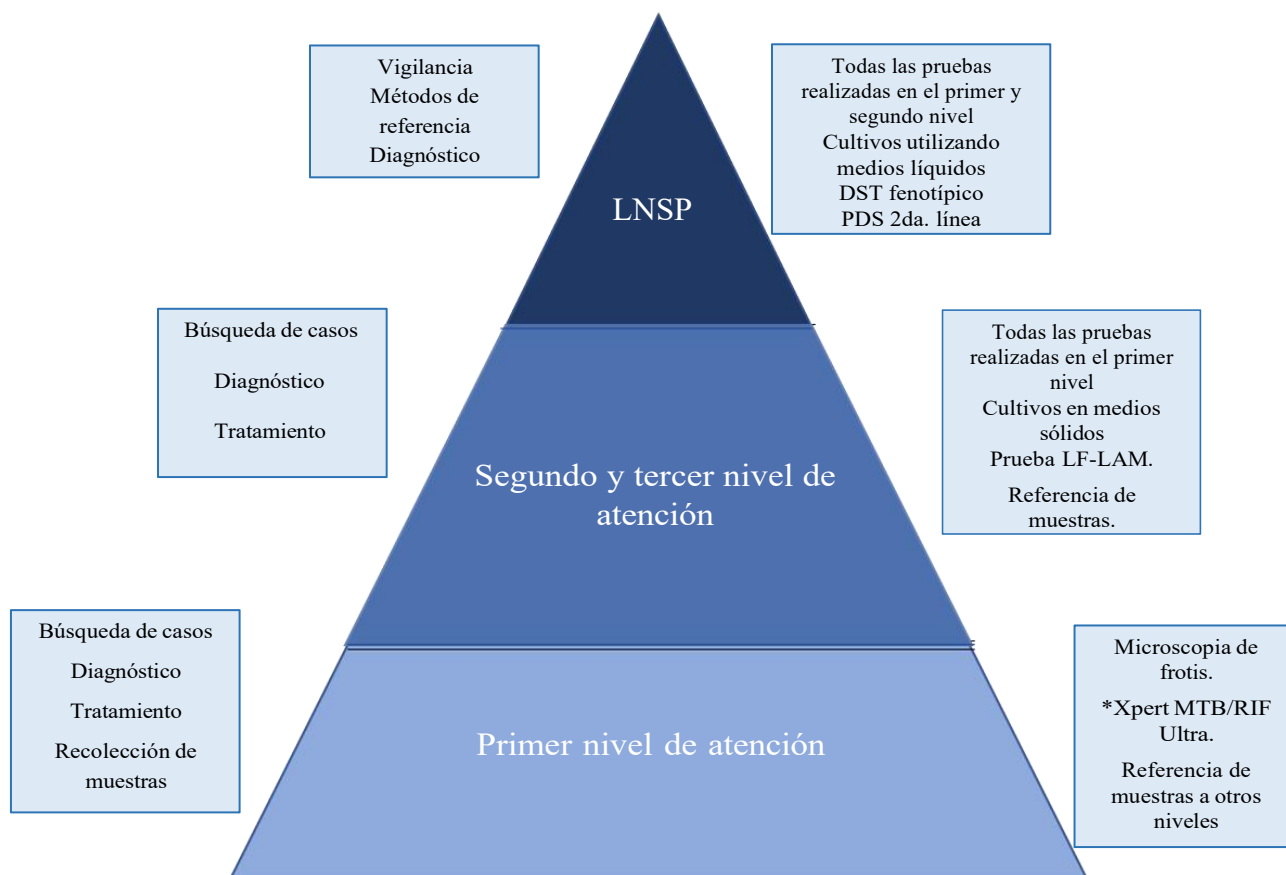
La conducción de esta red debe estar integrada en el nivel de programación de decisión de la Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UPCTYER), la que, a su vez, debe hacer las gestiones necesarias para sostener la organización y el funcionamiento de esta red de apoyo al diagnóstico y control de tratamiento de la tuberculosis, en coordinación con la Oficina de laboratorio clínico del MINSAL. Ver cuadro 1.

Cuadro 1. Número de laboratorios que realizan diferentes metodologías (Estos se ilustran por nivel de atención en la figura 1)

Método de diagnóstico	Establecimientos del MINSAL	Establecimientos del ISSS	Dirección General de Centros Penales	Sector Privado	Total
Baciloscopia	194	18	1	5	218
Cultivo Ogawa Kudoh	3	0	0	0	3
Cultivo Löweinsten Jensen	6	4	0	0	10
Prueba molecular para TB	12	0	1	0	13
Prueba LF-LAM	20	0	0	0	20

Fuente: Sección de micobacterias – LNSP, 2021

Figura 1. Organización de la red para diagnóstico de tuberculosis



* Solamente un establecimiento de primer nivel.

Fuente: adaptado del Documento Método de diagnóstico rápido para detectar la tuberculosis; Manual Operativo sobre la tuberculosis, 2020

V. Contenido técnico

1. Baciloscopía

Esta técnica se basa en la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared a la fucsina fenicada (de color fucsia) y retenerla aún con la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol, propiedad conocida como ácido alcohol resistencia. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente del ácido micólico, que poseen en la pared celular.

La baciloscopía detecta del 70 al 80% de los casos, por lo que es recomendada en los países con escasos recursos económicos. La baciloscopía es utilizada para realizar diagnóstico y control de tratamiento; el equipo, materiales y reactivos que se utilizan para el procesamiento se enlistan en el cuadro 2.

Equipo, materiales y reactivos

Cuadro 2. Equipo, materiales y reactivos para baciloscofia

Descripción	Cantidades
Equipo	
Microscopio binocular. Ver anexo 1	1
Reloj marcador de tiempo	1
Materiales	
Mechero de alcohol.	1
Bandeja metálica o varilla para coloración con soporte para láminas.	1
Frascos de vidrio ámbar para colorantes de 1,000 mililitros	3
Frascos gotero tapa esmerilada vidrio ámbar de 100 mililitros	3
Gradilla para láminas.	3
Envases plásticos de 35-50 mililitros.	1
Pinza o asa metálica para antorcha.	1
Embudos plásticos.	2
Frascos lavadores de 250 mililitros	3
Caja de baquelita de 100 porta láminas	2
Aplicadores de madera.	2 por BK
Lámina portaobjeto 3 x 1 pulgada esmerilada.	1 por BK
Plumón indeleble negro o azul.	1 por mes
Caja o pliegos de papel filtro.	2 por mes
Rollos de papel toalla o periódico.	2 por mes
Lapicero azul, negro y rojo.	3 por mes
Libro de registro de actividades de laboratorio - PCT- 4 (anexo 2).	1 al año o según necesidad
Paquete de fósforos.	2 por mes
Libreta de papel limpia lentes.	3 por mes
Galón de jabón para manos.	1 por mes
Algodón (libras)	1 cada 3 meses
Lápiz grafito	1 cada dos meses
Equipo de protección personal	
Respiradores N-95 o N-100 de BFE (filtro de eficiencia de filtración bacteriana)	1 diario por persona
Caja de guantes descartables	3 mensual
Gabachas descartables	30 mensual
Gorro	30 mensual
Lentes protectores	3
Reactivos	

Fucsina fenicada 0.3%, mililitros	5 por BK
Alcohol ácido 3%, mililitros	5 por BK
Azul de metileno 0.1%, mililitros	5 por BK
Lejía comercial al 0.5%, galón	1 mensual
Alcohol 90%, litro	1 mensual
Aceite de inmersión. (Índice de refracción = 1.515-1.517. Viscosidad = 100-120), mililitros	1 gota = 0.05 por BK

Fuente: Equipo técnico. Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por el laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Las cantidades a solicitar de forma trimestral, semestral o anual, dependerá de la producción de cada establecimiento de salud y de la estructura organizativa institucional.

1.1. Recolección de la muestra

Para la baciloscopía, la muestra ideal es el esputo, por lo que cualquier otro tipo de muestra que no sea esputo, debe ser procesada con pruebas moleculares o cultivo.

Se requiere una adecuada recolección de la muestra en relación a calidad y cantidad, recolectada en el envase recomendado, correctamente identificado; conservada en las condiciones requeridas y transportada al laboratorio en el tiempo oportuno, con el objetivo de asegurar la confiabilidad de resultados.

Es recomendable que se lleve el registro de la calidad de muestra recibida para realizar la baciloscopía.

Saliva	Mucosa	Mucopurulenta	Sanguinolenta

Fuente: Manual de capacitación en Gene Xpert. Módulo 3: Toma y transporte de muestras de esputo.

El envase debe cumplir las siguientes características:

- a) **Plástico transparente:** que permita observar el volumen y la calidad de la muestra sin abrir el envase; para prevenir accidentes y facilitar su adecuado descarte.
- b) **Libre de partículas de polvo u otros contaminantes:** no necesariamente estéril.
- c) **Boca ancha:** para que el paciente pueda expectorar cómodamente dentro del envase sin contaminar el exterior.

- d) Tapa de rosca: a fin de asegurar un cierre hermético, que permita al menos dos vueltas de cierre y reducir el riesgo de derrames durante el transporte.
- e) Capacidad: de treinta y cinco a cincuenta milímetros de diámetro para que el paciente pueda depositar el esputo con facilidad dentro del envase, sin ensuciar sus manos o las paredes del frasco.
- f) Fácil de rotular: lo que permitirá una identificación indeleble o la colocación de una viñeta.

El personal de salud que da indicaciones para la recolección de la muestra, debe rotular el frasco con la siguiente información: nombre completo del paciente, número de identificación correspondiente del paciente [expediente, Documento Único de Identidad (DUI), Sistema de Información Penitenciaria (SIPE), Número Único Previsional (NUP), ficha familiar, afiliación dependiendo de la institución o establecimiento de procedencia], tipo de muestra (esputo), número de muestra.

Para diagnóstico, se deben tomar dos muestras por persona catalogada como sintomático respiratorio. La primera muestra tomada en el momento de la consulta al identificar al sintomático respiratorio. La segunda la debe recolectar el paciente en su casa, por la mañana al despertar (muestra matinal). Es más probable que se eliminen bacilos en las muestras matinales.

Para control de tratamiento, dos muestras recolectadas por la mañana, en días consecutivos (ver *Norma técnica para la prevención y control de la tuberculosis*).

Para obtener una muestra de esputo de calidad, debe proporcionar las indicaciones al paciente:

- a) Recolectarla en un área con ventilación (preferentemente al aire libre) y no en lugares encerrados como el baño. En el caso de pacientes hospitalizados, en la medida de lo posible se deben desplazar a un lugar ventilado.
- b) Evitar el uso de lápiz labial al momento de recolectar la muestra.
- c) Enjuagarse la boca con agua antes de dar la muestra, con el objetivo de eliminar restos alimenticios.
- d) Sonarse la nariz antes de obtener la muestra para evitar que la secreción nasal sea proporcionada como flema.
- e) El paciente debe inspirar profunda y lentamente, luego retener por un instante el aire en los pulmones, y después debe toser con fuerza y expectorar dentro del frasco que tiene listo en la mano, repetir este proceso hasta obtener suficiente muestra (5 mililitros).
- f) Cerrar el frasco procurando que el esputo no contamine el exterior del mismo.
- g) Entregarlo al personal de salud.
- h) La muestra recolectada deberá ser enviada lo más pronto posible al laboratorio en triple embalaje y en cadena de frío. (Ver anexo 3)
- i) Si el establecimiento no cuenta con laboratorio, debe coordinar el transporte y referir las muestras según su red, mientras tanto debe conservarlas en refrigeración de 2 a 8°C por un tiempo máximo de dos días.

1.2. Recepción, conservación y transporte de las muestras

El personal del laboratorio que recibe las muestras debe:

- a) Aplicar las medidas de bioseguridad.
- b) Abrir la caja sobre una mesa en el área de recepción de laboratorio o donde procesa la muestra, inspeccionando si se han producido derrames.
- c) En caso de confirmar el derrame, retener la muestra, desinfectar el exterior de los envases utilizando algodón humedecido con hipoclorito de sodio al 0.5%, evaluar la magnitud del derrame y emplear motivo de rechazo, si aplica.
- d) Revisar el llenado completo y correcto del formulario de la solicitud del examen para diagnóstico y seguimiento de casos de tuberculosis (PCT-3) (anexo 4), que cumpla con toda la información requerida y con letra legible de acuerdo a lo establecido en los lineamientos técnicos para los laboratorios clínicos vigentes.
- e) Verificar que los frascos estén herméticamente cerrados y que la información haya sido escrita en el cuerpo y no en la tapa del mismo.
- f) Cotejar la información de la viñeta del frasco con la información de la PCT -3
- g) Notificar al servicio o establecimiento que refiere, si se han observado inconvenientes de rechazo, utilizando el formulario de notificación de muestras rechazadas descrito en el POE de recepción de muestras. Las muestras podrán ser rechazadas según los criterios descritos en anexo 5. Motivo de rechazo de muestras.
- h) La recepción de muestras será de acuerdo al horario de atención del establecimiento de salud que las procesa.
- i) En caso de recibir una muestra directa del paciente, se debe insistir en las instrucciones para la toma de la segunda muestra.

Casos especiales

- a) Si el laboratorio que recibe las muestras, no realiza todas las pruebas solicitadas, deberá enviar la muestra a su laboratorio de referencia de la red.
- b) Los establecimientos que no tienen laboratorio, no deben referir al paciente, se debe enviar las muestras cuanto antes, después de su obtención (24 a 48 horas), si no puede evitarse que el traslado se retrase, las muestras deben refrigerarse o mantenerse en un lugar lo más fresco posible y protegidas de la luz, para evitar el desarrollo de microorganismos contaminantes (no dejar transcurrir más de 5 días entre la recolección del esputo y el procesamiento de la muestra); por lo que el laboratorio clínico, rechazará toda muestra que excede los 5 días de recolectada.
- c) En vacaciones prolongadas, si los establecimientos de FOSALUD captan un sintomático respiratorio, deberán coordinar con el laboratorio clínico de segundo nivel de atención de su red, la recepción y procesamiento de la muestra.

Procedimiento

Lugar de trabajo

La baciloscopía puede ser realizada en laboratorios de cualquier complejidad, que posean un microscopio, con lente de inmersión en buenas condiciones, algunos insumos de bajo costo e

instalaciones simples en el laboratorio. Deben seguir normas básicas sencillas que aseguren calidad y minimicen los riesgos.

Los requisitos mínimos a cumplir son:

- a) El área de trabajo debe estar alejada de la entrada, para evitar corrientes de aire, así como el movimiento de personal alrededor, durante el procesamiento de las muestras.
- b) Buena iluminación.
- c) La mesa de trabajo para colocar las muestras que se reciban, y realizar los extendidos debe estar en lo posible cubierta con material liso y resistente a soluciones germicidas (fórmica, acero inoxidable o materiales similares).
- d) Ventilación natural de laboratorio (a través de ventanas) o mecánica (mediante un extractor de aire), con un caudal aproximado de 6 a 12 cambios del volumen de aire del laboratorio por hora. Si se trata de un extractor de pared, éste debe contar con una salida al exterior hacia un área poco transitada del servicio y a una altura de al menos 2 metros y medio del piso. En todos los casos se debe asegurar que la corriente de aire no esté dirigida a la mesa en la que se preparan los extendidos.
- e) Paredes pintadas, sin desprendimientos y pisos lavables, que puedan ser desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5% (Anexo 6)
- f) Un lavabo con fuente de agua y desagüe, en el que se pueda lavar las manos y realizar la tinción.
- g) Una alacena para los reactivos, portaobjetos y demás materiales.
- h) Área para el microscopio.
- i) Una mesa de trabajo para escribir los informes y los registros del laboratorio.
- j) Un lugar para almacenar los frotis.

1.3. Preparación del extendido

Antes de empezar el trabajo, los técnicos deben lavarse las manos y colocarse el equipo de protección personal requerido. Cada serie de muestras a procesar, no debe ser superior a doce. Las láminas deben estar nuevas y en buen estado, si es necesario desengrasarlas previamente con alcohol al 70%.



Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias Laboratorio Unidad de Salud San Vicente.

- a) Colocar sobre la mesa de trabajo una hoja doble de papel, humedecida con la solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Esta hoja de papel constituye el área contaminada, porque sobre ella deben realizarse las etapas más peligrosas de todo el procedimiento, desde la apertura y preparación del extendido hasta el cierre del frasco.
- b) Colocar las muestras sobre la mesa de trabajo, en el área delimitada en línea horizontal. Si las muestras han estado en movimiento, dejar reposar los frascos por lo menos 20 minutos antes de abrirlos.
- c) Para cada muestra, numerar en el esmeril de una lámina portaobjeto, con lápiz de grafito el mismo número asignado de la boleta y al frasco; para el caso del ISSS la identificación de la lámina se hará acorde al lineamiento institucional emitido por el centro de referencia de control de calidad de baciloscopía. Se debe tener la precaución de no tocar con los dedos la parte destinada al extendido porque puede engrasarse.
- d) Destapar cuidadosamente sólo el frasco de la muestra que se va a procesar, cerca del mechero encendido, el cual estará colocado entre la persona y la muestra, como medio de protección; el frasco se coloca sobre el papel junto a la lámina correspondiente, comprobando que ambos tengan el mismo número.
- e) Quebrar el aplicador de madera en dos, utilizando el extremo astillado para mezclar y tomar la partícula útil purulenta, este es uno de los pasos más importantes para aumentar la probabilidad de identificar los bacilos de tuberculosis mediante la baciloscopía.
- f) Si la muestra es saliva, se debe mezclar bien y colocar mayor cantidad de muestra. (Anotar en la PCT-4 el tipo de muestra que se procesa).
- g) Tomar la lámina con los dedos en la parte correspondiente al número. Colocar la partícula de muestra sobre la lámina, extendiéndola con el aplicador realizando movimientos suaves circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un óvalo de 2 centímetros de largo por un centímetro de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.
- h) Para que la película sea realmente homogénea, es necesario tomar una partícula de muestra grande, eliminando el sobrante con el mismo aplicador. Nunca debe calentarse la lámina mientras se está haciendo el extendido, pues se forman aerosoles, existiendo el riesgo de infectarse a través de las vías respiratorias, también en el extendido se forman círculos concéntricos y precipitados granulados, la película pierde su homogeneidad dificultando la lectura.
- i) Al terminar el extendido, se deben desechar los aplicadores en un recipiente con hipoclorito de sodio al 0.5%, los extendidos se dejan secar a temperatura ambiente. Las muestras ya procesadas sólo deben ser descartadas después de la observación microscópica, colocándoles a cada frasco 10 gotas de hipoclorito de sodio al 0.5%.
- j) Una vez secos los frotis, fijar la lámina con el extendido hacia arriba, pasándola rápidamente sobre la llama tres veces, cuidando que no se caliente demasiado. El extendido nunca debe ser calentado a la llama mientras esté húmedo, pues el calor fuerte altera la estructura de los bacilos y su posterior tinción, además puede generar aerosoles.

- k) Colocar los extendidos en un soporte a medida que se van fijando y de inmediato realizar la técnica de coloración ya que algunos bacilos pueden permanecer vivos después de fijados con calor hasta que se incorpora la fucsina.
- l) Al finalizar el trabajo, deben ser cuidadosamente descartados en el depósito de material bioinfeccioso, el papel, aplicadores y otros materiales utilizados.

Preparación del extendido



1. Ordenar y enumerar las muestras



2. Enumerar los portaobjetos



3. Quebrar el aplicador



4. Seleccionar y mezclar la partícula más purulenta



5. Depositar la muestra en el portaobjetos



6. Extender la muestra uniformemente (ver anexo 7)



7. Fijar el extendido cuando esté totalmente seco, pasando la lámina rápidamente tres veces sobre la llama del mechero de arriba hacia abajo

Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias /Laboratorio Clínico, Unidad de Salud de San Vicente

Coloración

El personal de laboratorio debe utilizar la técnica de Ziehl-Neelsen con los siguientes pasos:

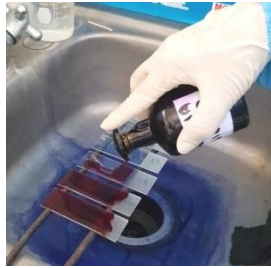
- a) Identificar y filtrar los colorantes antes de utilizarlos.
- b) Filtrar los colorantes en cantidad necesaria a utilizar.
- c) Colocar la serie de láminas fijadas (no superior a 12) sobre la bandeja metálica o varilla que está en el lavabo, con el extendido hacia arriba separadas una de otra como mínimo un centímetro y con el número hacia el operador. No olvidar colocar las láminas de control positivo y negativo de muestras conocidas, previamente preparadas.
- d) Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con fucsina fenicada.
- e) Improvisando una pequeña antorcha (algodón impregnado con alcohol en una pinza), pasarla lentamente por debajo de las láminas hasta que se produzca emisión de vapores; en este momento inician los 5 minutos de coloración, cuando los vapores sean visibles

dejar de calentar. Al cesar la emisión de vapores se calienta nuevamente, se repite este paso una vez más hasta completar tres emisiones sucesivas. La fucsina no debe hervir (la pared de los bacilos puede destruirse y colorearse inadecuadamente) y si disminuye por evaporación o derrame, hay que reponerla porque el extendido debe estar cubierto constantemente durante el calentamiento.

- f) Eliminar la fucsina, tomando el portaobjetos por el extremo numerado, inclinándolo hacia adelante y lavar dejando caer una corriente de agua de chorro a baja presión sobre la parte esmerilada de la lámina (donde no hay extendido), la que escurrirá suavemente sobre la película.
- g) Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con alcohol ácido por dos minutos haciendo un movimiento de vaivén de modo que el alcohol vaya decolorando y a la vez arrastrando suavemente la fucsina. Se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas conservan solo un ligero tinte rosado. Si las partes más densas quedan mal decoloradas, se pueden observar estructuras teñidas que no son micobacterias.
- h) Una vez eliminado el alcohol ácido, lavar las láminas cuidando de no desprender la película.
- i) Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con azul de metileno y dejarlo que actúe por un minuto.
- j) Lavar tanto el extendido como la cara inferior del portaobjetos.
- k) Limpiar la parte posterior de la lámina (donde no hay extendido), con un algodón humedecido con alcohol, para quitar los restos de colorante.
- l) Colocar cada lámina en la gradilla hasta que se seque a temperatura ambiente.

Los reactivos para coloración serán proporcionados por el Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNSP), ya que cuenta con el control de calidad respectivo; en el caso del ISSS serán proporcionados por el laboratorio de la Unidad Médica Atlacatl. (Anexo 8. Preparación de colorantes)

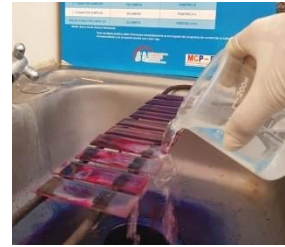
Tinción de Ziehl-Neelsen



1. Cubrir con fucsina



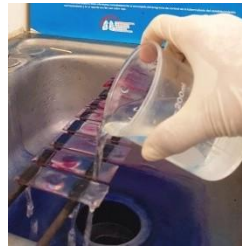
2. Calentar hasta obtener 3 emisiones de vapor. Apagar antorcha y esperar completar 5 minutos



3. Lavar con agua



4. Cubrir con decolorante durante 2 minutos



5. Lavar con agua nuevamente



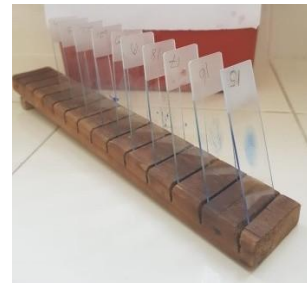
6. Cubrir con azul de metileno durante 1 minuto



7. Lavar con agua



8. Limpiar la parte posterior de la lámina



9. Secado al aire

Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias /Laboratorio Clínico, Unidad de Salud de San Vicente.

Examen microscópico

Observación microscópica y lectura del extendido.

La observación microscópica debe cumplir principalmente dos objetivos:

- Determinar si en el extendido hay BAAR.
- Cuantificar el número de bacilos por campo, si los hay.

Los bacilos ácido alcohol resistentes tienen entre 1 y 10 micras de largo y 0.2 a 0.6 micras de ancho. Con la coloración de Ziehl Neelsen se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, fucsia, destacándose claramente contra el fondo azul.

En la muestra de esputo pueden presentarse aislados, apareados o agrupados. Es muy difícil distinguir el bacilo de la tuberculosis de otras micobacterias por examen microscópico. Algunas micobacterias que no son *M. tuberculosis*, pueden aparecer como bastones muy largos o como cocobacilos.

Otros microorganismos pueden presentar distintos grados de ácido alcohol resistencia, como:

- a) *Rhodococcus sp.*
- b) *Nocardia sp.*
- c) *Legionella sp.*
- d) Ooquistes de *Cryptosporidium spp.*
- e) Ooquistes de *Isospora spp.*

Se pueden observar en forma de cocos, bacterias con formas variadas (pleomórficas), filamentos que a veces están cortados, o como esferas de gran tamaño si se les compara con las bacterias.

Es importante considerar que resulta poco frecuente encontrar más de diez microorganismos ácido alcohol resistente diferentes a *M. tuberculosis* en las muestras de esputo de los SR.

Cuando el personal de laboratorio observa algún microorganismo que no tiene forma de bastón debe consultar al supervisor.

Lectura de extendidos coloreados por Ziehl Neelsen:

- a) Depositar una gota de aceite de inmersión, sin tocar el preparado con el gotero.
- b) Enfocar el extendido donde ha colocado la gota de aceite, con la lente 100 X de inmersión.
- c) Observar cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el tornillo micrométrico, antes de desplazarse al campo contiguo. Seguir el recorrido en línea recta sistemáticamente para recorrer el extendido, evitando repetir la lectura de algunos campos. Ejemplo: de izquierda a derecha.



Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

- d) Observar la calidad del extendido y de la coloración. Si no fuesen buenas, repetir nuevamente la baciloscopia de esa muestra.
- e) Para el examen es necesario un microscopio binocular con objetivo de inmersión (100x) y oculares de aumento moderado.
- f) Examinar un mínimo de 100 campos microscópicos.
- g) Se considera campo microscópico útil, aquel en el cual se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células). Los campos en los que no aparezcan dichos elementos, no deben contabilizarse en la lectura.
- h) Cuando no se encuentren bacilos ácido alcohol resistente (BAAR), en 100 campos; se debe hacer una nueva búsqueda más cuidadosa en otros 100 campos.
- i) Se debe calcular el número de bacilos vistos por campo.



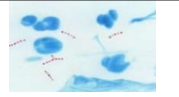
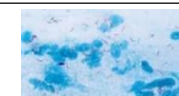
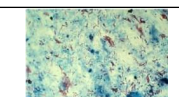
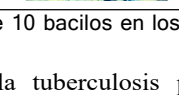
- j) Al finalizar el examen, se debe separar el objetivo de la lámina, retirarla y verificar la identificación con el número grabado en la lámina y anotar el resultado en el libro de registro de actividades de laboratorio (PCT- 4, anexo 2), posteriormente, se deben anotar los resultados en la solicitud de examen bacteriológico de tuberculosis (PCT-3) (anexo 4).
- k) Antes de examinar un nuevo frotis, se debe limpiar el lente de inmersión con papel para limpiar lentes o algodón impregnado con alcohol al 70%.
- l) Posteriormente, se debe limpiar el aceite de la lámina y guardarla para su envío al control de calidad.

Informe de resultados

El número de bacilos encontrados es muy importante como elemento de información, dada su relación con el nivel de contagio del paciente, la severidad de la enfermedad y la evolución del paciente bajo tratamiento. Por esta razón el informe debe ser cualitativo y cuantitativo; debe reportarse en un máximo de 3 días hábiles desde el momento de recepción de la muestra en el laboratorio *Lineamientos técnicos para los laboratorios clínicos, MINSAL,*

Se deben seguir las pautas descritas en el cuadro 3 para la presentación del informe de los resultados:

Cuadro 3. Informe de resultados de BK

Número de bacilos encontrados	Campos de inmersión observados	Reporte	Población bacilar
No se observan BAAR en	100 campos	Negativo	a 
De 1 a 9 BAAR en	100 campos	Número exacto de bacilos observados en los 100 campos	b  c 
* De 10 - 99 BAAR	100 campos	+	
De 1 - 10 BAAR por campo en	50 campos	++	d 
Más de 10 BAAR por campo en	20 campos	e +++	

* Para reportar una baciloscopía como positiva una cruz (+), debe de haber visualizado más de 10 bacilos en los 100 campos observados.

Fuente: Equipo técnico “Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019”. a: Sección Micobacterias, Laboratorio Nacional de Salud Pública. b: Wikimedia Commons. c, d y e: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, Parte 1: Manual de actualización de Baciloscopía, edición 2018.

Todo resultado positivo, debe informarse inmediatamente al personal del establecimiento de salud correspondiente, para iniciar tempranamente el tratamiento del paciente y la identificación de los contactos. Las causas de error en la BK se describen en el cuadro 4.

Es responsabilidad del establecimiento de salud correspondiente, el retiro de los resultados de pruebas bacteriológicas solicitadas.

Cuadro 4. Causas de error en la baciloscopía

Motivos		Falsos positivos	Falsos negativos
Inherentes a la muestra	• No representativa del lugar de la lesión.		X
	• Muestra inadecuada.		X
	• Mal conservada		X
Inherentes al operador	Mala selección de la partícula de muestra.		X
	Defectos en la realización del extendido:		
	• Extendidos finos, gruesos o poco homogéneos.		X
	• Fijación de extendido húmedo o a temperatura superior a 60 °C		X
	Defectos en la realización de la coloración:		
	• Calentamiento deficiente o excesivo.		X
	• Decoloración insuficiente	X	X
	• Precipitación de cristales por uso de reactivos no filtrados o calentamiento excesivo.	X	
	• Decoloración excesiva.		X
	Defectos en la lectura:		
	• Uso de microscopios en mal estado	X	X
	• Lectura de un número insuficiente de campos		X
	• Poca capacidad para diferenciar bacilos de artificios de coloración.	X	X
	• Observación de un solo nivel del extendido		X
	• Transferencia de bacilos de un extendido a otro (varilla de aceite de inmersión)	X	
	• Confusión de muestras y/o extendidos.	X	X
• Errores en transcripción de resultados.	X	X	
• Hay 1 a 9 bacilos en 100 campos		X	
Inherentes a la técnica	• Límite de sensibilidad 5,000 -10,000 bacilos/ml de muestra		X
	• Especificidad: se detectan BAAR que pueden ser no patógenos y nocardias.	X	

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

1.4. Indicadores de calidad

Cuadro 5. Indicadores operacionales de apoyo del laboratorio

Indicador	Construcción del indicador	Fuente
Carga de trabajo	Número de BK de diagnóstico + número de BK de control de tratamiento	(M 40 + M 42 + M 41) V.E.= definir a nivel local
Concentración de baciloscopía por S.R.	Total de BK de diagnóstico/SR investigados por el laboratorio	$\frac{(M 40 + M 42)}{M 40}$ V.E.=2
Porcentaje de BK de diagnóstico positivas	$\frac{\text{Total de BK de diagnóstico positivas al SR} \times 100}{\text{Total de BK de diagnóstico realizadas al SR}}$	$\frac{M40(BK+) + M42(BK+)}{M40 + M42} \times 100$ V.E.= 5%
Nº de baciloscopía realizadas por caso	Total de BK de diagnóstico realizadas al SR/*Total de casos BK (+) (nuevos y de retratamiento diagnosticados en el laboratorio)	Registro de actividades de laboratorio (PCT-4)
Porcentaje de BK de control de tratamiento positivas	$\frac{\text{Número de BK de control de tratamiento positivas} \times 100}{\text{Total de BK de control de tratamiento.}}$	$\frac{M 41(BK +)}{M41(BK + y neg)} \times 100$ V.E. =5 – 10%
Porcentaje de BK de diagnóstico positivas de bajo grado (positivas + y contables)	$\frac{\text{Número de BK de diagnóstico positivas de bajo grado} \times 100}{\text{Total de BK de diagnóstico positivas.}}$	Registro de actividades de laboratorio (PCT-4)

* En el denominador serán tomados los casos diagnosticados, solo por baciloscopía, propios de su establecimiento (tengan o no laboratorio).

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Interpretación de indicadores de laboratorio:

- Carga de trabajo: mide el número total de baciloscopías realizadas
- Concentración de baciloscopía por SR: mide el número de baciloscopías realizadas en promedio, por cada sintomático respiratorio.
- Porcentaje de baciloscopías de diagnóstico positivas: mide el porcentaje de baciloscopías (+) del total de baciloscopías de diagnóstico realizadas.
- Número de baciloscopías realizadas por caso: se obtiene el número de BK realizadas para encontrar un caso baciloscopía positiva, sea nuevo o de retratamiento.
- Porcentaje de baciloscopías de control de tratamiento positivas: permite identificar si la negativización está siendo adecuada al tratamiento.
- Porcentaje de baciloscopías de diagnóstico positivas de bajo grado (positivas + y contables): permite identificar si el diagnóstico es temprano o tardío.

2. Cultivo

Es el método bacteriológico más sensible y específico de los conocidos en la actualidad, ya que puede detectar entre 10 a 100 BAAR por mililitro en una muestra determinada, si se ha realizado cumpliendo los lineamientos, además permite estudiar los bacilos vivos por técnicas de identificación.

Es un método de mayor complejidad y costo que la baciloscopía, cuyos resultados se obtienen entre 20 y 60 días después del procesamiento de la muestra.

Mediante el cultivo, es posible incrementar la confirmación de diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15 a 20% del total de casos y en 20 a 30% de los casos de tuberculosis pulmonar.

Entre los casos con tuberculosis extrapulmonar el aporte del cultivo al diagnóstico es variable, según la localización de la enfermedad y aun con un resultado negativo del cultivo, es posible que se establezca o se mantenga el diagnóstico de tuberculosis.

El cultivo para diagnóstico más la tipificación y sensibilidad está indicado en los siguientes casos:

1. Alta sospecha de TB y dos baciloscopías negativas
2. Sospecha de tuberculosis infantil
3. Sospecha de tuberculosis extrapulmonar
4. Personas con VIH y con sospecha de TB
5. Fracaso
6. Pérdida en el seguimiento
7. Recaída
8. Contacto de caso TB-MDR o TB-RR
9. Antecedente o estancia actual en centro penitenciario o bartolinas
10. Coinfección TB/VIH
11. No negativizan al segundo, cuarto o quinto mes de tratamiento
12. Baciloscopías con uno a nueve bacilos en cien campos
13. Migrante nacional o extranjero
14. Paciente con tratamiento antituberculoso que no mejora clínicamente, aunque las BK de control sean negativas
15. Micobacteriosis
16. Personas con diabetes
17. Caso TB-RR, TB-MDR, TB-DR
18. Personal de salud
19. Poblaciones originarias
20. Población en situación de calle
21. SR con inmunodeficiencias
22. Otros (especificar)

El personal de laboratorio, mediante el cultivo, debe asegurar que los bacilos en las muestras de los pacientes se multipliquen in vitro, hasta que se visualicen formando colonias en un medio sólido, para ello en cada una de las etapas del proceso del cultivo, debe verificarse:

- Persistencia del bacilo en muestra de la lesión
- Se debe tener en cuenta que la probabilidad de recuperación aumenta proporcionalmente con la rapidez con que se siembre la muestra.
- El tiempo de demora en la reproducción del bacilo, ya que esta etapa es muy crítica cuando el número de bacilos es escaso o cuando el pH de la muestra es desfavorable para la sobrevivencia del bacilo como en el caso de lavados gástricos y orinas.
- Verificar factores claves como la exposición a la luz solar, desecación y el calor ya que son condiciones micobactericidas.
- Vigilar la conservación de la muestra previa al cultivo: de 1 a 5 días, preservarla entre 2 a 8 °C y de 6 a 15 días a - 20 °C.

2.1. Preparación de medios de cultivo

Cuadro 6. Medios a base de huevos

			Löwenstein Jensen	Stonebrink	Ogawa	Ogawa Kudoh (ácido)
Solución salina	Fosfato monopotásico KH ₂ PO ₄	g	2.4	3.5	6	12
	Fosfato disódico HNa ₂ PO ₄	g		1.6		
	Sulfato de magnesio SO Mg. 7H ₂ O	g	0.24			
	Citrato de magnesio	g	0.6			0.6
	Glutamato de sodio	g			6	3
	Piruvato de sodio	g		6.25		
	L-asparagina	g	3.6			
	Glicerol	ml	12		36	24
	Agua destilada c.s.p.	ml	600	500	600	600
Huevos	ml	1000	1000	1200	1200	
Verde de malaquita 2%	ml	20.0	20.0	36	24	
pH aproximado		6.8	6.8	6.8	6.2	

Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis Normas y Guía Técnica Parte II Cultivo. 2008

El área debe estar limpia y libre de corrientes de aire, deberá crearse un campo de trabajo con el mechero y papel embebido con el desinfectante.

Cuadro 7. Equipos y materiales para la preparación de medios de cultivo

Descripción	Cantidad
Equipos	
Balanza analítica	1
Mechero Bunsen	1
Agitador	1
Medidor de pH	1
Refrigerador	1
Reloj marcador de tiempo	1
Coagulador	Depende de la cantidad de medio a preparar
Autoclave	1
Licuada	1
Materiales	
Espátula	1
Papel para pesar	1
Erlenmeyer para preparar la solución de sales	1
Erlenmeyer para mezcla de sales y huevos	1
Erlenmeyer para solución de verde de malaquita	1
Probeta para agua destilada	1
Probeta para huevos	1
Probeta para glicerol	1
Algodón	Una lb para 3 meses
Embudo de 200 mm de diámetro	1
Beaker para quebrar huevos	3
Gaza para forrar el embudo	4 yardas por cada lote preparado
Tubos de 20 x 150 mm	Depende de la cantidad de medio a preparar
Dispensador de medio	1
Gradillas	Depende de la cantidad de medio a preparar
Beaker para medir el pH (uno para cada buffer)	4
Varilla agitadora	1
Bolsas plásticas para almacenar el medio de cultivo	Depende de la cantidad de medio a preparar
Magnetos de diferentes tamaños	2
Balón fondo plano para dispensar el medio de cultivo	2

Fuente: Sección de micobacterias - LNSP , Ministerio de Salud.

Conservación:

- a) Las sales y los huevos deberán almacenarse a temperatura ambiente.
- b) Preparar la solución de verde de malaquita al 2% un día antes cada vez que se prepare medio de cultivo, protegiéndola de la luz para evitar su degradación, asegurándose de su completa disolución.

Desarrollo del procedimiento:

Deberá utilizarse gabacha y mascarilla para evitar contaminar el medio de cultivo.

Día 1

- a) Una vez pesadas las sales disolverlas en los 600 ml de agua destilada (para 1000 ml de base de huevos).
- b) Calentarlas suavemente hasta su disolución total.
- c) Agregar el glicerol.
- d) Esterilizarlas en la autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- e) Dejar enfriar.
- f) Preparar la solución de verde de malaquita al 2%.
- g) Limpiar y desinfectar los huevos. Deberán limpiarse de la siguiente forma:
 - Mantenerlos en una mezcla de agua de chorro con detergente en polvo (agua jabonosa) por un periodo de 15 minutos.
 - Estregar uno a uno con un algodón embebido en agua jabonosa
 - Enjuagar con abundante agua de chorro hasta eliminar por completo la espuma.
 - Colocarlos en un recipiente limpio.
 - Limpiar uno a uno con un algodón embebido con una solución de alcohol al 70%
 - Colocarlos en un recipiente limpio y cubrirlos con papel toalla

Día 2

- a) Encender el coagulador previamente hasta lograr una temperatura interna de 85 °C.
- b) Con las manos cuidadosamente lavadas, quebrar los huevos uno a uno, en un pequeño beaker y observar que no se encuentre en mal estado.
- c) Vaciar los huevos uno a uno en la probeta hasta completar un litro.
- d) Verter los huevos en el vaso de la licuadora y mezclarlos a baja velocidad durante unos segundos.
- e) Filtrar el homogenizado de huevos haciéndolo pasar a un erlenmeyer a través de un embudo cubierto con 4 capas de gaza estéril.
- f) Agregar inmediatamente la solución de verde de malaquita al 2%, lavando el frasco con una porción de la solución de sales, verificando que no quede ningún grumo de verde de malaquita.
- g) Agregar la totalidad de la solución de sales al homogenizado de huevo.
- h) Mezclar en el agitador eléctrico (si cuenta con el equipo) o de forma manual hasta que el medio se encuentre homogéneo.
- i) Dispensar en cada tubo una cantidad suficiente como para que al inclinarlo en el estante del coagulador forme un pico de flauta desde la base del tubo hasta unos 2 cm por debajo del borde de la rosca.



Tubos de 20 x 150 mm	10 ml
Tubos de 20 x 125 mm	8 ml

- j) Identificar cada tubo con el nombre del medio de cultivo, número de lote asignado y fecha de vencimiento (el vencimiento para el medio de Löwenstein Jensen, es de dos meses).
- k) Romper las burbujas que se hayan formado al dispensar el medio de cultivo.
- l) Ubicar los tubos en el estante del coagulador de modo que se logre formar el pico de flauta y cerrar el coagulador para evitar la pérdida de calor y dejar coagular por un tiempo aproximado de una hora.
- m) Separar 15 ml de medio y medir su pH.
- n) Una vez coagulados, sacar los tubos del coagulador y colocarlos en una bandeja para esperar a que se enfríen a temperatura ambiente.
- o) Guardar los tubos en bolsas plásticas debidamente rotuladas con el número de lote correspondiente, en el refrigerador entre 2 °C a 8 °C con sus tapones bien ajustados evitando la desecación y contaminación.
- p) Registrar en el formulario para preparación de medios de cultivo con la información requerida (ver anexo 9).

Control de calidad de medios

La calidad de los lotes de medio de cultivo, es imprescindible para garantizar el desarrollo de los bacilos, por lo que, a cada lote de medio, se le deberá realizar un control de calidad.

2.2. Equipo, materiales y reactivos para cultivo

La elección del método a utilizar depende del presupuesto, entrenamiento del personal, equipamiento y de la asistencia técnica.

Cuadro 8. Equipo, materiales y reactivos según método

Descripción	Método Petroffi modificado	Ogawa Kudoh
Equipo		
Estufa o incubadora	X	X
Cronómetro	X	X
Equipo de protección personal	X	X
Refrigeradora	X	X
Cabina de seguridad biológica clase II tipo 2	X	
Centrifuga Refrigerada	X	

Materiales		
Mechero	X	X
Bandeja metálica inclinada	X	X
Dos tubos de medio de cultivos	X	X
Gradilla para láminas	X	X
Gradilla para tubos de 20 x 125 milímetros	X	X
Recipiente para descarte de desechos bioinfecciosos	X	X
Láminas porta objeto esmeriladas	X	X
Aplicadores de madera	X	X
Basurero con tapadera y con sus respectivas bolsas plásticas (roja y negra)	X	X
Jabón para lavado de manos	X	X
Papel	X	X
Plumón permanente	X	X
Lápiz de grafito	X	X
Lapicero	X	X
Papel toalla	X	X
Fósforos	X	X
Hoja de solicitud del examen (PCT-3)	X	X
Libro para registro de cultivo	X	X
Goteros estériles	X	
Gradilla para tubo cónico de 50 mililitros	X	
Dos hisopos de poliéster o de algodón estériles de quince milímetros de longitud en promedio		X
Descarte de objetos punzocortantes	X	X
Reactivos		
Hipoclorito de sodio al 0.5%	X	X
NaOH al 4% estéril	X	
Un tubo de vidrio estéril conteniendo tres mililitros de solución de NaOH al 4% por cada muestra a procesar		X
Buffer fosfato pH 6.8 estéril	X	
Agua destilada estéril	X	

Fuente: Equipo técnico, Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Recolección de la muestra

- Espujo: Ver proceso de recolección para baciloscopia.
- Otros tipos de muestras: Todas las muestras extrapulmonares deben procesarse a través de prueba molecular y en aquellos casos en el que el resultado no sea concluyente o la muestra sea de difícil recolección considerar procesarla por cultivo. En el cuadro 9 se describe la cantidad requerida, almacenamiento, conservación y el tipo de recipiente a utilizar, según el tipo de muestra a procesar.

Cuadro 9. Muestras extrapulmonares

Tipo de muestra	Cantidad requerida	Almacenamiento y conservación	Tipo de recipiente
Aspirado y lavado gástrico	5-10 mililitros	De 2 a 8 °C, sin sobrepasar las 24 horas. Estabilizar con bicarbonato de sodio (ver anexo 6)	Frasco de tapón de rosca capacidad de 35 a 50 ml
Lavado y aspirado bronquial	5-10 mililitros	De 2 a 8 °C, sin sobrepasar las 24 horas.	Frasco de tapón de rosca estéril capacidad de 35 a 50 ml
Orina	No menos de 50 mililitros, recolectar la primera micción de la mañana, utilizando la técnica de medio chorro, previo aseo. Recolectar de 3 a 6 muestras en días diferentes.	De 2 a 8 °C, sin sobrepasar las 24 horas.	Frasco de tapón de rosca estéril, capacidad de 35 a 50 ml
Líquido cefalorraquídeo	De 1 a 3 mililitros por tubo (todos los que el médico crea conveniente, según las pruebas requeridas)	De 2 a 8 °C. No más de 12 horas.	Tubo estéril con tapa de rosca y cierre hermético, capacidad de 10 - 15 mililitros, sin anticoagulante.
Líquidos: ascítico, pericárdico, articular, pleural, otros.	De 2 a 3 mililitros por tubo (todos los que el médico crea conveniente, según las pruebas requeridas)	Se debe procesar inmediatamente o almacenarlo de 2 a 8 °C. No sobrepasar las 24 horas. Utilizar anticoagulante, Citrato de sodio al 10% (3 gotas por cada 10 ml de muestra)	Tubo estéril, tapón hermético de rosca con capacidad de 10 a 15 mililitros.
Tejidos y material resecado	Será tomada por el personal médico, la cantidad que éste considere conveniente.	De 2 a 8 °C. Sin sobrepasar las 24 horas. Agregar 1 o 2 mililitros de solución salina o agua destilada estéril o la cantidad requerida según el tamaño de la muestra, para evitar la desecación. No agregar formol para el estudio bacteriológico porque es letal para el bacilo.	Utilizar frasco estéril.
Médula ósea	De 1 a 3 mililitros.	De 2 a 8 °C. No más de 12 horas.	Utilizar frasco estéril.
Sangre	10 mililitros en sangre completa. De 2 a 3 muestras tomadas en diferentes días	De 2 a 8 °C. No más de 12 horas. Colocar 2 gotas de anticoagulante de heparina.	Tubo estéril con tapa de rosca y cierre hermético, capacidad de 10 - 15 mililitros, sin anticoagulante.
Pus y secreciones	De 1 a 3 mililitros o de 2 a 4 hisopos humedecidos previamente con solución fisiológica o agua destilada estéril.	De 2 a 8 °C.	Utilizar frasco estéril

Nota: Las heces no son muestras adecuadas para el diagnóstico de tuberculosis, debido a las metodologías que actualmente son utilizadas por la red.

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Manual de procedimientos para el estudio de tuberculosis y otras micobacterias. Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbran. Argentina, 1993.

Recepción, conservación y transporte de muestras

Ver información citada previamente en baciloscopía.

Cuanto antes se procese la muestra, mayor será la posibilidad de encontrar en ella el *M. tuberculosis*. La temperatura ambiente y el transcurso del tiempo, favorecen la multiplicación de los microorganismos que son causantes de contaminación en los medios inoculados, disparando así los índices de contaminación en los cultivos.

Procedimiento

Lugar de trabajo

La estructura del laboratorio, la forma en que se asignan los espacios funcionales y su relación entre sí, repercute de manera esencial en el flujo de trabajo y en la seguridad. Cada laboratorio que realiza cultivo, debe hacer una evaluación de riesgo de acuerdo a su infraestructura y capacidad instalada.

Elección del método de cultivo según los recursos disponibles

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos, por lo que las necesidades básicas de nutrientes de las especies cultivables son en general sencillas: el glicerol o la glucosa como fuente de carbono, y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. Aquellas muestras que provienen de sitios no estériles (por ejemplo, esputos, orina), deben descontaminarse previamente.

Mediante la decontaminación de la muestra se eliminan otros microorganismos que impiden el desarrollo adecuado del bacilo.

La muestra debe homogenizarse, especialmente el esputo, con el fin de lograr su licuefacción y liberar el bacilo del moco, así como material celular y tejido que puedan acompañarlo.

El empleo de decontaminantes adecuados, además de homogenizar la muestra, permite la destrucción de los microorganismos asociados, conservando la viabilidad del bacilo.

Consideraciones generales

- a) De preferencia se debe procesar la totalidad de cada muestra para no perder material que pueda contener bacilos.
- b) Procesar por separado cada muestra del mismo paciente sin mezclarlas, esto incrementa la posibilidad de recuperar bacilos, en especial en el caso que alguna de las muestras se contamine. A la vez permite verificar si se reitera el aislamiento a partir de distintas muestras del paciente y así resolver dudas que ocasionalmente se pueden presentar en el diagnóstico de tuberculosis o discernir si se está frente a un caso de micobacteriosis.
- c) Evitar la contaminación cruzada, ordenando de tal forma que al inicio queden las muestras estériles, seguidas de las muestras contaminadas, y según su motivo de indicación de diagnóstico a control de tratamiento.
- d) Aplicar distintos procedimientos antes de la siembra según la consistencia, volumen y contaminación de la muestra. El tipo de muestra predominante, será seguramente el esputo producido por expectoración espontánea.

2.3. Método de Petroffi modificado

- a) Debe utilizarse en la homogenización/decontaminación de muestras y su inoculación se realiza en medios a base de huevos con pH cercano al neutro.
- b) Es el más conveniente, por ser de bajo costo y se obtiene buena recuperación del BAAR
- c) El profesional de laboratorio debe tener en cuenta que el tiempo de contacto con el decontaminante no debe exceder los 30 minutos, de manera tal que normalmente no es posible procesar series de más de 12 muestras.

Muestras pulmonares (ver anexo 10)

- a) Utilizar el equipo de protección personal.
- b) Colocar el material a utilizar y encender la cabina de seguridad biológica 5 minutos antes de iniciar el procedimiento.
- c) Verificar los datos de la muestra del paciente con la PCT-3 y asignar el número correlativo.
- d) Identificar los tubos con el medio de cultivo, con los datos correspondientes.
- e) En un tubo cónico de 50 mililitros, estéril, transferir de 1 a 2 mililitros de muestra.
- f) Proceder de la misma manera con las siguientes muestras de una en una. No abrir el siguiente tubo si antes no se ha cerrado el anterior.
- g) Agregar de 1 a 2 mililitros de NaOH al 4% a cada tubo.
- h) Mezclar cada tubo, manualmente o con ayuda de un vortex, cada 5 minutos hasta que completen 15 minutos, sin sobrepasar los 20 minutos.
- i) Agregar buffer fosfato pH 6.8, a cada tubo, hasta completar la marca de 50 mililitros y mezclar hasta homogenizar.
- j) Centrifugar los tubos a 3,000 gravedades y temperatura entre 4 a 12 °C por 15 minutos.
- k) Dejar reposar 5 minutos, sacar las camisas de la centrifuga y llevarlas a la cabina de seguridad biológica (CSB).
- l) Dentro de la CSB sacar los tubos de uno en uno.
- m) Destapar y decantar el sobrenadante, limpiando la boquilla del tubo con un algodón humedecido con hipoclorito de sodio al 0.5% o alcohol al 70%, luego tapanlo hasta completar la serie de 12 tubos.
- n) Volver a destapar el tubo y re-suspender el sedimento con 4 o 5 gotas de buffer fosfato pH 6.8.
- o) Proceder de la misma manera con los tubos restantes.
- p) Inocular los tubos con medio de cultivo Löwenstein Jensen (LJ), agregando de 4 a 5 gotas del sedimento y dispersar de manera tal que quede en toda la superficie del medio.
- q) Con la última gota, preparar el frotis para realizar una baciloscopia.
- r) Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar de 35 a 37 °C.
- s) A las 48 horas, enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

Muestras extrapulmonares

Procedimiento para líquido cefalorraquídeo y otros líquidos estériles

- a) Utilizar el equipo de protección personal.
- b) Colocar el material a utilizar y encender la cabina de seguridad biológica, 5 minutos antes de iniciar el procedimiento.
- c) Verificar los datos de la muestra del paciente con la PCT-3 y asignar el número correlativo.
- d) Identificar los tubos con el medio de cultivo, con los datos correspondientes.
- e) Inocular de 2 a 3 tubos de medio de Löwenstein Jensen con 3 a 5 gotas de muestra.
- f) Dispersar sobre la superficie del medio.
- g) Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar de 35 a 37 °C.
- h) A las 48 horas revisar en busca de contaminación y si no se observa enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación. En caso de observarse contaminación proceder a realizar la decontaminación con la técnica de Petroff modificada.

Las muestras de líquidos estériles de volumen menor a un mililitro deben sembrarse directamente y en su totalidad distribuyéndolas en los tubos con medios de cultivo.

Las muestras de volumen mayor a cuatro mililitros deben:

- a) Ser trasvasadas en su totalidad a un tubo cónico de 50 ml volcando suavemente el contenido del envase dentro del tubo.
- b) Centrifugar quince minutos a 3000 gravedades.
- c) Esperar que se detenga completamente la centrifuga.
- d) Retirar el tubo cuidando de no re-suspender el sedimento, trasladarlo a la cabina. Dejar reposar cinco minutos antes de abrir.
- e) Abrir el primer tubo centrifugado, descartar su sobrenadante en el recipiente dedicado a este fin con un movimiento suave, sin salpicar, sin tocar la boca del frasco.
- f) Limpiar el exterior del tubo con un algodón impregnado en hipoclorito de sodio al 0.5% o alcohol al 70%, si se hubiere salpicado la pared. Cerrar la tapa del tubo.
- g) Proceder de igual forma con los siguientes tubos.
- h) No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado el anterior.
- i) Inocular en los medios de cultivo

Las muestras de nódulos linfáticos, biopsias y otros líquidos, requieren homogenización, concentración o decontaminación, previo a ser procesadas para cultivos. Estos procedimientos se hacen de forma habitual pero dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II A2 y en un laboratorio de contención.

Procedimiento para maceración de muestras de tejidos tomadas por biopsia

- a) Trasladar la muestra lentamente a un mortero estéril de porcelana u otro material autoclavable, sin salpicar. Puede ser necesario utilizar una pinza estéril para realizar esta operación. Descartar la pinza en el recipiente para material contaminado.
- b) Agregar un mililitro de agua destilada y arena estéril dentro del mortero, disgregar el tejido presionando con la mano del mortero y homogenizar el tejido.
- c) Si el tejido es normalmente estéril y ha sido tomado con asepsia, recoger con una pipeta todo el material macerado, distribuirlo en los medios de cultivo identificados con el número de la muestra.
- d) Si el tejido contiene contaminantes, recoger con una pipeta transfer o gotero estéril todo el material macerado, transferirlo al tubo de centrifuga identificado con el número de la muestra que está siendo procesada, ubicar el tubo en el orden que le corresponde en la serie de muestras que serán descontaminadas para que sea procesado mediante la técnica de Petroff modificado.
- e) Si se trata de una muestra normalmente estéril, pero se ignora si fue tomado y mantenido en esterilidad, utilizar la mitad del macerado para la siembra directa y el resto para descontaminar.
- f) Ubicar el mortero dentro del papel o bolsa donde fue previamente esterilizado y descartarlo dentro del recipiente destinado a esterilizar en el autoclave el material que se va a reciclar.
- g) Inocular de 2 a 3 tubos de medio de Löwenstein Jensen con 3 a 5 gotas de muestra.
- h) Dispersar sobre la superficie del medio.
- i) Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar de 35 a 37 °C.
- j) A las 48 horas revisar en busca de contaminación y si no se observa enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

Procedimiento para cultivo de muestra de orina

- a) Procesar toda la muestra de la micción o un mínimo de 50 mililitros.
- b) Centrifugar toda la muestra a 3000 gravedades por 15 minutos. Decantar los sobrenadantes y depositar en un tubo cónico de 50 mililitros todos los sedimentos obtenidos.
- c) Decontaminar con el método de Petroff.
- d) Inocular de 2 a 3 tubos de medio de Löwenstein Jensen con 3 a 5 gotas de sedimento.
- e) Dispersar sobre la superficie del medio.
- f) Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar de 35-37 °C.
- g) A las 48 horas, revisar en busca de contaminación y si no se observa enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

2.4. Método Ogawa – Kudoh

Debe utilizarse para procesar esputos en laboratorios sin equipamiento adecuado o suficiente para aplicar la técnica de Petroff (anexo 11). Si no se dispone de cabina de seguridad biológica, deben aplicarse las prácticas y medidas de bioseguridad recomendadas para la realización de la baciloscopia

Procedimiento

- a) Utilizar el equipo de protección personal.
- b) Preparar la mesa de trabajo.
- c) Verificar los datos de la muestra del paciente con la PCT-3 y asignar el número correlativo.
- d) Identificar los tubos con el medio de cultivo, con los datos correspondientes.
- e) Proceder a hacer un extendido con la lámina ya identificada utilizando un palillo.
- f) Abrir el envase. Elegir y recolectar con el hisopo, las partículas útiles mucopurulentas del esputo, adhiriéndolas al hisopo estéril. Cerrar el envase.
- g) Sumergir el hisopo estéril en un tubo con tres mililitros de solución de NaOH al 4% durante dos minutos exactos.
- h) Retirar el hisopo sin escurrir y sembrar en un tubo con medio de Ogawa acidificado, realizar movimientos de rotación y presión. Descartar el hisopo.
- i) Repetir el procedimiento utilizando el mismo NaOH al 4% e inocular el segundo tubo en medio de Ogawa.
- j) Descartar los hisopos en un recipiente destinado a ser esterilizado en el autoclave.
- k) Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar de 35 a 37 °C.
- l) A las 48 horas, enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

Revisión y lectura de las muestras cultivadas

Es importante recalcar que se debe asignar un día de la semana para realizar la lectura y revisión de los cultivos. En caso de que se identifique colonias sugestivas al complejo *Mycobacterium tuberculosis* u otras micobacterias, referir al LNSP, el aislamiento acompañado de la hoja de referencia de cepa (anexo 12), para su identificación.

Pasos:

- a) Revisar periódicamente los tubos inoculados.
- b) Mantener los tubos en incubación hasta las ocho semanas en el caso de medios de cultivo a base de huevos.
- c) Revisarlos bajo una fuente de luz que permita observar con claridad hasta las colonias más pequeñas.
- d) Verificar si se encuentran indicios de mala neutralización de la muestra.
- e) Reportar si se detecta contaminación.
- f) Verificar si la siembra está absorbida y el líquido se ha evaporado.

- g) Registrar si quedan restos de hidróxido de sodio en el inóculo, esto se verifica si los medios a base de huevos se aclaran hacia un tono amarillento, que lo diferencia del resto de los tubos con siembras.
- h) Debe registrarse en el libro del laboratorio si se detecta contaminación en toda la superficie de un tubo del medio sólido, descartar el tubo y continuar el proceso hasta emitir un resultado.
- i) El personal de laboratorio debe producir de inmediato, el informe para comunicar si detecta contaminación o pH inadecuado (viraje hacia al amarillo o verde intenso) en todos los tubos sembrados con la muestra de un paciente.
- j) Toda muestra extrapulmonar, debe ser resguardada, un máximo de 3 a 5 días, previo a la verificación que el tubo no se haya contaminado.
- k) Si la siembra está absorbida, ajustar la tapa para evitar la desecación del medio.
- l) Solicitar y procesar una nueva muestra del paciente, toda vez que sea posible, cuando se ha detectado contaminación o pH inadecuado del medio en todos los tubos sembrados.

Período de lectura a los siete días post siembra y luego una vez por semana

- a) Identificar tubos contaminados y proceder como se ha descrito anteriormente (anexo 13).
- b) Identificar los tubos con desarrollo de complejo *Mycobacterium tuberculosis* o de otras micobacterias.
- c) Registrar el desarrollo en el momento en que se observa y seguir los procedimientos para producir el informe con la menor demora posible.
- d) Repetir la lectura cada semana hasta emitir un resultado.

Selección de los cultivos positivos para identificación y prueba de sensibilidad

Los cultivos en medios sólidos deben reportarse de la siguiente manera:

- a) Seleccionar los cultivos positivos para su identificación y prueba de sensibilidad.
- b) Derivar al LNSP todos los tubos positivos, para prueba de sensibilidad y tipificación, en triple embalaje y cadena de frío. Los cuales deben ir acompañados de la hoja de referencia de cepas para prueba de sensibilidad y tipificación. (Ver anexo 12) y la hoja de solicitud de examen bacteriológico para tuberculosis (PCT-3).
- c) Transcribir el resultado obtenido de los registros del laboratorio en la PCT-3, utilizando la escala descrita en el cuadro 10, cuantificar los resultados positivos.
- d) Informar los cultivos positivos y los totalmente contaminados en el mismo día que son detectados.
- e) Cuando la lectura es visual, informar los cultivos negativos al finalizar la octava semana de incubación de los medios a base de huevos.

Cuadro 10. Registro de resultados de cultivo

	Registrar	Si se observa		Registrar	Si se observa
	Contaminado	Todos los tubos inoculados con la muestra contaminados		+	20 a 100 colonias Colonias separadas
	Negativo	Sin desarrollo luego de la inspección de la octava semana de incubación.		++	Más de 100 colonias Colonias separadas
	El número de colonias exacto	Entre 1 y 19 colonias en el total de medios sembrados.		+++	Colonias incontables Colonias confluentes

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019/Sección Micobacterias de Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNSP)

Descarte de tubos inoculados

Descartar los tubos, resultantes de la lectura, en un recipiente donde serán esterilizados en autoclave durante una hora a 121 °C.

Riesgo biológico inherente a los procedimientos

El personal de laboratorio respecto a la técnica del cultivo BAAR, debe cumplir estrictamente las disposiciones de medidas de bioseguridad, durante la agitación y centrifugación de tubos los cuales generan aerosoles infecciosos; ya que el riesgo es mayor cuanto mayor sea la carga de bacilos que contenga la muestra.

Contaminación cruzada

El personal de laboratorio debe evitar situaciones que pueden dar una contaminación cruzada, entre ellas, la transferencia de microorganismos, de una muestra a otra al ser procesadas en serie en el laboratorio.

Son condiciones propicias para este tipo de contaminación en el laboratorio: sobrecarga de trabajo, alta frecuencia de muestras con baciloscopía positiva en la rutina, procedimientos poco rigurosos, utilización de reactivos no alicuotados.

Organización del material y muestras del cultivo BAAR

El personal de salud debe sistematizar el trabajo para:

- a) Minimizar el riesgo biológico y de transferencia de bacilos entre distintos materiales.
- b) Evitar errores en el procesamiento de la muestra.
- c) Permitir la trazabilidad de la muestra durante los procedimientos en caso que se presenten dudas sobre los resultados.
- d) Repetir los procedimientos siempre en el mismo orden en cada día de trabajo.
- e) Ordenar los envases de las muestras, tubos y portaobjetos según su numeración.
- f) Mantener todo el material ordenado durante todo el proceso.

Morfología de las colonias

Las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* son habitualmente rugosas, secas, sin pigmentación y con aspecto de migas de pan, además son de crecimiento lento.

Los medios sólidos evidencian el desarrollo de las micobacterias con cierto retardo con relación a los líquidos, pero en cuanto se detecta el desarrollo es posible diferenciar las colonias con características de *M. tuberculosis*; si se tiene experiencia, es posible orientar con mucho acierto si se ha aislado el bacilo de la tuberculosis.

Cuando el medio de cultivo está muy húmedo, las colonias de cualquier micobacteria aparecen lisas. Si las colonias se desarrollan lentamente, no tienen pigmentación, son lisas, pequeñas o brillantes, se presenta la duda acerca si lo que se ha aislado es una micobacteria no tuberculosa.

Sin duda alguna es una micobacteria no tuberculosa si se detectan colonias de BAAR con algún tipo de pigmentación (desde ligeramente amarilla hasta anaranjada fuerte) o con abundante desarrollo en medios a base de huevos durante la primera semana de incubación. Muy excepcionalmente *Mycobacterium tuberculosis* puede aparecer tan precozmente si el inóculo es muy alto.

Si se sospecha el diagnóstico de Micobacteriosis, se deben enviar al LNSP todos los aislamientos obtenidos con distintas muestras del paciente. Está fuera del alcance de este lineamiento la identificación de micobacterias diferentes a las del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

2.5. Indicadores de calidad

Dependiendo de la carga de trabajo y de la incidencia de casos con bacteriología positiva, el análisis mensual, trimestral o semestral del registro del laboratorio permite detectar errores sistemáticos y sostenidos en el tiempo.

Resulta de interés para controlar la calidad del cultivo, clasificar a los pacientes adultos que se hayan diagnosticado con tuberculosis pulmonar confirmada bacteriológicamente, en alguna de las siguientes categorías:

- A. Baciloscopía (+) y cultivo (+)
- B. Baciloscopía (+) y cultivo no realizado
- C. Baciloscopía (-) y cultivo (+)
- D. Baciloscopía (+) y cultivo (-)
- E. Baciloscopía (+) y cultivo contaminado

F. Baciloscopia no realizada y cultivo (+)

Con el total de casos clasificados en cada una de estas categorías, se podrán calcular los indicadores descritos en el cuadro 11.:

Cuadro 11. Indicadores de calidad de cultivo

Indicador	Calculo según categorías	Valor esperado	Fuente
Porcentaje de contaminación	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de tubos contaminados}}{\text{N}^\circ \text{ total de tubos sembrados}} \times 100$	3 - 5% en medios sólidos 8 - 10% en medios líquidos	Libreta de registros de cultivos
Relación de resultados entre baciloscopia y cultivo: Proporción de muestras baciloscopia positiva con cultivo positivo	$\frac{A}{A+B+D+E} \times 100$	>95 - 98%	Libreta de registros de cultivos
Aporte del cultivo al diagnóstico	$\frac{C}{\text{Total de Casos}} \times 100$	15-20%	Libreta de registros de cultivos
Tiempo para emisión de informes de muestras procesadas por cultivo en medio solido	$\frac{\text{N}^\circ \text{ de Informes emitidos a tiempo}}{\text{N}^\circ \text{ Total de informes cuando se utiliza medio solido}} \times 100$ (\leq a 3 días)	Al menos el 95%	Libreta de registros de Cultivos e informe de entrega de resultados

Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, Normas y Guía Técnica Parte II Cultivo. 2008

Cuadro 12. Interpretación de indicadores

Método de Petroffi modificado y Ogawa Kudoh	Valor normal (%)	Señales de alarma	
		Si es mucho mayor investigar	Si es mucho menor investigar
Aporte del cultivo al diagnóstico bacteriológico de tuberculosis.	20	A	B y C
Porcentaje muestras BK (+) Cultivo (-)	2-3	C y D	No hay problema
Porcentaje de cultivos con positividad menor a la de la baciloscopia.	3	C y E	No hay problema
Porcentaje de tubos contaminados	3-5	F	G
A	Errores de lectura de baciloscopias: «falsos negativos». Se está investigando un alto porcentaje de casos de tuberculosis pulmonar poco avanzada, incluyendo pediátricos (no indica problema técnico de laboratorio).		
B	Deficiente solicitud de cultivos (se están investigando pacientes que no son SR)		

C	Excesiva demora entre la toma y procesamiento de las muestras decontaminación muy enérgica de las muestras (excesiva concentración y/o tiempo de contacto con el decontaminante). Baja velocidad o sobrecalentamiento en la centrífuga Baja sensibilidad de los medios (falta de homogeneidad, sobrecalentamiento al coagular, exceso de verde de malaquita, pH excesivamente ácido) Incubación a temperaturas muy altas u oscilantes
D	Errores de lectura de baciloscopías: «falsos positivos»
E	Tendencia a asignar a la baciloscopía una positividad mayor a la real
F	Muestras conservadas sin refrigeración Demora entre la toma y procesamiento de las muestras Concentración de decontaminante más baja que lo normalizado Escaso tiempo de contacto de la muestra con el decontaminante; Defectos en el proceso de esterilización Descuidos en procedimientos que requieren esterilidad (mal uso de mechero y/o de la cabina de seguridad biológica, excesivo movimiento de gente en el área de trabajo, generación de corrientes de aire por ventiladores o equipo de aire acondicionado, otros.)
G	Concentración de decontaminante más alta que lo normalizado Excesivo tiempo de exposición de la muestra con el decontaminante Concentración de verde de malaquita en el medio más alta que lo normalizado

Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica Parte II Cultivo. 2008

Es importante recalcar que se debe asignar un día de la semana para realizar la lectura y revisión de los cultivos.

3. Pruebas moleculares

3.1. Xpert MTB/RIF Ultra

Es una prueba molecular que permite detectar ácidos nucleicos del gen *rpo B* específica del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina

Se realiza en forma directa, es decir, a partir de muestras tanto pulmonares como extrapulmonares, sin necesidad de esperar el resultado del cultivo.

Principios de la prueba

- Es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (amplificación y detección al mismo tiempo).
- Sistema completo de control interno de los reactivos, por lo que no tiene la necesidad de utilizar controles externos positivos y negativos por separado.
- Ultrasonido integrado para la rápida lisis de la célula para liberar el Ácido desoxirribonucleico (ADN).
- Los motores son dirigidos por el software para realizar el movimiento de las válvulas y accionadores hidráulicos acoplados.

- e) Cuenta con tecnología de fluido inteligente, ya que los líquidos fluyen directamente por micro válvulas y permite el uso de cantidades mínimas de los componentes de la reacción.
- f) La interpretación de los resultados y análisis de los datos ocurre de manera automática.

Ventajas

- a) Es adecuado para todos los niveles de laboratorios con una infraestructura apropiada y con una carga de trabajo acorde a la capacidad del equipo.
- b) Detecta el Complejo M. tuberculosis y resistencia a rifampicina en el mismo cartucho.
- c) Puede ser usada como prueba diagnóstica independiente.

Desventajas

- a) Requiere suministro de electricidad estable e ininterrumpida.
- b) Calibración anual de los módulos.
- c) Ambiente con temperaturas entre 15 a 30 °C.
- d) Los cartuchos y reactivos deben ser almacenados entre 2-28 °C.
- e) La prueba no debe ser utilizada para monitorizar el control del tratamiento.
- f) La prueba de sensibilidad a drogas (PSD) es aún requerida para la detección de resistencia a otras drogas diferentes a rifampicina.

Motivos para indicar la prueba molecular rápida

1. SR con 2 BK (-) y con TB presuntiva
2. Persona con VIH con signos y síntomas sugestivos de TB
3. Personas privadas de libertad, o con antecedente; con signos y síntomas sugestivos de TB
4. SR con diabetes.
5. SR con inmunodeficiencias
6. Caso TB que no negativiza al segundo, cuarto o quinto mes de tratamiento; o en el noveno mes, en caso de retratamiento.
7. Antes tratados (recaídas, fracasos, pérdida en el seguimiento)
8. Sospecha de TB extrapulmonar
9. Contactos de caso con TB-MDR, TB-RR O TB-DR
10. Niños con TB presuntiva
11. Personal de salud
12. Otros (especificar)
13. Indicación por resultado previo (en caso que el resultado de error o inválido, se procesa la muestra nuevamente o se solicita nueva muestra).

El equipo, materiales y reactivos necesarios para realizar el procesamiento de las muestras, se describe en el cuadro 13.

Cuadro 13. Equipo, materiales y reactivos

Equipo	Materiales
<ul style="list-style-type: none"> • Refrigeradora • Equipo para la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico con computadora (laptop o PC) y lector de código de barras • Aire acondicionado • Autoclave • Cronómetro • Vortex • Cabina de seguridad biológica tipo II A2 (necesaria para muestras extrapulmonares) • Centrífuga a 3,000 gravedades 	<ul style="list-style-type: none"> • Kits de cartuchos de la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico • Kits de cartuchos de calibración • Reactivo inactivador para muestras (Buffer): frascos de 8 ml, 1 por prueba. • Pipetas estériles del kit, descartables 1 por prueba • Equipo de protección personal • Tubos cónicos de 15 o 50 mililitros (opcional) • Papel toalla • Algodón • Alcohol al 70% • Mechero • Fósforos • Hipoclorito de sodio al 0,5% • Papel • Buffer Fosfatos • Solución salina fisiológica estéril • Descarte para desechos bioinfecciosos • Mortero con pistilo estériles • Bisturí o tijera estéril • Pinza con garra estéril • Plumón o marcador permanente • Agua esterilizada • Bicarbonato de sodio al 1%

Fuente: Equipo técnico MINSAL, 2019

Recepción, conservación y transporte de las muestras

Ver información citada previamente en baciloscopia y cuadro 9 en sección de cultivo.

Preparación de la muestra

Espuito

- a) Abrir el frasco de espuito cuidadosamente.
- b) Añadir directamente en el frasco de la muestra, 2 volúmenes de buffer para un volumen de muestra (proporción 2:1), evitando la formación de aerosoles
- c) Si la muestra supera el volumen recomendado: pasar un aproximado de 2 ml de espuito a otro recipiente, adicionar el buffer para lograr la proporción recomendada 2:1 (1 mililitro de espuito es la cantidad mínima, pero de 3-4 mililitros es la cantidad requerida ideal).
- d) En el caso de muestras demasiado viscosas: mezclar bien (de preferencia en mezclador tipo vórtex) y esperar hasta que la muestra alcance la consistencia adecuada para ser procesada.
- e) Tapar y cerrar bien el frasco, agitar enérgicamente de 10 a 20 veces o utilizar un mezclador tipo vórtex durante 10 segundos como mínimo.
- f) Esperar a que la muestra se homogenice, mezclando cada 5 minutos por 15 minutos.

- g) Después de homogenizada la muestra, esperar por 5 minutos e inocular 2.0 mililitros de la muestra inactivada dentro del cartucho.

Muestras concentradas

- a) Utilización de esputo procesado: se puede utilizar el sedimento resultante de la decontaminación por el método de Petroff.
- b) LCR y otros líquidos: pueden ser procesados de una manera similar a la del esputo; sin embargo, la concentración de la muestra por centrifugación proporciona mejores resultados en la prueba.
- c) Se requiere un laboratorio con una cabina de seguridad biológica (CSB) para abrir las camisas de la centrífuga y decantar el sobrenadante.
- d) A 0.5 mililitros del sedimento de muestra concentrada o decontaminada, añadir 1.5 mililitros de buffer.
- e) Cerrar la tapa del frasco y agitar enérgicamente de 10 a 20 veces o utilizar un mezclador tipo vórtex durante 10 segundos como mínimo.
- f) Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- g) Luego agitar nuevamente de 10 a 20 veces o utilizar un mezclador tipo vórtex, durante 10 segundos como mínimo.
- h) Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- i) Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra debe estar líquida antes de ser procesada.
- j) Verificar que se encuentra sin grumos visibles.
- k) Después de homogenizada la muestra, esperar por 5 minutos e inocular 2.0 mililitros del sedimento o concentrado dentro del cartucho.

Procesamiento de muestras extrapulmonares en cartucho Xpert MTB/RIF Ultra

Las guías actualizadas en el año 2021 establecen que la prueba Xpert MTB/RIF ULTRA se puede utilizar para procesar muestras de LCR y muestras de tejido homogeneizadas (es decir, biopsias de ganglios linfáticos u otros tejidos), heces (en niños), orinas (en pacientes VIH positivos) o muestras descontaminadas (si no se recolecta de manera estéril), si el cultivo se realiza al mismo tiempo se mejora la sensibilidad de detección de los verdaderos positivos.

Las muestras deben transportarse y almacenarse entre 2 y 8 °C antes de su procesamiento.

Líquido cefalorraquídeo

El método óptimo para procesar LCR con Xpert MTB/RIF Ultra depende del volumen de la muestra disponible para la prueba. Las muestras de LCR teñidas con sangre y xantocrómicas pueden producir resultados falsos negativos debido a la inhibición de la PCR, por lo que, en la medida de lo posible, este tipo de muestra debe cultivarse a la par de la prueba molecular Xpert Ultra.

Si hay más de 5 ml de LCR disponible para la prueba:

- a) Transferir la muestra de LCR a un tubo de centrifuga cónico y concentrar la muestra a 3,000 g durante 15 minutos.
- b) Verter con cuidado el sobrenadante en otro tubo estéril. Asegurarse de dejar aproximadamente 0.5 ml de sobrenadante en el tubo, para garantizar de que el sedimento permanezca intacto.
- c) El LCR concentrado debe decantarse en una cabina de seguridad biológica.
- d) Resuspender el sedimento hasta un volumen final de 2 ml, agregando el reactivo de muestra Xpert MTB/RIF Ultra.
- e) Mezclar el sedimento con el buffer mediante agitación con mezclador tipo vórtex, para garantizar que nada de la suspensión quede en los lados o en el fondo del tubo.
- f) Después de siete a ocho minutos de incubación a temperatura ambiente, agitar la muestra por segunda vez. Incubar de siete a ocho minutos adicionales (15 minutos en total de incubación) a temperatura ambiente.
- g) Etiquetar un cartucho Xpert MTB/RIF Ultra con el número de identificación de la muestra.
- h) Con una pipeta de transferencia nueva, transferir 2 ml de la muestra de LCR resuspendida al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra.
- i) Cargar el cartucho en el instrumento Gene Xpert siguiendo las instrucciones del fabricante.

Si hay de 1 a 5 ml de LCR disponible:

- a) Agregar un volumen igual de buffer al LCR.
- b) Mezclar la muestra y el buffer con agitación como se describió anteriormente.
- c) Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, agitar la muestra en un mezclador tipo vórtex por segunda vez.
- d) Incubar durante siete a ocho minutos adicionales (15 minutos de incubación total) a temperatura ambiente.
- e) Agregar 2 ml de la mezcla de la muestra directamente al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra.
- f) Cargar el cartucho en el instrumento Gene Xpert siguiendo las instrucciones del fabricante.

Si hay de 0.1 a 1 ml de LCR disponible:

- a) Agregar suficiente buffer a la muestra de LCR para lograr un volumen final de 2 ml.
- b) Mezclar la muestra y el buffer agitando en un mezclador tipo vórtex como se describió anteriormente.
- c) Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, agitar la muestra por segunda vez. Incubar de siete a ocho minutos adicionales (15 minutos en total incubación) a temperatura ambiente.
- d) Agregar los 2 ml de mezcla de muestra directamente al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra.
- e) Cargar el cartucho en el instrumento Gene Xpert siguiendo las instrucciones del fabricante.

Si hay menos de 0.1 ml de LCR disponible

Este es un volumen de muestra insuficiente para realizar pruebas con Xpert MTB/RIF Ultra, por lo que es recomendable que la muestra solamente se cultive.

Ganglios linfáticos y otros tejidos (recolección estéril)

Todas las manipulaciones deben realizarse en una cabina de seguridad biológica

- a) Cortar la muestra de tejido en trozos pequeños en un mortero, homogeneizador o triturador de tejidos estéril utilizando pinzas con garra, bisturís y tijeras (si se tienen disponibles).
- b) Agregar aproximadamente 2 ml de solución salina estéril.
- c) Triturar el tejido y solución salina estéril con un mortero (u homogeneizador o triturador de tejidos) hasta obtener una suspensión homogénea.
- d) Colocar aproximadamente 0.7 ml de la suspensión homogénea en un tubo cónico con tapón de rosca estéril, utilizando una pipeta de transferencia.
- e) Evitar transferir cualquier grumo de tejido que no se haya homogeneizado correctamente.
- f) Utilizar una pipeta de transferencia para duplicar el volumen de la muestra con el buffer Xpert MTB/RIF Ultra (es decir, agregar 1.4 ml de buffer por 0.7 ml de suspensión homogénea).
- g) Agitar el tubo vigorosamente de 10 a 20 veces o agitarlo en un mezclador tipo vórtex durante al menos 10 segundos.
- h) Incubar el tubo con la preparación de la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego agitar la muestra de nuevo, durante otras 10-20 veces o agitar en mezclador tipo vórtex durante al menos 10 segundos.
- i) Incubar el tubo con la preparación de la muestra a temperatura ambiente, durante 5 minutos más.
- j) Con una pipeta de transferencia nueva, transferir 2 ml de la muestra procesada al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra.
- k) Cargar el cartucho en el instrumento Gene Xpert siguiendo las instrucciones del fabricante.
- l) Para las muestras no recolectadas de manera estéril se sugiere una decontaminación/protocolo de concentración similar al utilizado para el esputo.

Muestras de huesos (seguir instrucciones del macerado de tejido) y articulaciones

- a) Obtener 1 ml de muestra purulenta y mezclar con 2 ml de buffer.
- b) Agitar la muestra en el mezclador tipo vórtex durante, al menos, 10 segundos, luego incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Mezclar con mezclador tipo vórtex otros 10 segundos e incubar a temperatura ambiente durante cinco minutos.
- c) Agregar 2 ml de la mezcla al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra y cargar el cartucho en el instrumento siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aspirados bronquiales o lavados bronco alveolares obtenidos por fibrobronoscopias

- a) Descontaminar la muestra con NaOH al 4% (el mismo procedimiento realizado con el esputo) y concentrar la muestra por centrifugación a 3000 g durante 20 minutos. Desechar el sobrenadante dejando aproximadamente 0.5 ml del sobrenadante y resuspender el sedimento.
- b) Agregar buffer en una proporción de 2: 1 al sedimento re suspendido.
- c) Mezclar la muestra y el buffer agitando con mezclador tipo vórtex
- d) Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, realizar un segundo paso de agitación.
- e) Incubar de siete a ocho minutos adicionales (15 minutos en total incubación) a temperatura ambiente.
- f) Agregar 2 ml de la muestra tratada con el buffer al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra y cargar el cartucho en el instrumento siguiendo las instrucciones del fabricante.

Muestras de heces

(Recomendación de las guías consolidadas en el Módulo 3: Diagnóstico de tuberculosis) En niños con signos y síntomas de TB pulmonar, Xpert MTB/RIF Ultra, debe usarse como prueba diagnóstica inicial, para la detección de la TB y de la resistencia a la rifampicina en muestras de esputo, aspirado nasofaríngeo y heces en lugar de la baciloscopia, el cultivo y las PSF fenotípicas.

Método SOS (Simple one-step) de procesamiento de heces

En el método de procesamiento de heces SOS, se realiza un paso para liberar *M. tuberculosis* de las heces. Las partículas se sedimentan por gravedad, y se supone que esto permite que los bacilos de la TB floten en la parte superior de la solución acuosa, debido a su pared celular lipídica.

Requisitos de bioseguridad

En el método SOS de procesamiento de heces, estas se añaden directamente al frasco de reactivo para muestras que se proporciona en el kit Xpert; esto provoca la inactivación inmediata de las bacterias. Por lo tanto, el método SOS de procesamiento de heces, se puede realizar en un espacio abierto y bien ventilado, con prácticas adecuadas de reducción de formación de aerosoles y el uso apropiado de equipo de protección personal.

Procedimiento

- a) Antes de procesar las heces, se evalúa la consistencia de la muestra mediante la escala de heces de Bristol. (Ver figura 2.)

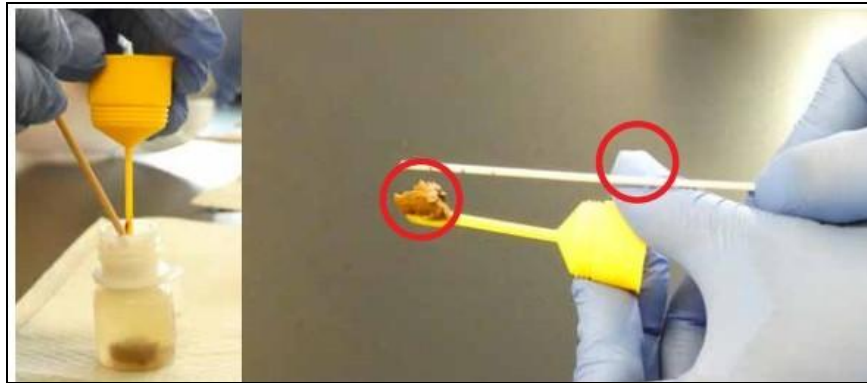
Figura 2. Escala de Bristol de clasificación de las heces



Fuente: Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Geneva: ; 2022. Licence:

- b) En el caso de las heces con aspecto de tipo 1 a 5 en la escala de Bristol (heces consistentes), se transfieren directamente 0,8 g de heces o una cantidad del tamaño de la uña del pulgar del recipiente que contiene la muestra de heces, al frasco con buffer usando una varilla de madera o un aplicador. (Figura 3)

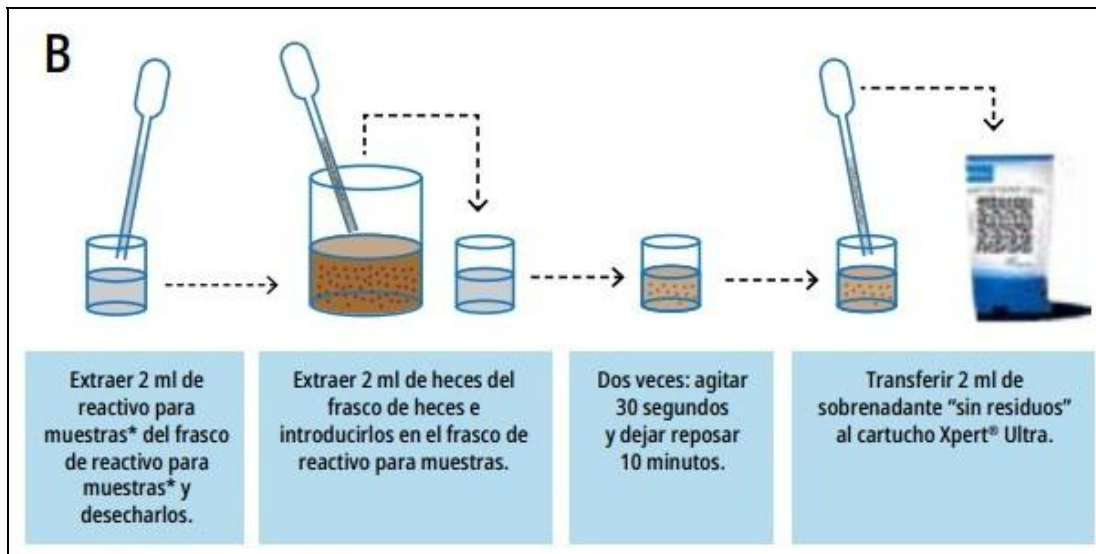
Figura 3. Procesamiento de heces consistentes



Fuente: Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Geneva: 2022.

- c) En cuanto a las heces con aspecto de tipo 6 y 7 en la escala de Bristol (heces líquidas), se extraen 2 ml de buffer del frasco de buffer y se descarta, se transfieren 2 ml de heces al frasco de buffer con una pipeta de transferencia. (Figura 4.)

Figura 4. Procesamiento de heces líquidas



Fuente: Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Geneva2022.

- d) Con todos los tipos de heces, el buffer se agita enérgicamente durante 30 segundos y luego se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- e) Este paso se repite una vez.
- f) Después de comprobar cuidadosamente que las partículas y los restos sólidos se han asentado, se transfieren 2 ml del sobrenadante del frasco de buffer al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra.

- g) A continuación, el cartucho se introduce en el instrumento Gene Xpert.
- h) El uso del instrumento Gene Xpert y la interpretación de los resultados de la prueba se realizan conforme a las instrucciones del fabricante.

Aspirados gástricos

- a) Neutralizar 5 ml de aspirado gástrico con un volumen igual de bicarbonato de sodio estéril al 1%.
- b) Almacenar congelado en ≤ -20 °C si la muestra no se va a analizar inmediatamente.
- c) Descongelar la muestra (si se ha congelado previamente), homogeneizar y digerir en NaOH al 4% y agitar durante 30 segundos.
- d) Incubar la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de neutralización con Buffer fosfato, luego centrifugar a 3000 g durante 15 minutos.
- e) Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 2 ml de buffer fosfato.
- f) Para realizar la prueba en Xpert MTB/RIF Ultra, agregar 1.5 ml de buffer a 0.5 ml del sedimento concentrado.
- g) Mezclar la muestra y el buffer agitando con mezclador tipo vórtex. Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, agitar la muestra por segunda vez.
- h) Incubar de siete a ocho minutos adicionales (15 minutos en total incubación) a temperatura ambiente.
- i) Añadir 2 ml de la muestra tratada con el buffer al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra y cargarlo en el instrumento siguiendo las instrucciones del fabricante.

Muestras de orina

Alternativa 1:

- a) Obtener 1 ml de orina sin procesar y sin diluir.
- b) Agregar el buffer en una proporción de 2: 1 a la orina y mezclar vigorosamente o agitar en mezclador tipo vórtex .
- c) Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, agitar la muestra por segunda vez.
- d) Incubar la muestra durante siete a ocho minutos adicionales (15 minutos de incubación total) a temperatura ambiente.
- e) Agregar 2 ml de la muestra tratada con el buffer, al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra y cargar el cartucho en el instrumento.

Alternativa 2:

- a) Obtener 2 ml de orina sin procesar y sin diluir.
- b) Centrifugar la orina a 3000 g durante 15 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 0.75 ml de buffer fosfato.
- c) Agregar el buffer en una proporción de 2: 1 al sedimento de orina.
- d) Mezclar la muestra y el buffer agitando con mezclador tipo vórtex .

- e) Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, agitar la muestra por segunda vez. Incubar de siete a ocho minutos adicionales (15 minutos en total incubación) a temperatura ambiente.
- f) Añadir 2 ml de la muestra tratada con el buffer al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra y cargar el cartucho en el instrumento siguiendo las instrucciones del fabricante.

Alternativa 3:

- a) Centrifugar de 2 a 20 ml de orina a 3000 g durante 15 minutos. Desechar el sobrenadante, dejando aproximadamente 0.5 ml del sobrenadante y resuspender el sedimento de la muestra de orina en 1 ml de buffer fosfato.
- b) Agregar buffer en una proporción de 2: 1 a la orina resuspendida.
- c) Mezclar la muestra y el buffer en el mezclador tipo vórtex.
- d) Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, realizar un segundo paso de agitación con mezclador tipo vórtex .
- e) Incubar de siete a ocho minutos adicionales (15 minutos de incubación total) a temperatura ambiente.
- f) Añadir 2 ml de la muestra tratada con el buffer al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra y cargar el cartucho en el instrumento siguiendo las instrucciones del fabricante.

Alternativa 4:

- a) Para orina congelada (volumen 30-40 ml), descongelar y centrifugar la muestra a 3000 g durante 15 minutos.
- b) Retirar el sobrenadante con cuidado asegurándose de retener el sedimento; dejando 1.0 ml de sobrenadante.
- c) Tomar el sedimento y resuspenderlo en 0.75 ml del sobrenadante guardado.
- d) Agregar buffer en una proporción de 2: 1 a la orina resuspendida.
- e) Mezclar la muestra y el buffer agitando con mezclador tipo vórtex.
- f) Después de siete a ocho minutos a temperatura ambiente, agitar la muestra por segunda vez.
- g) Incubar de siete a ocho minutos adicionales (15 minutos total de incubación) a temperatura ambiente.
- h) Añadir 2 ml de la muestra tratada con el buffer al cartucho Xpert MTB/RIF Ultra y cargar el cartucho en el instrumento siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estabilidad de la muestra ya inactivada

Las muestras inactivadas son estables a temperatura ambiente por 5 horas; si no es posible procesarlas, pueden mantenerse hasta 12 horas en refrigeración a temperatura entre 2 y 8 grados centígrados.

Preparación del cartucho

- a) Preparar el número de muestras de acuerdo a la cantidad de módulos disponibles en el instrumento Gene Xpert (o sea, solo los que se encuentren en funcionamiento).

- b) Iniciar la preparación de las muestras dentro de los 30 minutos antes que un módulo esté disponible.
- c) Los cartuchos deben estar a temperatura ambiente al momento de usarlos, por lo que debe esperar al menos 15 minutos luego de sacarlos de refrigeración.
- d) No abrir el cartucho hasta estar próximo a realizar la prueba.
- e) Utilizar el cartucho dentro de 30 minutos después que haya sido abierto.
- f) Tomar el cartucho sólo por los lados.
- g) No tocar el código de barras o el tubo de reacción en la parte trasera.
- h) Identificar el cartucho con el número de muestra, escribiendo al lado del cartucho o pegar la etiqueta de identificación.
- i) No colocar la identificación en la cubierta del cartucho ni obstruir el código de barras 2D.
- j) Abrir el cartucho y depositar 2 mililitros de la muestra preparada usando la pipeta plástica de transferencia (suministrada en el kit).
- k) Introducir la muestra cuidadosamente.
- l) Cerrar la tapa firmemente.
- m) Iniciar la prueba.

Cuidados

- a) Evitar pipetear cualquier partícula sólida de la muestra al cartucho.
- b) Evitar la formación de burbujas al pipetear la mezcla de la muestra al cartucho.
- c) No utilizar el cartucho si la fecha de uso ha caducado, la tapa de cierre está rota o ha sido accidentalmente abierta, se encuentre húmedo, se ha caído o sacudido el cartucho después de haber agregado la muestra preparada.
- d) Evitar usarlo si el tubo de reacción en la parte posterior, parece haber sido dañado.
- e) Cada cartucho es para un solo uso, y no se puede volver a utilizar una vez que ha sido escaneado.

Inicio de la prueba

- a) El instrumento de la prueba molecular rápida mediante amplificación de ácido nucleico, ya debe estar encendido (una pequeña luz azul aparece en el panel frontal).
- b) Iniciar sesión en Windows como:
- c) Nombre de usuario: Cepheid, contraseña: cphd.
- d) Hacer doble click en el icono «Gene Xpert Dx» en el escritorio.
- e) Acceder con la cuenta de usuario.
- f) Hacer click en «no» en el cuadro de diálogo «Gestión de base de datos» para empezar el día de trabajo.
- g) Hacer click en « Check Status» para confirmar que todos los módulos están disponibles.
- h) Hacer click en «Creat test».
- i) Abrir una ventana solicitando escanear el código de barras del cartucho.

- j) Tomar el lector de código de barras y escanearlo manteniendo presionado el botón amarillo, si el escáner no funciona se puede introducir manualmente el código de barras escribiendo los números que aparecen en las dos líneas del cartucho.
- k) Después de haber escaneado el código de barras, aparecerá una ventana en la que se introducirá el nombre de identificación del paciente y la identificación (ID) de la muestra.
- l) De forma predeterminada, el software en pantalla muestra el tipo de prueba a realizar.
- m) El módulo donde se coloca el cartucho se selecciona automáticamente, pero puede ser seleccionado de forma manual.
- n) Hacer click en « start test».
- o) Abrir completamente la puerta del módulo elegido, el cual estará indicado por una luz verde parpadeante por encima del módulo seleccionado.
- p) Insertar el cartucho cuidadosamente con el código de barras hacia adelante.
- q) Al cerrar la puerta del módulo con el cartucho, la prueba se iniciará automáticamente.

Es recomendable que exista un punto de red para establecer comunicación con el proveedor del equipo para correcciones, mantenimiento o fallo del equipo.

Manejo de desechos

Se lleva a cabo siguiendo las normas vigentes en el país para el manejo de desecho biológico infeccioso.

Informe de resultados

Cuadro 14. Posibles resultados de prueba molecular

Resultado del equipo	Reportar
CMTB Not Detected	CMTB No detectado
CMTB Detected Rif Resistance Not Detected	CMTB detectado resistencia a rifampicina no detectada
CMTB Detected Rif Resistance Detected	CMTB detectado resistencia a rifampicina detectada Solicitar una muestra adicional para realizar cultivo y PSD, para determinar el perfil completo de resistencia a fármacos y confirmar TB-MDR y XDR
CMTB Trace Detected Rif Resistance Inderterminate	CMTB detectado trazas resistencia a rifampicina indeterminada Reportar tal como lo da el equipo y solicitar nueva muestra para cultivo y PSD
Invalid	Inválido No se reporta este resultado del equipo hasta repetir la prueba con la misma muestra*
Error	Error No se reporta este resultado del equipo hasta repetir la prueba con la misma muestra*
Not Result	No resultado No se reporta este resultado del equipo hasta repetir la prueba con la misma muestra*

*Si persiste el resultado inválido, error, no resultado se reporta tal cual y se solicita nueva muestra.

Fuente: Manual del operador del equipo Gene Xpert.

Cómo interpretar un resultado “Traza”

Traza significa que se han detectado niveles muy bajos de CMTB, por lo tanto, no se puede detectar resistencia a rifampicina.

Este resultado es suficiente para iniciar tratamiento.

Indicadores de calidad

Cada equipo debe ser monitoreado mensualmente usando el siguiente conjunto mínimo de indicadores para evaluar el uso adecuado:

- Número de pruebas realizadas por mes.
- Número y proporción de CMTB detectado, resistencia a RIF no detectada.
- Número y proporción de CMTB detectado, resistencia a RIF detectada.
- Número y proporción de CMTB detectado, RIF indeterminada.
- Número y proporción de CMTB no detectado.
- Número y proporción de errores.
- Número y proporción de resultados inválidos.
- Número y proporción de ausencia de resultados.

Cuadro 15. Estimación de indicadores de desempeño, prueba molecular Xpert MTB/RIF Ultra

Indicador	Cálculo	Valor Esperado	Fuente
Número y porcentaje de CMTB detectado	$\frac{\text{Número de CMTB detectado} \times 100}{\text{Número de pruebas realizadas}}$	10%*	Libro de Registro de Gene Xpert
Número y porcentaje de CMTB detectado RR detectada	$\frac{\text{Número de CMTB detectado RR detectada} \times 100}{\text{Número de CMTB detectado}}$	No aplica	
Número y porcentaje de CMTB detectado trazas RR indeterminada	$\frac{\text{Número de CMTB detectado trazas RR indeterminada} \times 100}{\text{Número de pruebas realizadas}}$	No aplica	
Número y Porcentaje de Errores	$\frac{\text{Número de errores}}{\text{Número de pruebas realizadas}} \times 100$	< 3%	
Número y porcentaje de resultados inválidos	$\frac{\text{Número de resultados inválidos}}{\text{Número de pruebas realizadas}} \times 100$	< 1%	
Número y porcentaje de muestras sin resultado	$\frac{\text{Número de sin resultados}}{\text{Número de pruebas realizadas}} \times 100$	< 1%	
Porcentaje de informes emitidos en tiempo oportuno	$\frac{\text{Número de informes emitidos a término} \times 100}{\text{Número total de informes}}$	Al menos 95%	

* Cuando se utiliza el método molecular cerrado en muestras pulmonares.

Fuente: Manual para el Diagnóstico de la Tuberculosis Parte 4: Manual de Procedimientos de Evaluación Externa de Calidad de los Métodos Bacteriológicos aplicados al Diagnóstico y Control de Tratamiento de la Tuberculosis. Febrero 2019.

3.2. Xpert MTB/XDR

Es una prueba in vitro de reacción en cadena de la polimerasa anidada en tiempo real (PCR), realizado en el instrumento Gene Xpert, para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* ampliamente resistente a los medicamentos (XDR), detecta ADN en muestras de esputo no procesadas, sedimentos concentrados preparados a partir de esputo o tubos de cultivo en MGIT.

En muestras donde se detecta CMTB, el ensayo Xpert MTB/XDR también puede detectar resistencia a isoniazida (INH), Etionamida (ETH), mutaciones asociadas a la resistencia a la fluoroquinolona (FLQ) y mutaciones asociadas a fármacos inyectables de segunda línea (SLID)

El ensayo Xpert MTB/XDR está diseñado para su uso como prueba refleja para una muestra, por lo tanto, se debe tener una prueba Xpert MTB/RIF Ultra con un resultado de CMTB detectado.

No se puede realizar el ensayo Xpert MTB/XDR sin antes realizar Xpert MTB/RIF Ultra.

La prueba molecular XDR, se indicará en los casos siguientes:

- a) Casos TB-RR
- b) Antes tratados (recaídas, fracasos, pérdidas en el seguimiento)
- c) Contacto de paciente TB-RR; TB-MDR
- d) Pacientes que negativizan al segundo mes de tratamiento, pero en el control posterior, nuevamente presentan bacteriología positiva.
- e) Paciente que la PSD en medio sólido o líquido resulte con resistencia a un fármaco.

Aspectos a considerar para la solicitud de muestras para estudio Xpert MTB/XDR

- a) Siempre antes de “correr” el cartucho Xpert TB XDR se debe de hacer un Xpert MTB/RIF Ultra.
- b) Referir siempre una nueva muestra al establecimiento que tiene disponible la prueba Xpert MTB/XDR, acompañada del formulario PCT-3.
- c) Ante resultados RR solicitar nueva muestra y enviar para la prueba Xpert MTB -XDR, esto aplica para los establecimientos que no cuentan con dicha prueba
- d) Y en el caso que el resultado de la prueba XDR sea CMTB no detectado, se reporta y se debe solicitar nueva muestra para cultivo BAAR y PSD.

La muestra debe ser enviada en triple embalaje y en cadena de frío de 2 a 8 °C, después de su obtención en un tiempo de 24 a 48 horas como máximo.

Cuadro 16. Consideraciones generales para prueba Xpert MTB/XDR, en los establecimientos que realizan la prueba

Muestras a procesar*	Espustos, sedimentos de esputo
Tiempo para obtener resultados	90 minutos
Preparación de la muestra	El mismo procedimiento para la prueba Xpert MTB/RIF Ultra
Almacenamiento de muestras	Espustos sin procesar, temperatura ambiente hasta 7 días Sedimentos de esputo 2 a 8 °C hasta 7 días
Muestras tratadas con buffier	Temperatura ambiente, 2 horas. 30 min. 2-8 °C, 4 horas.
Volumen mínimo de muestra	Esputo sin procesar: 1.0 ml Sedimento de esputo: 0.5 ml
Límite de detección	Esputo sin procesar: 136 UFC/ml Sedimento de esputo: 86 UFC/ml
Materiales y reactivos	Los recomendados por el fabricante, según la metodología

*Se han generado resultados válidos con Xpert MTB/XDR utilizando cultivos positivos MTB de un MGIT. Para probar aislados de MTB de las botellas de cultivo positivo MGIT, use al menos 1.0 ml de material de cultivo.

Fuente: Manual de usuario Xpert MTB/XDR Cepheid. 2021

Cuadro 17. Blancos diana incorporados en el ensayo Xpert MTB/XDR para identificar o inferir resistencia a los medicamentos.

Fármaco	Blanco diana
Isoniazida	<i>inhA</i> promotor
	<i>katG</i>
	<i>fabG1</i>
	<i>oxyR- ahpC</i> region intergenetica
Etionamida	<i>inhA</i> promotor
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>
	<i>gyrB</i>
Amikacina, kanamicina, capreomicina	<i>rrs</i>
	<i>eis</i> promotor

Fuente: Manual de usuario Xpert MTB/XDR Cepheid. 2021

Cuadro 18. Posibles resultados de la prueba Xpert MTB/XDR

Drogas	Resultado
N/A	INVALID/ERROR/NO RESULT
	MTB DETECTED
	MTB NOT DETECTED
Isoniazida	Low INH Resistance DETECTED
	INH Resistance DETECTED
	INH Resistance NOT DETECTED
	INH Resistance INDETERMINATE
Fluoroquinolonas	Low FLQ Resistance DETECTED
	FLQ Resistance DETECTED
	FLQ Resistance NOT DETECTED
	FLQ Resistance INDETERMINATE
Amikacina	AMK Resistance DETECTED
	AMK Resistance NOT DETECTED
	AMK Resistance INDETERMINATE
Kanamicina	KAN Resistance DETECTED
	KAN Resistance NOT DETECTED
	KAN Resistance INDETERMINATE
Capreomicina	CAP Resistance DETECTED
	CAP Resistance NOT DETECTED
	CAP Resistance INDETERMINATE
Etionamida ^a	ETH Resistance DETECTED
	ETH Resistance NOT DETECTED

a

Etionamida^a no dará indeterminado por diseño de ensayo

Fuente: Manual de usuario del Xpert MTB-XDR

4. Prueba LF-LAM para detección de antígeno de lipoarabinomano

4.1 Principios de la prueba

LF-LAM es una prueba mediante inmunocromatografía para la detección cualitativa del antígeno LAM a partir de micobacterias en muestras de orina humana. El LAM es un componente lipopolisacárido importante de la pared celular externa de las micobacterias. En las personas con infección por el VIH y enfermas de gravedad, la TB puede diseminarse a diversos órganos.

Puesto que el LAM es filtrado por los riñones, es detectable en la orina, particularmente en pacientes con infección por el VIH en fase avanzada y TB diseminada.

La detección del LAM en la orina indica un cuadro grave, que requiere tratamiento inmediato. Además, en pacientes inmunodeprimidos con TB, la respuesta inmunitaria habitual no logra contener a los bacilos debido al nivel bajo de linfocitos CD4 y al deterioro de la respuesta del paciente; por lo tanto, los bacilos de TB pueden ser degradados y excretados por procesos

corporales normales. En ambos casos, el antígeno micobacteriano LAM puede estar presente en la orina, lo que posibilita su detección para el diagnóstico.

La prueba utiliza anticuerpos policlonales altamente purificados, para capturar moléculas de LAM (el antígeno diana) con un análisis de inmunoadsorción enzimática de tipo “sándwich” de flujo lateral.

La muestra se agrega a la tira reactiva y el flujo capilar desplaza el antígeno LAM a través de la tira de modo que:

- a) Se une a un anticuerpo conjugado con oro coloidal para formar un inmunocomplejo
- b) El flujo capilar desplaza el inmunocomplejo más allá de la ventana de control y la ventana del paciente donde es capturado por un anticuerpo anti-LAM fijado a la membrana de nitrocelulosa,
- c) La presencia de LAM será confirmada por la marca de oro coloidal.

Una banda gris violácea en la ventana del paciente indica un resultado positivo, y muestra que el antígeno micobacteriano LAM, está presente en la muestra en el límite de detección de la prueba o por encima de él.

Si no hay ninguna banda visible, el LAM no está presente, o posiblemente lo esté por debajo del límite de detección y, por lo tanto, se presume que el resultado es negativo.

Se ha agregado una ventana de control para garantizar la validez de la prueba; debe haber una línea visible en dicha ventana en todas las pruebas. La banda de control utiliza un anticuerpo con especificidad por el oro coloidal.

Criterios de selección a quienes irá dirigida la prueba

- a) Toda persona VIH confirmada en estado crítico, alta sospecha de tuberculosis pulmonar o extrapulmonar y que no pueda producir esputo.
- b) Pacientes con prueba positiva al VIH, independientemente de los signos y síntomas de tuberculosis (pulmonar o extrapulmonar) y que tiene recuento de CD4 menor o igual a 200 células/ μ l o estadios 3 y 4 .
- c) Personas con VIH positivos que están gravemente enfermos con sospecha de TB y que no puedan dar una muestra de esputo.
- d) Toda persona con VIH y que presenta un cuadro agudo de una o varias infecciones oportunistas que haya abandonado la terapia antirretroviral y a quienes se les sospecha tuberculosis.

No se utilizará en los siguientes casos:

- a) Casos de TB en tratamiento antituberculosis con o sin tratamiento antirretroviral
- b) Pacientes con tratamiento por infección latente por tuberculosis (ILTb)

Suministros necesarios para las pruebas

El kit de prueba LF-LAM contiene las tarjetas de pruebas, una tarjeta de escala de referencia y un prospecto con instrucciones.

Otros elementos requeridos para las pruebas, pero que no se incluyen en el kit son:

- a) Recipiente estéril para la obtención de la muestra de orina
- b) Pipeta u otro dispositivo que permita transferir con precisión 60 μl de orina (podría ser una micro pipeta calibrada de 100 μl de puntas con filtro)
- c) Cronómetro

4.2 Procedimiento

El procedimiento básico se muestra en el anexo 14.

Es importante usar la tira reactiva dentro de las dos horas posteriores a la retirada de la lámina protectora. Si se analiza más de una muestra, asegurarse de etiquetar correctamente cada tira reactiva, para que se pueda vincular correctamente a la muestra de cada paciente.

Los materiales que no se utilicen en la prueba deben retirarse de la mesa de trabajo y la mesa se debe limpiar con desinfectante.

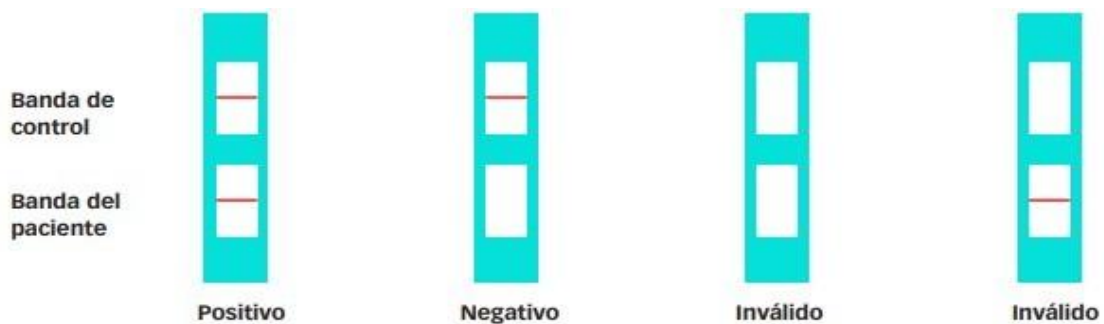
Para garantizar la exactitud de la prueba, es importante seguir un flujo de trabajo organizado con respecto a la realización de las pruebas y los tiempos.

Los pasos básicos son:

- a) Retirar la lámina protectora de cada tira reactiva necesaria y asegurarse que estén debidamente etiquetadas para la muestra de cada paciente.
- b) Agregar 60 μl de orina a la almohadilla destinada a la muestra utilizando una pipeta de precisión u otro dispositivo.
- c) Esperar 25 minutos y luego leer los resultados. Los resultados son estables durante 35 minutos. No leerlos pasados los 35 minutos.
- d) Comprobar los resultados con la tarjeta de escala de referencia, incluida en el kit de la prueba.
- e) Lectura e interpretación
- f) La prueba incorpora una ventana de control que actúa como una medida de control de calidad interno. Para que la prueba sea válida, debe ser visible una banda de control en la ventana correspondiente, cada vez que se realiza una prueba. Ver figura 5.
- g) Si la banda de control no es visible, la prueba no es válida y la muestra debe analizarse nuevamente.
- h) Se incluye una tarjeta de escala de referencia en cada kit para ayudar a interpretar y clasificar los resultados.
- i) Para que la prueba se considere positiva, debe haber una banda gris violácea visible en la ventana de control y en la ventana del paciente.
- j) La intensidad de color de la banda del paciente, debe ser similar o más oscura que cualquiera de las bandas positivas en la tarjeta de escala de referencia.
- k) Las bandas del paciente y de control pueden diferir en intensidad, pero ambas deben estar presentes para que un resultado positivo de la prueba sea válido.

- l) Las diferentes intensidades de color en la tarjeta de referencia, se vinculan a una clasificación de positividad, en la que el grado 1 es el menos intenso y representa la concentración más baja de LAM.
- m) Aunque no se trata de una prueba cuantitativa, en general la intensidad de la banda se correlaciona con el nivel de LAM en la muestra.
- n) Los niveles bajos de LAM que están cerca del límite de detección pueden ser difíciles de interpretar. Ver figura 6.
- o) LF-LAM está considerada como una prueba de diagnóstico que puede usarse en combinación con las pruebas existentes para el diagnóstico de la TB asociada al VIH como complemento del criterio clínico, no debe usarse como una prueba de reemplazo o de triaje.
- p) Si la prueba resulta negativa y persiste la sospecha de tuberculosis se sugiere la utilización de métodos de diagnóstico molecular. Todos los pacientes con signos y síntomas de tuberculosis pulmonar que pueden producir esputo, deben enviar al menos una muestra de esputo para Xpert MTB/RIF Ultra, como prueba de diagnóstico inicial.

Figura 5. Procedimiento de control interno de calidad para garantizar la validez de la prueba.



Fuente: Directrices consolidadas sobre la tuberculosis. Módulo 3: diagnóstico - diagnóstico rápido para la detección de tuberculosis, actualización 2021.

Figura 6. Ejemplo de intensidad de banda poco clara o equívoca que a veces se observa y que dificulta la interpretación de los resultados.



Fuente: Directrices consolidadas sobre la tuberculosis. Módulo 3: diagnóstico - diagnóstico rápido para la detección de tuberculosis, actualización 2021.

Los métodos diagnósticos serán indicados según corresponda, cumpliendo algoritmo diagnóstico, descritos en anexo 15.

5. Bioseguridad

Los presentes lineamientos incorporan un enfoque de evaluación de riesgos, de acuerdo al Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis .

Prácticas de trabajo seguras

Los laboratorios presentan numerosos peligros para el personal, y no todos son inmediatamente evidentes. Las prácticas de trabajo seguras están diseñadas para:

- Reducir el riesgo de infección o lesiones para la persona, sus compañeros de trabajo y la comunidad
- Menos del 20% de las infecciones adquiridas en el laboratorio se pueden atribuir a un accidente reconocido. El resto no tiene una causa identificable, pero la formación de aerosoles es la más probable.

Pilares de la bioseguridad

La bioseguridad tiene tres partes claves para la manipulación de bacilos de TB de manera segura:

- Contención primaria

Prácticas de trabajo seguras, para minimizar los derrames y la creación de aerosoles infecciosos, equipos idóneos, utilizados y mantenidos correctamente

b) Secundaria

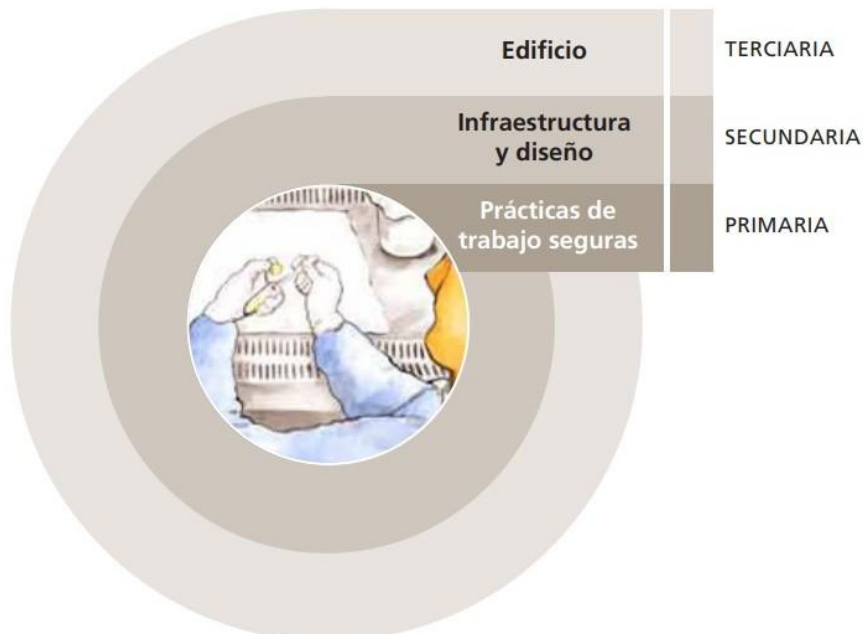
Infraestructura y diseño para apoyar las actividades primarias

c) Terciaria

Edificios para albergar el laboratorio y sus actividades.

La combinación de los tres es necesaria para manipular los bacilos de TB con seguridad. Sin embargo, la práctica de trabajo segura (figura 7), es esencial.

Figura 7. Práctica de trabajo segura



Fuente: Manual de seguridad en el laboratorio. , 2022

Actividades generadoras de aerosoles

Son las actividades que aumentan el riesgo de producción de aerosoles debido a la fuerza mecánica del procedimiento. Los aerosoles se producen más fácilmente a partir de fluidos menos viscosos.

a) El esputo suele ser viscoso y es más difícil que genere aerosoles.

b) Los cultivos líquidos son fluidos y por lo tanto, generan aerosoles más fácilmente.

Algunos ejemplos son agitación vorticial, centrifugado, mezclado, pipeteo.

Las tareas con distinto nivel de riesgo deben ser ubicadas convenientemente para que se direcciona el material potencialmente infeccioso desde un área de riesgo mediano, a otra de mayor riesgo (ver cuadro 19). Esta última área, debe estar muy bien separada y allí se intensificará la extracción de aire, los cuidados en el trabajo cotidiano, las medidas de contención del riesgo y de contingencia para accidentes.

Cuadro 19. Niveles de precaución, actividades de laboratorio asociadas y evaluación de riesgos en los laboratorios de tuberculosis

Nivel de riesgo	Actividades en el laboratorio	Evaluación del riesgo
Riesgo bajo	Microscopia directa del esputo; preparación de muestras para la prueba Xpert MTB/RIF Ultra	Riesgo bajo de generar aerosoles infecciosos durante la manipulación de muestras; concentración baja de partículas infecciosas.
Riesgo moderado	Procesamiento y concentración de muestras para inoculación en medios de cultivo primarios; pruebas moleculares directas en esputo procesado mediante una prueba con sondas lineales.	Riesgo moderado de generar aerosoles infecciosos de las muestras; baja concentración de partículas infecciosas.
Riesgo alto	Manipulación de cultivos para identificación, PSF fenotípicas o LPA en cultivos.	Riesgo alto de generar aerosoles infecciosos de los cultivos; concentración alta de partículas infecciosas.

Fuente: Manual de seguridad en el laboratorio.

Información y control médico del personal de laboratorio

- Las personas inmunodeprimidas, tienen un riesgo mucho mayor de progresión de la infección a la enfermedad. Los factores de riesgo incluyen coinfección por el VIH, diabetes, quimioterapia, desnutrición, consumo de tabaco y enfermedades crónicas, pero no se limitan a ellos.
- Un trabajador de laboratorio inmunodeprimido, tiene un mayor riesgo que la infección por TB progrese a enfermedad. Se debe obtener un certificado médico antes de trabajar en un laboratorio de TB que realice cultivos y pruebas de sensibilidad a fármacos (PSF).
- Apenas 10 bacilos ácido resistentes son suficientes para establecer la infección. Trabajar con un gran número de bacilos ácido resistentes y realizar procedimientos generadores de aerosoles, aumenta en gran medida el riesgo de infección por TB.
- Cuando el personal presente síntomas respiratorios por más de quince días, deberá pasar consulta médica, y disponer de exámenes, entre ellos baciloscopía, radiografía de tórax, prueba molecular Xpert MTB/RIF Ultra y cultivo de muestras pulmonares.
- En cada sección, deben estar expuestas las normas básicas de bioseguridad específicas para cada tipo de tarea.
- El personal debe informar a su jefe inmediato cualquier accidente de trabajo.

- g) Realizar evaluación médica de los trabajadores de salud, de las áreas de mayor riesgo de transmisión de *M. tuberculosis* y otras infecciones respiratorias., por lo menos una vez al año.

5.1. Equipos de protección personal

- a) El equipo de protección personal (EPP) proporciona una barrera física para minimizar el riesgo de exposición a aerosoles, salpicaduras e inoculación accidental.
- b) El EPP debe usarse en todo momento dentro del laboratorio.
- c) El EPP mal ajustado, inadecuado o usado de forma incorrecta es menos eficaz y puede crear una falsa sensación de seguridad.
- d) La elección del EPP depende del tipo de trabajo que se realice y del riesgo que se quiera minimizar.
- e) Todos los EPP deben ser suministrados por el laboratorio.
- f) Los artículos de EPP deben ser desechables y no reutilizables.
- g) El personal no debe llevar a casa ningún EPP para lavar, eliminar o usar fuera del laboratorio.

Limpieza de mesas de trabajo

Las mesas de laboratorio, se deben desinfectar con hipoclorito de sodio al 0.5%, o alcohol al 70%, antes y después de la rutina de trabajo. La desinfección de las mesas, debe ser hecha por el personal técnico, no debe dejarse esta tarea al personal de limpieza.

Las diluciones de lejía, deben prepararse cada día, ya que éstas liberan cloro en forma gaseosa con lo que se debilita su potencial germicida transcurrido el tiempo, además las soluciones de hipoclorito de sodio son inactivadas en presencia de grandes cantidades de materia orgánica.

Cabina de seguridad biológica

Las malas técnicas de uso de una cabina de seguridad biológica, expondrán a una posible infección.

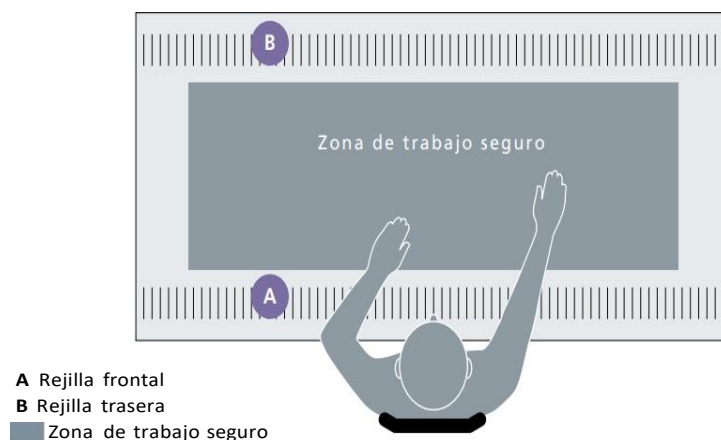
Las acciones que realice el operador, siempre deben complementar el funcionamiento de la cabina de seguridad biológica. La contaminación cruzada, se previene con el uso de prácticas de trabajo seguras (ver figura 8).

Solo se debe permitir que un trabajador opere la cabina de seguridad biológica, más de una persona, dañará la cortina de aire frontal y permitirá que se liberen aerosoles.

Cuando la cabina de seguridad biológica es pequeña, no habrá suficiente espacio para mantener todos los materiales necesarios dentro de ella. En ese caso, guardar los artículos limpios en una mesa, para que sean fácilmente accesibles sin interrumpir el trabajo.

La tarea que se esté realizando, determinará qué elementos se necesitan dentro de la cabina de seguridad biológica. El almacenamiento de artículos adicionales en dicha cabina, aumenta el riesgo de contaminación cruzada.

Figura 8. Zona de trabajo seguro



Fuente: Manual de seguridad en el laboratorio. 2022

La cabina de seguridad biológica clase II, tipo A2, filtra y retiene a los bacilos que pueden quedar suspendidos en las operaciones de mayor riesgo. Debe estar ubicada en un lugar donde la circulación de personal sea la indispensable y lejos de puertas y ventanas que se abran. Conviene dejar un espacio de aproximadamente treinta centímetros libres, alrededor del equipo para poder acceder durante las tareas de control y mantenimiento.

Cuando se utilizan cabinas de seguridad biológica, no es indispensable tener un sistema de extracción de aire, aunque lógicamente es conveniente. La extracción puede ser realizada por la misma cabina mientras está en funcionamiento.

Consideraciones generales

- Seleccionar para laboratorios de tuberculosis, mesas, sillas, armarios, estantes y mobiliario que puedan ser decontaminados con hipoclorito de sodio al 0.5% o alcohol al 70%; este mobiliario debe permanecer en el área, para evitar contaminación.
- Para permitir la limpieza y desinfección, se debe dejar espacio alrededor de muebles y equipos.
- No se debe almacenar material directamente sobre el piso.
- En la zona de riesgo mediano, deben ingresar el material de vidrio reciclado, medios de cultivo y reactivos necesarios para el procesamiento de muestras.
- Debe ser de acceso restringido al personal técnico y administrativo ajenos al área.

Los requerimientos mínimos para la etapa de mayor riesgo son:

- Muros íntegros desde el piso hasta el techo, de manera que el aire no salga de esta área cuando la puerta esté cerrada.

- b) Puertas y ventanas con cierre hermético para evitar filtraciones de aire y extractores de aire.
- c) Debe contar con un panel de vidrio en puerta que permita visión desde afuera.
- d) Superficies de pisos, paredes, techo y mesas de material no poroso, lisas y selladas, cubiertos con materiales y pinturas que resistan el tratamiento con solución de hipoclorito de sodio al 0.5%.
- e) Debe ser de fácil acceso al área de decontaminación de materiales.
- f) Debe contar con excelente iluminación, agua corriente, gas y electricidad.
- g) Debe contar con un lavabo para hacer coloraciones y otra para el lavado de manos (preferentemente ubicada cerca de la salida del área).
- h) Debe contar con mobiliario necesario para realizar los procedimientos técnicos.
- i) Espacio suficiente para ubicar el equipo necesario.
- j) Aire acondicionado independiente.
- k) Sistema de extracción de aire. Cada extractor debe ser ubicado a la mayor altura posible, en la pared opuesta a la puerta de ingreso y deben expulsar el aire hacia un área abierta, no transitada, lejos de edificios ocupados.
- l) Al elegir el sistema de extracción de aire se debe considerar que debe renovar el aire al menos seis veces por hora.
- m) Las centrifugas de mesa deben estar a una altura cómoda para que pueda verse el rotor y para operar sin dificultad.
- n) Las áreas de mayor riesgo, deben contar con lámparas de luz ultravioleta ya que son útiles para completar la desinfección de superficies cercanas y de mayor riesgo de contaminación.

Área de esterilización de material contaminado

En ella se ubican los autoclaves utilizados para decontaminar: muestras, sobrenadantes que deben ser desechados y el material de vidrio utilizado (potencialmente) infeccioso que debe ser reciclado (tubos, pipetas, otros); debe reunir las siguientes características:

- a) Fácilmente accesible desde el área de procesamiento de muestras, de manera que no sea necesario transportar el material contaminado a grandes distancias o a través de escaleras o ascensores. Lo ideal es que esté en un cuarto contiguo al área de procesamiento de muestras, comunicado por una puerta distinta a la de ingreso de muestras y material.
- b) El material a ser reciclado y las muestras, deben seguir un recorrido en una única dirección, de la siguiente manera: área de ingreso, área de procesamiento y área de decontaminación.
- c) Posterior a la esterilización, el material desechable que no genera riesgo biológico, debe descartarse según lo establecido en la normativa institucional vigente.
- d) El material de vidrio reciclable, esterilizado y sin riesgo, debe ser trasladado al área de lavado/preparación/esterilización la que debe estar ubicada en forma contigua a la de esterilización de material.
- e) En el área de lavado y reciclado de material de vidrio se requiere lavabo y mesas amplias, autoclave y estufa (preferentemente de esterilización). Referirse a Manual de

6. Control de calidad

Supervisión y control de calidad

La supervisión debe contar con técnicas operativas estándares. Para su realización es importante tomar en cuenta lo siguiente; observación, coordinación, corrección, enseñanza, estímulo y evaluación de la competencia técnica de las actividades del personal que se desempeña en el área de tuberculosis de los laboratorios, con el propósito que el trabajo sea realizado en forma eficiente.

Debe ser un proceso educativo recíproco, permanente, regular y planificado, que permita desarrollar los conocimientos y la capacidad del personal, crear actitudes respecto al trabajo y contribuir a mantener la eficacia de una red de servicios organizados, en este caso, los laboratorios que efectúan técnicas bacteriológicas de tuberculosis.

Métodos de supervisión

a) Procedimientos indirectos

Son aquellos que se efectúan a distancia, basados en algunas de las siguientes modalidades:

- a) Programa de evaluación externa de calidad
- b) Envío de muestras o láminas de resultado conocido por el nivel supervisor al supervisor, para comparar los resultados.
- c) Envío de láminas del trabajo habitual desde el nivel local al nivel intermedio o al nivel superior para comparar los resultados y evaluar la aplicación de la técnica baciloscóptica. Esta modalidad es la más aceptable desde el punto de vista operacional y constituye la supervisión técnica indirecta.
- d) Control de calidad externo de los medios de cultivo comparando la sensibilidad de los medios preparados por la red y el Laboratorio Nacional de Referencia.
- e) Control de calidad externo de la prueba molecular Xpert MTB RIF Ultra comparando la concordancia de las pruebas realizadas por la red.
- f) El análisis crítico, cuantitativo y cualitativo de la información estadística.

b) Procedimientos directos

Estos procedimientos se basan en la visita facilitadora por funcionarios del nivel superior y regional a los servicios locales, lo que constituye la supervisión técnica y administrativa directa, permitiendo que ésta sea más rápida, efectiva, para la toma de decisiones *in situ*. Sin embargo, desde el punto de vista operacional, resulta difícil de llevar a cabo en forma regular y oportuna; por las limitaciones de tiempo, movilización y factibilidad de cobertura del supervisor.

Control de calidad indirecto de las baciloscopías

Es un procedimiento que realizan en conjunto los distintos niveles de la red de laboratorios, tiene como objetivo elevar y mantener la calidad de trabajo. No tiene carácter punitivo (aplicación de sanciones) y se basa en la comparación y evaluación técnica indirecta de láminas de baciloscopía preparadas en el día a día correspondiente al trabajo que se realiza en cada laboratorio. Los aspectos a tomar en cuenta en esta evaluación son: el extendido, coloración, calidad de la muestra, concordancia cualitativa y cuantitativa de las lecturas microscópicas.

El control de calidad permite:

- a) Evaluar si la información producida por el laboratorio es precisa, reproducible y oportuna
- b) Establecer un sistema de alarmas que permite prevenir, descubrir y corregir errores
- c) Resulta más eficaz para detectar y asistir a los casos de tuberculosis para controlar la enfermedad.

Control de calidad interno

El responsable del área de tuberculosis en el laboratorio debe establecer un sistema de controles regulares y continuos de los puntos críticos. Es un compromiso que se debe asumir en cada laboratorio que realiza bacteriología de la tuberculosis.

El control de calidad interno comprende:

- a) Evaluación de materiales, equipos y reactivos
- b) Desempeño del personal
- c) Procedimientos estandarizados
- d) Informes precisos y oportunos
- e) Oferta y aplicación adecuada de los métodos diagnósticos
- f) Rendimiento de los métodos diagnósticos para detectar casos
- g) Seguimiento de los resultados obtenidos
- h) Medidas correctivas a aplicar cuando la imprecisión del resultado excede los límites considerados aceptables o se producen demoras evitables.

Preparación de láminas para el control interno de la coloración

El personal debe cumplir los siguientes procedimientos:

- a) Preparar extendidos de muestras positivas y negativas, tratadas previamente con 10 gotas de hipoclorito de sodio al 0.5%, por lo menos durante media hora. Preparar con ellas tantos extendidos como sean necesarios, para que puedan ser utilizados durante dos meses. Guardarlas en cajas con separaciones, diseñadas para guardar extendidos, o dentro de una caja envueltas en papel suave, bien acondicionadas en un lugar seco.
- b) Controlar la calidad de la coloración en cada serie de extendidos a colorear, tiñendo una lámina negativa y otra positiva. Registrar el resultado de este control de calidad en la PCT- 4. (anexo 2).
- c) Comprobar que los BAAR se vean completa e intensamente coloreados con fucsina y que la coloración de fondo sea uniforme, del color esperado y que ofrezca buen contraste.
- d) Si se detectan defectos, repetir el control con otros extendidos para descartar un posible error en la técnica de tinción. Si persiste el defecto, investigar la causa de error. Si se

realizan más de diez baciloscopias por día, se debe repetir el control arriba descrito (coloración de un extendido positivo y uno negativo) una vez por semana.

- e) Si se realizan menos de diez baciloscopias por día se deben incluir los frotis positivo y negativo como control cada vez que realice la coloración

Control de registros e indicadores de la calidad de trabajo:

- a) Verificar que las muestras estén siendo procesadas en el día en que fueron recibidas o al día siguiente. Si el laboratorio no puede hacer baciloscopias todos los días o si recibe muestras de centros periféricos, verificar que no transcurran más de cinco días desde que las muestras fueron tomadas hasta que son procesadas e informadas.
- b) Controlar que los resultados de las baciloscopias se estén entregando regularmente como máximo tres días hábiles, después de procesada la muestra.
- c) Verificar que los resultados sean recibidos por personal responsable, en las diferentes instituciones, del Sistema Nacional Integrado de Salud (SNIS).
- d) Comprobar que hayan sido derivadas para prueba molecular, cultivo y PSD las muestras que lo requieren, de acuerdo a lo establecido en la normativa o al algoritmo diagnóstico.
- e) Analizar y mantener un registro de los indicadores. Si estos valores se alejan significativamente de los habituales, se deben investigar las causas.
- f) Sucesión de resultados positivos en uno o unos pocos días de trabajo. Si se detectan, investigar si se ha producido contaminación cruzada (transferencia de bacilos desde una muestra altamente positiva a las siguientes)
- g) En el caso en que detecten anomalías y no puedan ser identificadas las causas, consultar al laboratorio de referencia.

Supervisión técnica indirecta de la baciloscopía

Consiste en el envío de láminas desde el laboratorio local (supervisado), al laboratorio supervisor (centro de referencia de control de calidad de baciloscopía); se basa en la comparación de resultados y la evaluación de la aplicación de la técnica baciloscóptica en las láminas preparadas por los laboratorios en su rutina de trabajo. Los laboratorios de los centros de referencia de control de calidad, tendrán bajo su supervisión a la red local y el Laboratorio Nacional de Referencia a los centros de referencia de control de calidad.

Conservación y envío de las láminas¹

Todos los laboratorios de la red que realizan BK deben conservar adecuadamente la totalidad de las láminas procesadas, incluidas las láminas utilizadas en el control de calidad interno de la coloración. Para ello, se debe proceder de la siguiente manera:

- a) Quitar el aceite de inmersión, luego de examinar los extendidos, dejando el portaobjeto en posición vertical sobre un papel absorbente hasta la mañana siguiente.
- b) Luego apoyar suavemente la cara del portaobjetos que tiene el extendido de las muestras sobre otra tira de papel absorbente. Nunca intentar remover el remanente de aceite por frotado del extendido.
- c) No se debe rotular en el extendido, el resultado de su lectura.

¹ Manual para procedimientos de evaluación externa de calidad pag. 35

- d) Guardar los extendidos en cajas porta láminas en el mismo orden en que fueron procesados, sin separar los positivos de los negativos.
- e) Si no se dispusiera de cajas especiales, los extendidos pueden ser guardados en cajas de cartón envueltos individualmente en papel, en paquetes que agrupen los de un día o de una semana, rotulados con la fecha, en el orden en que se realizaron. No poner en este rótulo el resultado de la lectura de cada una de las láminas.
- f) Conservarlos en un lugar fresco y seco para evitar los efectos del calor y la humedad sobre la coloración.
- g) Para aquellos laboratorios en los que el muestreo de las láminas sea realizado sobre un período en el año (por ej. un mes de cada trimestre), el laboratorio deberá conservar las láminas al menos 2 meses después de haber sido reportadas, para el caso que el laboratorio supervisor les solicite las láminas para su relectura.
- h) Los laboratorios que han sido seleccionados deberán continuar conservando las láminas de cada mes dentro del trimestre correspondiente, dado que, en caso que su desempeño no fuera aceptable, es posible que les sean solicitadas las láminas procesadas durante otro mes del mismo año/trimestre.
- i) Para su envío al laboratorio supervisor, acondicionar la totalidad de los mismos en una caja para envío agregando una copia del formulario para control de calidad indirecto de baciloscopías debidamente lleno con la información acerca de si las láminas corresponden a una muestra de diagnóstico o de control de tratamiento. (Ver anexo 16)

6.1. Evaluación de resultados de supervisión de cada lámina

Cuadro 20. Clasificación de los extendidos según características de la muestra, extendido y coloración

Calidad de la muestra (sólo para extendidos de esputo coloreados por ZN)	
Mucopurulenta	La mayoría de los campos presenta leucocitos, además de mucus
Mucosa	La mayoría de los campos presenta mucus y muy aislados leucocitos
Saliva	En la mayoría de los campos se observan células epiteliales, escaso mucus y muy escasos leucocitos
Calidad del extendido	
Bueno	Al ojo desnudo del supervisor, el extendido ocupa 2-3 cm de largo por 1-2 cm de ancho. Está homogéneamente distribuido y la coloración de contraste no es intensa. Microscópicamente, la mayoría de los campos presenta cantidad suficiente de material, de manera que al mover el enfoque micrométrico a una amplificación de 800- 1000x se observan entre 1 y 3 niveles.
Fino	La mayoría de los campos microscópicos presenta escaso material.
Grueso	Al ojo desnudo del supervisor, la apariencia de la lámina es de color azul o marrón oscuro (según el colorante de contraste que se emplee). Microscópicamente, la mayoría de los campos presenta abundante material y al mover el enfoque micrométrico a una amplificación de 800-1000x se observan más de 3 niveles. Al ojo desnudo del supervisor, la apariencia de la lámina es de color azul o marrón oscuro (según el colorante de contraste que se emplee). Microscópicamente, la mayoría de los campos presenta abundante material y al mover el enfoque micrométrico a una amplificación de 800-1000x se observan más de 3 niveles.

No homogéneo	Presenta zonas finas y zonas gruesas.
Calidad de la coloración (sólo para extendidos teñidos por ZN que no han sido recoloreados antes de la relectura)	
Buena	Se pueden leer 100 campos microscópicos con coloración buena en todo el extendido. Se considera que los campos microscópicos tienen tinción buena cuando la coloración de fondo no presenta artefactos rojo fucsia (precipitados o cristales de fucsina) y el contraste es de color azul claro. En algunos casos, se acepta que la coloración de fondo presente una leve tonalidad rosa. Si se observan bacilos, estos deben aparecer de color rojo fucsia intenso.
Buena con cristales/precipitados de fucsina)	Se pueden leer 100 campos microscópicos buenos, a pesar de que en el resto del extendido se encuentren campos con cristales o precipitados de fucsina.
Buena (con falta de decoloración)	Se pueden leer 100 campos microscópicos buenos, a pesar de que en el resto del extendido se encuentren campos con decoloración insuficiente (coloración de fondo rosa intensa).
Deficiente	La presencia de cristales/precipitados o la falta de decoloración no permiten leer correctamente al menos 100 campos microscópicos.

Fuente: Manual Para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 4: Manual de Procedimientos de Evaluación Externa de Calidad de los Métodos Bacteriológicos Aplicados al Diagnóstico y Control de Tratamiento de Tuberculosis/Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas” Lima: Oras - Conhu; 2019.

Toda la información generada en la supervisión técnica indirecta debe ser comunicada a los laboratorios supervisados mediante la elaboración de un informe (anexo 17).

Supervisión administrativa indirecta

Consiste en el análisis y la evaluación crítica cuantitativa y cualitativa de la información estadística mensual para poder evaluar:

- a) Correlación cuantitativa y cualitativa con la información de meses anteriores.
- b) Proporción de baciloscopías para diagnóstico y para el control del tratamiento.
- c) Variaciones en la proporción de resultados positivos en las baciloscopías para diagnóstico.
- d) Relación entre baciloscopías de diagnóstico positivo y casos diagnosticados.
- e) Correlación entre baciloscopías de control de tratamiento y casos en tratamiento.

Es conveniente, que el equipo del programa de tuberculosis del nivel local, efectúe un análisis global de la información mensual para establecer las relaciones pertinentes entre las diversas actividades: localización de casos, exámenes bacteriológicos, notificación, pacientes en tratamiento, entre otros.

La supervisión es una actividad prioritaria en la Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, a fin de mantener la calidad y eficiencia de la red de laboratorios que efectúan técnicas bacteriológicas de tuberculosis, y es una responsabilidad esencial de todos los niveles de gestión.

Durante la supervisión son requeridos los registros y los resultados de control de calidad interno y externo, por lo que deben estar disponibles.

Control de calidad del cultivo BAAR

El encargado de laboratorio de tuberculosis, es el responsable de establecer y analizar los resultados de los controles internos y externos, y de realizar las correcciones necesarias cuando se detectan deficiencias.

Control de calidad interno de cultivo

Aspectos esenciales a tomar en cuenta cuando se realiza el control de calidad interno en medios de cultivo:

- a) Color del medio de cultivo: el color en tubos de un mismo lote que presentan distinta intensidad de verde y que evidencian mala homogenización o residuos en los tubos. Un verde muy oscuro evidencia exceso de verde de malaquita o pH muy ácido. Medios muy amarillentos pueden indicar defecto de verde de malaquita o pH muy alcalino.
- b) Consistencia: si el medio se desintegra fácilmente, la temperatura de coagulación no es suficiente. Esto puede ser constatado golpeando sobre la mano uno o dos tubos extraídos al azar del equipo de coagulación. Los tubos con poca consistencia no son adecuados para hacer repiques.
- c) Textura/homogeneidad: evitar la formación de burbujas al dispensar y si aparecen luego de coagular, es posible que el medio haya estado sometido a temperatura excesiva y por lo tanto haya perdido calidad. Tampoco deben verse grumos, indicadores de mala homogenización.
- d) pH: valores de pH menores a 6.5 pueden afectar la calidad del medio.
- e) Esterilidad: observar la esterilidad absoluta, después de incubar cuatro tubos de cada nuevo lote al azar, a 35 a 37 °C durante cuarenta y ocho horas y luego dejarlos cuarenta y ocho horas adicionales a temperatura ambiente.

En los laboratorios de la red que preparan medios de cultivo el control de sensibilidad consiste en sembrar regularmente las muestras de esputo para diagnóstico con baciloscopía positiva, aunque el cultivo no sea necesario para el paciente. La positividad del cultivo (en escala de cruces) debe ser igual o mayor a la positividad de la baciloscopía (también en escala de cruces).

Los resultados de control de sensibilidad pueden evaluarse como satisfactorios hasta los veinte días de incubación. Cuando los resultados no sean satisfactorios, se identificará el material sembrado en él, desde que fue puesto en uso. Se anularán los resultados negativos que se obtengan con ese lote y se repetirán los cultivos que quedaron comprometidos.

Registro de la preparación, recepción y consumo de medios de cultivo

Todos los laboratorios de la red que preparan medios de cultivo deben llenar el formulario para mantener un registro actualizado que permita individualizar lotes deficientes y para descartarlos, evaluar la calidad de los mismos y cuantificar el consumo del laboratorio (anexo 18).

El responsable del área una vez al mes controlará que se estén cumpliendo los procedimientos adecuados en la preparación, conservación de reactivos y medios; además deberá controlar el proceso de esterilización usando indicadores de temperatura.

Control interno de la calidad de los registros

El responsable del área de tuberculosis de cada laboratorio debe:

- a) Disponer de un profesional no involucrado en la realización e informe del cultivo, para que revise los datos y resultados consignados en los informes elaborados ese día, los cuales deben coincidir exactamente con los registrados en el libro del laboratorio. Esto puede ser realizado por el responsable del laboratorio, en el caso en que él mismo no procese muestras y emita informe de resultados.
- b) Verificar que se procesen las muestras los días establecidos en la rutina de trabajo para ácido resistente y que no se detecten demoras mayores a los tres o cinco días de tomadas las muestras.
- c) Derivar los aislamientos de los pacientes que lo requieran, para identificación y prueba de sensibilidad, de acuerdo a lo establecido en los presentes lineamientos técnicos y algoritmo diagnóstico.
- d) Garantizar el control de calidad interno de los resultados del cultivo.

7. Sistema de registro

El registro del laboratorio se utiliza para documentar los resultados del examen bacteriológico de las muestras; también aporta información que integrada a la producida por otros laboratorios, es útil para evaluar la situación epidemiológica.

El laboratorio debe poder investigar en sus registros:

- a) Sintomáticos respiratorios examinados.
- b) Muestras recibidas y referidas para baciloscopia, prueba molecular rápida mediante amplificación de ácido nucleico, cultivo, prueba de sensibilidad y tipificación.
- c) Resultado de las diferentes pruebas bacteriológicas de cada paciente.
- d) Casos diagnosticados y controlados.
- e) Reactivos e insumos recibidos y consumidos.

Los laboratorios de la red deben contar con los siguientes instrumentos estandarizados por la Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias:

- a) Norma técnica de prevención y control de la tuberculosis.
- b) Lineamientos técnicos para el diagnóstico de la tuberculosis a través de pruebas de laboratorio clínico vigente.
- c) Libro para el llenado del envío del control de calidad indirecto de baciloscopia.
- d) Solicitud de examen bacteriológico de tuberculosis (PCT- 3).
- e) Registro de actividades de laboratorio (PCT- 4).
- f) Libro de registro de envío de cultivos BAAR (PCT-11) (anexo 19).

Los laboratorios que realizan otras pruebas deben de contar con:

- a) Registro de resultados de prueba molecular rápida mediante amplificación de ácido nucleico (anexo 20)
- b) Registro de cultivos de esputo (anexo 21)

c) Registro de pruebas de tipificación y prueba de sensibilidad (anexo 22).

Los registros deben ser conservados por lo menos durante cinco años.

La precisión en la documentación es crítica para analizar resultados, evaluar y planificar apropiadamente las actividades.

El personal de salud al llenar los instrumentos de registro debe cumplir lo establecido en los instrumentos técnicos jurídicos del Programa de control de tuberculosis, estar completos y contener información confiable y consistente.

VI. Disposiciones finales

a) Obligatoriedad

Es responsabilidad del personal técnico y administrativo que labora en el Sistema Nacional Integrado de Salud, dar cumplimiento a los presentes lineamientos técnicos, caso contrario se aplicarán las sanciones establecidas en la legislación administrativa respectiva.

b) De lo no previsto

Todo lo que no esté previsto en los presentes lineamientos técnicos, se debe resolver a petición de parte, por medio de escrito dirigido a la Titular de esta Cartera de Estado, fundamentando la razón de lo no previsto, técnica y jurídicamente.

c) Derogatoria

Dejase sin efecto los *Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico*, de octubre de 2019.

VII. Vigencia

Los presentes lineamientos técnicos entrarán en vigencia, a partir de la fecha de oficialización por parte del Titular.



Dr. Francisco José Alabi Montoya
Ministro de Salud ad honorem

VIII . Abreviaturas y siglas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AMK:	Amikacina
BAAR:	Bacilo ácido alcohol resistente
BFE:	Filtro de eficiencia de filtración bacteriana
BK:	Baciloscopia
CAP:	Capreomicina
CMTB:	Complejo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
CSB:	Cabina de seguridad biológica
DGCP:	Dirección General de Centros Penales
DR:	Drogorresistente
DUI:	Documento Único de Identidad
EPP:	Equipo de protección personal
ETH:	Ethionamida
FLQ:	Fluoroquinolona
FOSALUD:	Fondo Solidario para la Salud
INH:	Isoniazida
ISSS:	Instituto Salvadoreño del Seguro Social
KAN:	Kanamycina
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
LNSP:	Laboratorio Nacional de Salud Pública
M-40:	Primera muestra del sintomático respiratorio
M-41:	Baciloscopía de control de tratamiento
M-42:	Baciloscopías sub - secuentes
MDR:	Multidrogorresistente.
MINSAL:	Ministerio de Salud
<i>M. tuberculosis:</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NUP:	Número Único Previsional
PCT:	Programa de Control de la Tuberculosis
PCR:	Cadena de polimerasa en tiempo real
UPCTYER:	Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
POE:	Procedimiento operativo estandarizado
PSD:	Prueba de sensibilidad a drogas
RIIS:	Redes Integrales e Integradas de Salud
RPM:	Revoluciones por minuto
RR:	Resistencia a rifampicina
SLID:	Drogas inyectables de segunda línea
SIPE:	Sistema de Información Penitenciaria

SNIS:	Sistema Nacional Integrado de Salud
SR:	Sintomático respiratorio
TB:	Tuberculosis
TB-MDR:	Tuberculosis multidrogorresistente
TB-XDR:	Tuberculosis extremadamente resistente
V.E:	Valor esperado
VIH:	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR:	Extremadamente drogorresistente
ZN:	Ziehl Neelsen

Bibliografía

- 1 Banada PP, et al. A novel sample processing method for rapid detection of tuberculosis in the stool of pediatric patients using the Xpert MTB/RIF assay. PloS one 2016, 11: e0151980. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0151980>
- 2 Barnard DA, et al. The utility of Xpert MTB/RIF performed on bronchial washings obtained in patients with suspected pulmonary tuberculosis in a high prevalence setting. BMC Pulm Med 2015, 15: 103. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4573925/pdf/12890_2015_Article_86.pdf
- 3 Denkinger CM, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. The European respiratory journal 2014, 44: 435-446. <http://tbevidence.org/wp-content/uploads/2014/04/Denkinger-ERJ-2014-Xpert-EPTB.pdf>
- 4 Directrices unificadas sobre la tuberculosis, Módulo 3. Diagnóstico. Medios de diagnóstico rápidos para la detección de la tuberculosis.
- 5 Documento Método de diagnóstico rápido para detectar la tuberculosis; Manual Operativo sobre la tuberculosis, 2020
- 6 Gene Xpert Dx System. Manual del operador del equipo Gene Xpert, versión 4.0 de software, Cepheid. 2010.
- 7 Held M, et al. gene Xpert® polymerase chain reaction for spinal tuberculosis: an accurate and rapid diagnostic test. Bone Joint J 2014, 96-B: 1366-1369. <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/96-B/10/1366>
- 8 Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated geneXpert MTB/RIF system. J Clin Microbiol 2011, 49: 1202-1205. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122824/>
- 9 lawn SD, et al. Rapid microbiological screening for tuberculosis in HIV-positive patients on the first day of acute hospital admission by systematic testing of urine samples using Xpert MTB/RIF: a prospective cohort in South Africa. BMC Med 2015, 13: 192. <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0432-2>
- 10 Instituto Nacional de Salud, subdirección de epidemiología y laboratorio nacional de referencia, laboratorio de micobacterias. Bacteriología del *Mycobacterium tuberculosis* y de micobacterias no tuberculosis, Manual de procedimientos. Bogotá, D.C., mayo del 2001.
- 11 Kokuto h, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis MTB in Fecal Specimens From Adults Diagnosed with Pulmonary Tuberculosis Using the Xpert MTB/Rifampicin Test. open Forum Infect Dis 2015, 2: ofv074. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462888/>
- 12 Le Palud P, et al. Retrospective observational study of diagnostic accuracy of the XpertR MTB/RIF assay on fiberoptic bronchoscopy sampling for early diagnosis of smear-negative or sputum-scarce patients with suspected tuberculosis. BMC Pulm Med 2014, 14: 137. <http://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2466-14-137>
- 13 Manual de usuario Xpert MTB/XDR Cepheid. 2021
- 14 Manual de capacitación en Gene Xpert. Módulo 3: Toma y transporte de muestras de esputo. 2016
- 15 Manual de procedimientos para el estudio de tuberculosis y otras micobacterias. Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbran. Argentina, 1993.
- 16 Manual de seguridad en el laboratorio. 2022
- 17 Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, Manual de actualización de Baciloscopia, edición 2018
- 18 Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis Normas y Guía Técnica Parte II Cultivo. . 2008
- 19 Manual para el Diagnóstico de la Tuberculosis Parte 4: Manual de Procedimientos de Evaluación Externa de Calidad de los Métodos Bacteriológicos aplicados al Diagnóstico y Control de Tratamiento de la Tuberculosis/Programa "Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las

- Américas” Lima: Oras - Conhu; 2019.
- 20 Maynard-Smith I, et al. Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing nonrespiratory samples: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2015, 14: 709. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298952/>
- 21 Meldau R, et al. Comparison of same day diagnostic tools including geneXpert and unstimulated IFN-gamma for the evaluation of pleural tuberculosis: a prospective cohort study. *BMC Pulm Med* 2014, 14: 58. <http://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2466-14-58>
- 22 Moussa h, et al. geneXpert for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in stool specimens from children with presumptive pulmonary tuberculosis. *Ann Clin lab Sci* 2016, 46: 198-203
- 23 Ministerio de Salud. Unidad del Programa de Tuberculosis. Normas Técnica para la Prevención y Control de la Tuberculosis. 1ra. Edición, El Salvador, C.A. enero 2020.
- 24 Ministerio de Salud. Programa Nacional de Tuberculosis. Manual de Control de Calidad de la Red de Laboratorios de Tuberculosis, El Salvador 2004.
- 25 Ministerio de Salud. Lineamientos técnicos sobre bioseguridad, El Salvador, enero 2012.
- 26 Ministerio de Salud. Lineamientos técnicos para la prevención y control de la tuberculosis, El Salvador, 3ra. edición, septiembre 2020
- 27 Ministerio de Salud. Manual de toma, manejo y envío de muestras de laboratorio, 1ra. Edición, octubre 2013. El Salvador.
- 28 Ministerio de Salud. Manual de procedimientos de bioseguridad para los laboratorios clínicos, diciembre 2008. El Salvador.
- 29 Mok Y, et al. Do we need transbronchial lung biopsy if we have bronchoalveolar lavage XpertR MTB/RIF *Int J Tuberc lung Dis* 2016, 20: 619-624.
- 30 Organismo Andino de Salud - Convenio Hipólito Unanue. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: Manual de actualización de la baciloscopía. Programa “Fortalecimiento de la red de laboratorios de tuberculosis en la región de las Américas”. Lima: ORAS – CONHU, 2da. edición junio 2018.
- 31 Normas y Guía Técnica, Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 2 cultivo, 2008.
- 32 , Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis, 2013
- 33 Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica (OSARTEC), Reglamento técnico salvadoreño 11.01.01:13, de Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico, Especificaciones, El Salvador.
- 34 OSN. Norma técnica para el manejo de los desechos bioinfecciosos. NSO 13.25.02:07. El Salvador.
- 35 Pang Y, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay in gastric lavage aspirates for diagnosis of smear-negative childhood pulmonary tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 2014, 33: 1047-1051.
- 36 Peter Jg, et al. The diagnostic accuracy of urine-based Xpert MTB/RIF in HIV-infected hospitalized patients who are smear-negative or sputum scarce. *PLoS one* 2012, 7: e39966. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039966>
- 37 Porcel JM, et al. XpertR MTB/RIF in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc lung Dis* 2013, 17: 1217-1219.
- 38 Singh S, et al. Xpert MTB/RIF assay can be used on archived gastric aspirate and induced sputum samples for sensitive diagnosis of paediatric tuberculosis. *BMC Microbiol* 2015, 15: 191. <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-015-0528-z>
- 39 Theron g, et al. Accuracy and impact of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of smear-negative or sputum-scarce tuberculosis using bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 2013, 68: 1043-1051
- 40 . Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational ‘how-to’; practical considerations. 2014.

X. Anexos

Anexo 1. Microscopio

Es el instrumento fundamental en el trabajo de microscopia directa del laboratorio.

Su función principal es magnificar los objetos dentro del campo microscópico a un tamaño que pueda ser visto por el ojo humano.

El microscopio que se utiliza en el laboratorio para el examen microscópico de las baciloscopías, es el microscopio compuesto de campo claro.

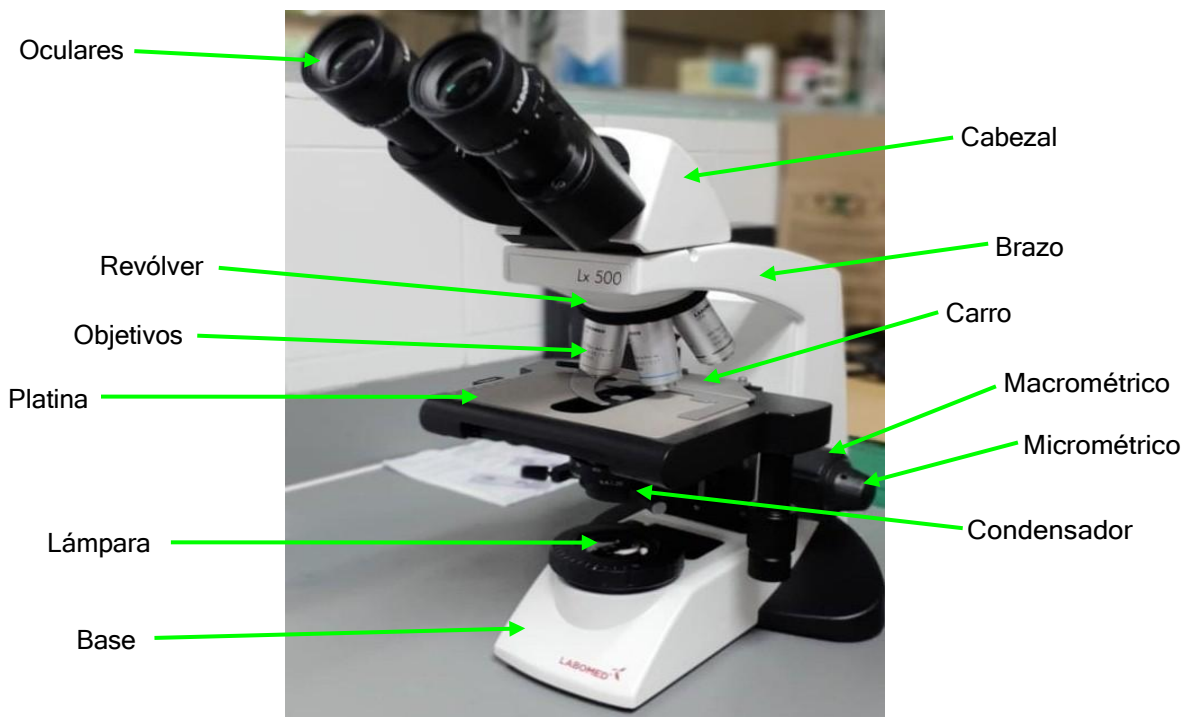
El microscopio de campo claro, consta de parte mecánica y óptica.

1. Parte mecánica:

Base o soporte del microscopio, platina, carro mecánico, tornillo macrométrico, tornillo micrométrico, brazo.

2. Parte óptica:

Oculares, objetivos, condensador, fuente de luz, prismas (dentro del tubo binocular.)



Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, LNSP

Uso correcto del microscopio:

- a) Revisar que la fuente de iluminación esté bien regulada y centrada.
- b) Asegurar que las lentes, y otras superficies que transmiten luz estén bien limpias.
- c) Ajustar la luz, el condensador y el diafragma a fin de que llegue un haz de luz potente a la lente del objetivo.
- d) Colocar adecuadamente el portaobjetos en la platina.
- e) Girar los tornillos de ajuste lentamente hasta que la imagen se vea clara.
- f) Al utilizar el objetivo 100x bajarlo lentamente hasta que entre en contacto con el aceite de inmersión, girar el tornillo micrométrico de ajuste fino para enfocar.

Cuidados

- a) Verificar su buen estado óptico y mecánico.
- b) Colocar una cubierta plástica o de tela preferentemente para protegerlo del polvo.
- c) No debe estar ubicado en un sitio donde existan vibraciones o esté expuesto a sustancias químicas o corrosivas.
- d) Evitar que los objetivos de uso seco y la platina entren en contacto con el aceite de inmersión, si esto sucede se deben limpiar inmediatamente.
- e) Para quitar el aceite del objetivo de inmersión, debe utilizarse papel lente o algodón con alcohol al 70%.
- f) Al término de cada jornada de trabajo, se debe limpiar cuidadosamente, en especial el objetivo de inmersión y dejarlo con papel lente o algodón; para eliminar el exceso de aceite.
- g) Al cambiar el microscopio de lugar, se debe tomar del brazo para no arrastrarlo, evitando daños posteriores.
- h) Cada microscopio debe ser manipulado cuidadosamente y dar el mantenimiento indicado; de observar algún defecto, debe someterlo a revisión por el técnico competente.

El poder de resolución del microscopio dependerá de su buen uso y mantenimiento.

Anexo 2. Registro de actividades de laboratorio (PCT-4)

Ministerio de Salud
Unidad del Programa de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Registro de actividades de laboratorio (PCT- 4)

Región: _____ SIBASI: _____
Establecimiento de salud: _____ Mes: _____ Año: _____
Laboratorista encargado del programa: _____

N°	Fecha de recep. en laboratorio	Fecha de procesamiento	Procedencia	Nombres y apellidos	Edad	Sexo		Número correlativo		Baciloscopia diagnóstica		BK de control de tratamiento					Tipo de muestra	Observaciones
						M	F	1ra	2da	1ra.	2da.	2do.	4to.	6to.	9no.	Otro		
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)		

Ministerio de Salud
Unidad del Programa de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Instructivo para el llenado del registro de actividades de laboratorio (PCT - 4)

- a) El presente libro de registro de actividades de laboratorio (PCT-4), es un instrumento de información oficial de la Unidad del Programa de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias de El Salvador, el cual debe ser adecuadamente llenado y conservado.
- b) Se considera Sintomático Respiratorio investigado a la persona mayor de 10 años que presenta tos con expectoración por 15 días o más de evolución, que es captado en la consulta externa, emergencia, hospitalización, centros penales, por proveedores no PNT o en la comunidad y se le ha examinado al menos una muestra de esputo.
- c) En este libro deben registrarse todos los sintomáticos respiratorios investigados por el laboratorio.
- d) Separar la información cada mes y totalizarlo para hacer los consolidados mensuales y trimestrales.

Región: Anotar el nombre de la región a la que pertenece el establecimiento.

SIBASI: Anotar el nombre correspondiente.

Establecimiento de salud: Anotar el nombre del establecimiento de salud correspondiente.

Laboratorista encargado/a del programa: Anotar el nombre del laboratorista responsable del llenado del libro.

- N°:** Anotar el número correlativo de los pacientes.
- Fecha de recepción en laboratorio:** Anotar con números la fecha en que se recibe la muestra en el laboratorio.
- Fecha de procesamiento:** Registrar la fecha en que se procesó la muestra.
- Procedencia:** Anotar la dirección exacta de la residencia del paciente, en forma completa, para facilitar el seguimiento, si éste resulta ser caso positivo de TB. Si las muestras son referidas de otro establecimiento, escribir el nombre del establecimiento de donde proceden.
- Nombres y apellidos:** Escriba con letra legible y de manera completa los nombres y apellidos del paciente, tal como aparece en PCT-3, para facilitar su seguimiento.
- Edad:** Anotar la edad del paciente en años.
- Sexo:** Marcar con una X el sexo correspondiente.
- Número correlativo:** Anotar los números en forma correlativa, de acuerdo al orden de entrega de la muestra del paciente. No se deben repetir los números ni utilizar letras. Recordar que para diagnóstico son dos baciloscopías y para control de tratamiento también son dos baciloscopías por paciente (en cada control) y cada una tiene que llevar un número diferente.

Iniciar con el número 1 el registro de baciloscopías de cada mes, siguiéndolo en correlativo hasta el final del mes.

Los números correlativos no deben ser necesariamente consecutivos para un mismo paciente. Ejemplo:

José Antonio Pérez Gómez	1	5
Juana Luisa Beltrán García	2	3

9 y 10) Baciloscopia diagnóstica: Anotar el resultado de las muestras con color rojo, si es positivo, y el número de cruces (+) (++) (+++), si se observa de 1 a 9 bacilos, registrar el número de bacilos observados ej. 2b, 5b; si el resultado es negativo escribir "N" con cualquier color de lapicero, en la casilla según corresponda (1ra. o 2da.) muestra.

11, 12, 13, 14 y 15) Baciloscopías de control de tratamiento: Anotar el resultado de baciloscopías de control de tratamiento de los casos (al 2do., 4to., 6to., 9no. u otro mes de tratamiento), con color rojo si es positivo y el número de cruces, o registrar el número de bacilos observados de 1 a 9 bacilos; si es negativo escribir una "N" con cualquier otro color de lapicero, en la casilla correspondiente. Cuando sea retratamiento anotar en observaciones.

16) Tipo de muestra: Esputo (es la muestra dada de forma espontánea por el paciente).

17) Observaciones: Registrar la calidad de muestra que se ha procesado o cualquier otra información que se considere importante.

Anexo 3. Triple embalaje



Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, LNSP

1. Envase primario: contiene la muestra
2. Envase secundario: contiene el frasco con la muestra
3. Envase terciario: contiene el envase secundario
4. Cadena de frío: termo con paquetes refrigerantes en el cual se ubica el envase terciario.

Anexo 4. Solicitud de examen para diagnóstico y seguimiento de casos de tuberculosis (PCT-3)



Ministerio de Salud
Unidad del Programa de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Solicitud de examen para diagnóstico y seguimiento de casos de tuberculosis (PCT-3)
Fecha edición, 2022

Establecimiento: _____ Fecha y hora de recepción de la muestra en el laboratorio: _____
 Nombre: _____ N° de DUI _____ Edad: _____
 Procedencia: Consulta Ext. _____ Emergencia _____ Hospitalización _____ Otro _____ N° de exp. _____
 Sexo: M _____ F _____ Grupo de riesgo y vulnerabilidad*: _____
 Dirección exacta: _____ Tel: _____
 Municipio: _____ Depto: _____ Área: U _____ R _____
 Tipo de muestra: ESPUTO _____ OTRA _____ Especificar _____
 Fecha de indicación: _____ Caso nuevo sensible _____, retratamiento sensible _____, drogorresistente _____

*Grupos de riesgo y vulnerabilidad: Personas con diabetes ◊, EPOC ◊, Hipertensión ◊, Enfermedad Renal Crónica (ERC) ◊, VIH ◊, inmunosuprimido ◊, paciente con TB-RR o TB-MDR ◊, contacto de TB-MDR o TB-RR ◊, trabajador de salud ◊, población infantil ◊, privado de libertad ◊, adulto mayor ◊, población en situación de calle ◊, alcohólico ◊, drogodependiente ◊, migrante ◊, poblaciones originarias ◊, otros ◊.

EXAMEN SOLICITADO

BK PARA DIAGNÓSTICO EN S. R.
 1ra. 2da.

- PRUEBA MOLECULAR RÁPIDA MTB/RIF**
1. S.R. con 2 BK (-) y con TB presuntiva
 2. Persona con VIH
 3. Privado de libertad, o antecedente*
 4. S. R. con diabetes
 5. S. R. con inmunodeficiencias
 6. Caso TB que no negativiza al 2°, 4°, 5° mes de tto. o 9° mes, en caso de retratamiento
 7. Antes tratados (recaídas, fracasos, pérdida en el seguimiento)
 8. Sospecha de TB extrapulmonar
 9. Contacto de caso TB/MDR o TB/RR**
 10. Niños y niñas con TB presuntiva
 11. Personal de salud
 12. Otros (especificar)***: _____
 13. Indicación por resultado previo

BACTERIOLOGÍA CONTROL DE TRATAMIENTO
BACILOSCOPIA: 1ra. 2da.
CULTIVO:
MES DE TTO: 2° ◊ 3° ◊ 4° ◊ 5° ◊ 6° ◊ 7° ◊ 8° ◊ 9° ◊ 10° ◊ 11° ◊ 12° ◊ Otro ◊
DROGAS: H ◊ R ◊ Z ◊ E ◊ Kn ◊ Lv ◊ Et ◊ Cs ◊ Mox ◊ Pto ◊ Cfz ◊ Am ◊
 Observaciones _____

- CULTIVO PARA DIAGNÓSTICO, Y SEGÚN ALGORITMO, TIPIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD:**
1. Alta sospecha de TB y 2 BK (-)
 2. Sospecha de tuberculosis infantil
 3. Sospecha de TB extrapulmonar
 4. Persona con VIH y con sospecha de TB
 - 5.1 Fracaso
 - 5.2 Pérdida en el seguimiento
 - 5.3 Recaída
 6. Contacto de caso TB-MDR o TB-RR
 7. Antecedente o estancia actual en centro penitenciario o bartolinas*
 8. Coinfección TB/VIH
 9. No negativiza al 2°, 4° o 5to mes de tto.
 10. BK con 1 a 9 bacilos en 100 campos
 11. Migrante nacional o extranjero
 12. Paciente con tto. antituberculoso que no mejora clínicamente, aunque las BK de control sean neg.
 13. Micobacteriosis
 14. Personas con diabetes
 15. Caso TB-RR, TB-MDR, TB-DR
 16. Personal de salud
 17. Poblaciones originarias
 18. Población en situación de calle
 19. SR con inmunodeficiencias
 20. Otros (especificar) _____

- PRUEBA MOLECULAR RÁPIDA MTB/XDR**
1. Casos TB-RR
 2. Antes tratados (recaídas, fracasos, pérdidas en el seguimiento)
 3. Contacto de paciente TB-RR; TB-MDR
 4. Pacientes que negativizan al segundo mes de tratamiento, pero en el control posterior, nuevamente presentan bacteriología positiva.
 5. Paciente que la PSD en medio sólido o líquido resulte con resistencia a un fármaco

*En el motivo de indicación privado de libertad o antecedente, por favor subrayar si está en centro penitenciario o tiene antecedente de haber sido privado de libertad. Tanto en la indicación de prueba molecular como de cultivo.
 ** Marcar con un círculo el caso que corresponda.

*** En otros anotar si el paciente se encuentra en bartolina.

Nota: Si el paciente tiene más de un motivo de indicación, checarlas todas.
 No olvide que el informe de los resultados de cultivo se dará a los 30, 45 o 60 días y nunca antes.
 El establecimiento de salud que indica la prueba deberá retirar la respuesta.

Nombre y firma del solicitante: _____ Sello _____

USO EXCLUSIVO PARA RESULTADOS DE LABORATORIO

PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE CASOS DE TUBERCULOSIS

1. Baciloscopia:
 1ra. muestra Positivo Negativo N° de bacilos observados en 100 campos
 2da. muestra Positivo Negativo N° de bacilos observados en 100 campos

2. Prueba molecular rápida MTB/RIF: CMTB No detectado Inválido Error
 CMTB Detectado* RR no detectada CMTB Detectado RR detectada
 CMTB Detectado RR indeterminada No resultado
 CMTB Trace** Detectado RR indeterminada
 * Para el Xpert Ultra el MTB detectado puede ser: **alto** **medio** **bajo** **muy bajo** Marque el que corresponda
 ** Un resultado "Traza" significa que se han detectado niveles bajos de MTB, pero no se ha detectado resistencia a RIF.

3. Cultivo: Positivo: Negativo: Contaminado:

4. Resultado de tipificación: _____

5. Resultado de sensibilidad:
 Fármacos de primera línea _____
 Fármacos de segunda línea _____

6. Prueba molecular rápida MTB/XDR

INH: Low INH Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> INH Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> INH Resistance NOT DETECTED <input type="checkbox"/> INH Resistance INDETERMINATE <input type="checkbox"/>	N/A: INVALID/ERROR/NO RESULT <input type="checkbox"/> MTB DETECTED <input type="checkbox"/> MTB NOT DETECTED <input type="checkbox"/>	KAN: KAN Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> KAN Resistance NOT DETECTED <input type="checkbox"/> KAN Resistance INDETERMINATE <input type="checkbox"/>
FLQ: Low INH Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> FLQ Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> FLQ Resistance NOT DETECTED <input type="checkbox"/> FLO Resistance INDETERMINATE <input type="checkbox"/>	AMK: AMK Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> AMK Resistance NOT DETECTED <input type="checkbox"/> AMK Resistance INDETERMINATE <input type="checkbox"/>	CAP: CAP Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> CAP Resistance NOT DETECTED <input type="checkbox"/> CAP Resistance INDETERMINATE <input type="checkbox"/>
	ETH: ETH Resistance DETECTED <input type="checkbox"/> ETH Resistance NOT DETECTED <input type="checkbox"/>	

Calidad de la muestra: Saliva Mucoide Mucopurulenta Sanguinolenta

Observaciones: _____

Nombre, firma y sello de la persona responsable del resultado: _____

Nombre y firma de Visto Bueno: _____

Fecha de resultado: _____

Sello institución:

Anexo 5. Motivo de rechazo de muestras

Motivo de rechazo de muestras	
Muestra mal rotulada	Nombre y/o apellido no coincide
	Identificación de muestra ilegible
Muestra sin rotular	No tenga nombre ni apellido
Solicitud ilegible	Datos en formulario ilegibles
Solicitud incompleta	Llenado incompleto de formulario PCT-3 Especialmente: Fecha y hora de recibido en el laboratorio, Motivo de solicitud de examen
Muestra inadecuada	Muestra no corresponde a la prueba indicada
Muestra derramada	Parte o la totalidad de la muestra se haya derramado fuera de su contenedor primario. (Evaluar la magnitud del derrame para rescatar la muestra y procesarla)
Muestra no cumple la condición de transporte	Cuando no cumpla las condiciones de triple embalaje y cadena de frío

Fuente: Sección de Tuberculosis – Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Anexo 6: Preparación de reactivos

Preparación de lejía:

Utilizar la fórmula: $V_i \times C_i = V_f \times C_f \rightarrow V_i = \frac{V_f \times C_f}{C_i}$

Dónde:

V_i = Volumen inicial

C_i = Concentración inicial

V_f = Volumen final

C_f = Concentración final

Ejemplo: Preparar 500 ml de solución desinfectante al 0.5% de hipoclorito de sodio, partiendo de hipoclorito comercial al 10%

$$V_i = \frac{500 \text{ ml} \times 0.5\%}{10\%}$$

$V_i = 25 \text{ ml}$

Se deben agregar 25 ml de hipoclorito comercial al 10% y aforar hasta 500 ml de agua destilada, para realizar una solución desinfectante al 0.5%

Preparación de buffier fosfato

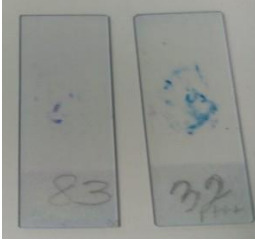


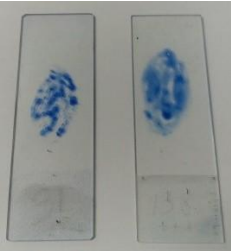
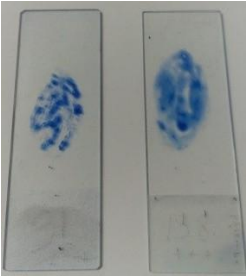
Solución 1	Fosfato disódico anhidro NH_4	g	9.46
	Agua destilada c.s.p	ml	1000
Solución 2	Fosfato monopotásico KH_2PO_4	G	9.08
	Agua destilada c.s.p	ML	1000

- Preparar la solución 1 y la 2, calentando ligeramente cada una por separado hasta lograr completa disolución de las sales.
- Mezclar igual volumen de la solución 1 y 2
- Controlar el pH
- Para procesar muestras, fraccionar el buffer así preparado en botellas o frascos conteniendo no más de 200 ml cada uno.
- Esta cantidad es adecuada para el procesamiento de 12 muestras
- Esterilizar las botellas en autoclave 15 minutos a 1 atmósfera
- Rotular con el nombre del buffer y fecha de preparación.
- Guardar en heladera

Preparación de bicarbonato de sodio al 10%.

- Pesar 10 gramos de bicarbonato de sodio.
- Colocarlo en un frasco volumétrico de 100 mililitros.
- Disolver el bicarbonato con agua destilada, aforando hasta la marca.
- Proceder a esterilizar en autoclave y guardar en refrigeración en frasco limpio.

Anexo 7. Calidad del extendido y coloración de láminas

<p>Fino</p>	
<p>Grueso</p>	
<p>No homogéneo</p>	
<p>Homogéneo</p>	
<p>Tamaño adecuado</p>	

Fuente: Sección de micobacterias – Laboratorio Nacional de Salud

Anexo 8. Preparación de colorantes

1) Fucsina fenicada 3%.

- Tres gramos de fucsina básica.
- Cien mililitros de alcohol de 95°.
- 55 mililitros de fenol acuoso. *

Se agita y se agrega agua destilada hasta completar un litro, se deja reposar veinticuatro horas y se filtra.

(*) Fenol acuoso: 100 gramos de fenol cristalizado y 10 mililitros de agua destilada, se calienta en baño de María hasta completa disolución, luego se enfría.

2) Azul de metileno 1%.

- 1 gramos de azul de metileno.
- 100 mililitros de alcohol de 95°.
- Se disuelve por agitación y se agrega agua destilada hasta completar un litro. Se deja reposar veinticuatro horas y se filtra.

3) Solución decolorante

30 mililitros de ácido clorhídrico para análisis.

970 mililitros de alcohol de 95°.

Con una pipeta: Se deja escurrir por las paredes el ácido clorhídrico en el matraz que contiene el alcohol, luego se agita nuevamente.

Cada vez que los colorantes se utilizan deben filtrarse previamente.

Conservación

Los colorantes deben conservarse en frascos de color ámbar por un tiempo no mayor de un mes.

Anexo 9. Formulario de preparación de medios de cultivo sin fármacos

Formulario de preparación de medios de cultivo sin fármacos Sección de micobacterias

Preparación solución de medios para Löwenstein-Jensen n awa
Stonebrink

Reactivos	Cantidad	Marca	N° de lote	Fecha de caducidad	Balanza
Fosfato monopotásico anhidro - KH_2PO_4					Analítica-Sartorius
Sulfato de magnesio - $\text{Mg}\cdot\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$					Analítica-Sartorius
Fosfato Disódico (HNa_2PO_4)					Analítica-Sartorius
Citrato de magnesio - $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Mg}_3\text{O}_{14}\cdot 14\text{H}_2\text{O}$					Analítica-Sartorius
L-Asparagina - $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{H}_2\text{O}$					Analítica-Sartorius
Glutamato de Sodio ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)					AND
Piruvato ($\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{Na}$)					AND
Glicerol (ml) - $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$					Analítica-Sartorius
Agua destilada (ml)					
Volumen de huevos totales					

Verde de malaquita $\text{C}_4\text{H}_5\text{ON}_4\text{O}_4\cdot 2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$					Analítica-Sartorius
Agua destilada (ml)					

No. de lote: _____ pH: _____

Tiempo de coagulación: _____ T°: _____

Fecha de preparación de medio: _____

Fecha de preparación sales: _____

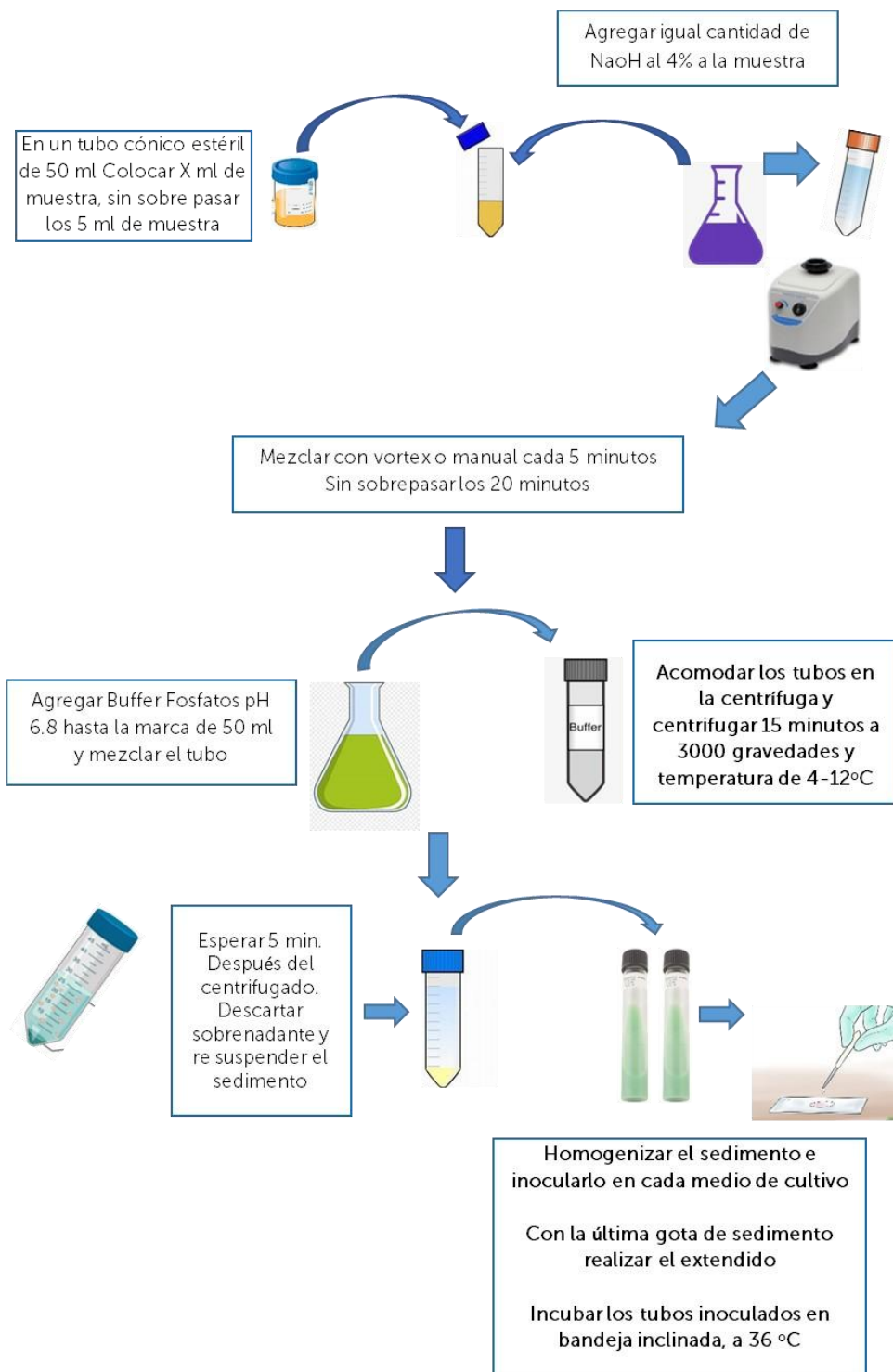
Fecha de caducidad del medio: _____

Control de calidad: _____

Responsables sales:

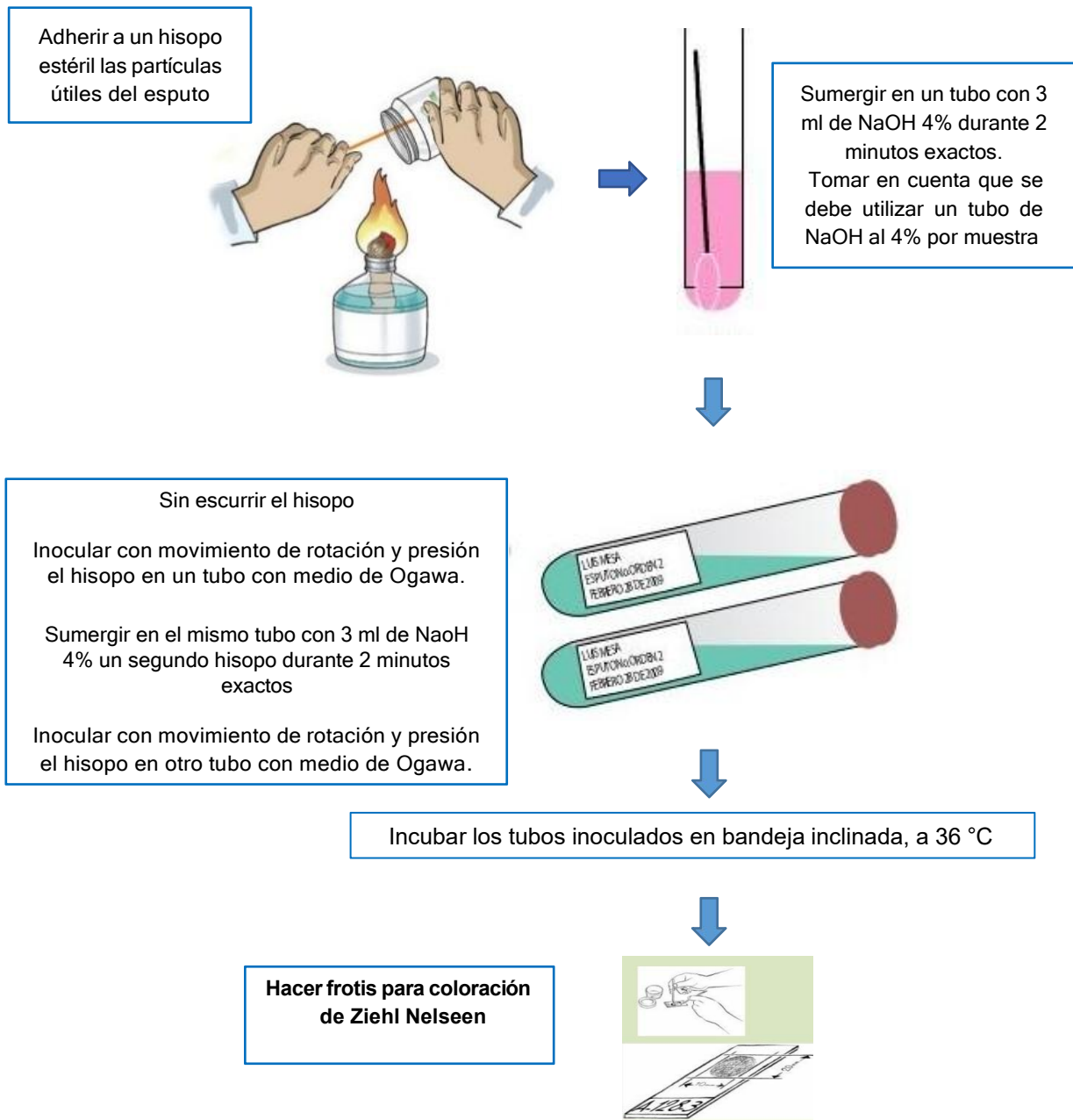
Responsables medio:

Anexo 10. Flujoograma del método de Petroffi con buffier fosfatos




Fuente: Sección de micobacterias – Laboratorio Nacional de Salud Pública

Anexo 11. Flujoograma del método Ogawa Kudoh



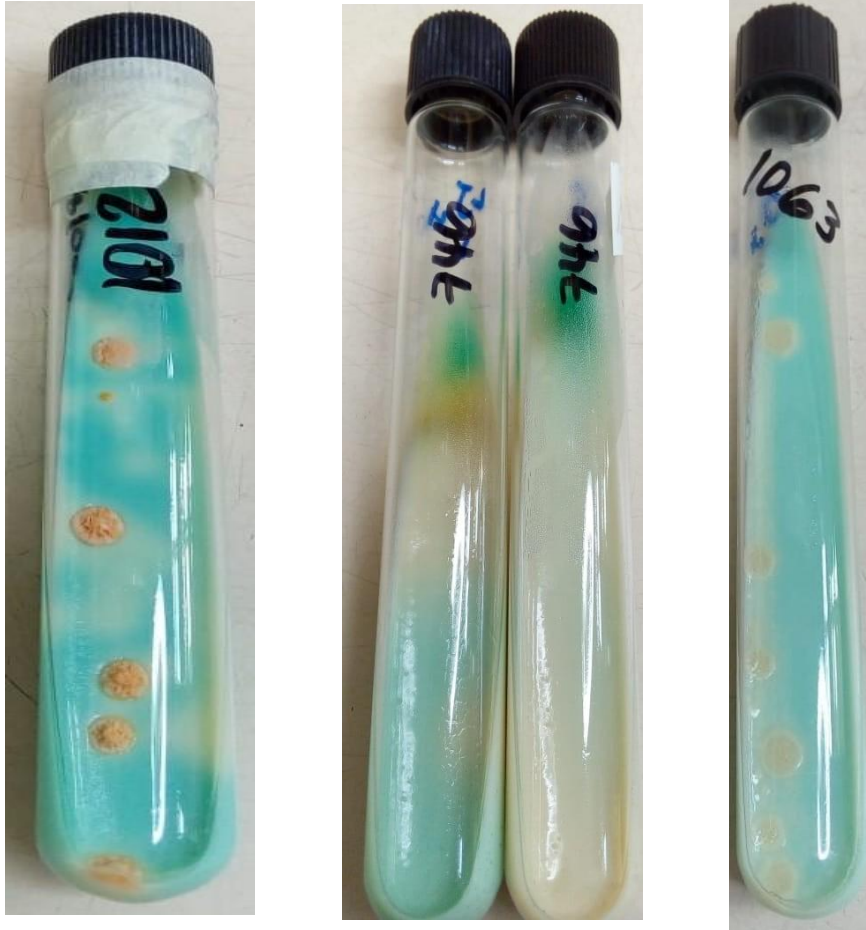
Fuente: Sección de micobacterias – Laboratorio Nacional de Salud Pública

Anexo 12. Hoja de referencia de cepas para prueba de sensibilidad y tipificación. Versión 2022

 GOBIERNO DE EL SALVADOR	MINISTERIO DE SALUD	LABORATORIO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA SECCIÓN MICOBACTERIAS HOJA DE REFERENCIA DE CEPAS PARA PRUEBA DE SENSIBILIDAD/TIPIFICACIÓN Edición 2022	<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <i>Uso exclusivo de Sección Micobacterias LNSP</i>
ESTABLECIMIENTO QUE ENVÍA: _____ TELÉFONO DE LABORATORIO: _____			
NOMBRE DEL PACIENTE: _____ REGISTRO: _____ EDAD: _____ VIH: _____ FECHA DE ENVÍO: _____ TIPO DE MUESTRA: _____ NÚMERO DE CULTIVO: _____			
MOTIVOS DE INDICACIÓN			
ALTA SOSPECHA DE TB Y 2 BK (-)			
SOSPECHA DE TUBERCULOSIS INFANTIL			
SOSPECHA DE TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR			
PERSONA CON VIH Y SOSPECHA DE TUBERCULOSIS			
FRACASO			
PÉRDIDA EN EL SEGUIMIENTO			
RECAÍDA			
CONTACTO DE CASO TB MDR O TB RR			
ANTECEDENTE O ESTANCIA ACTUAL EN CENTRO PENITENCIARIO O BARTOLINAS			
COINFECCIÓN TB/VIH			
NO NEGATIZA AL 2°, 4° O 5° MES DE TRATAMIENTO			
BK CON 1 A 9 BACILOS EN 100 CAMPOS			
MIGRANTE NACIONAL O EXTRANJERO			
PACIENTE CON TTO. QUE NO MEJORA CLÍNICAMENTE, AUNQUE SUS BK DE CONTROL SEAN NEGATIVOS.			
MICOBACTERIOSIS			
PERSONA CON DIABETES			
CASO TB MDR O TB RR			
PERSONAL DE SALUD			
POBLACIONES ORIGINARIAS			
POBLACIÓN EN SITUACION DE CALLE			
OTROS:			
RESULTADO DE BACILOSCOPIA DE CULTIVO: _____ RESULTADO DE CULTIVO: _____ FECHA DE CRECIMIENTO: _____ FECHA DE SIEMBRA: _____ CEPA DE CRECIMIENTO: LENTO <input type="checkbox"/> RÁPIDO: <input type="checkbox"/> MEDIO UTILIZADO: LJ <input type="checkbox"/> OK <input type="checkbox"/> RESULTADO DE XPERT MTB/RIF: _____ CALIDAD DE LA MUESTRA: Saliva <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Mucopurulenta <input type="checkbox"/> Sanguinolenta <input type="checkbox"/> No aplica <input type="checkbox"/>			
<p>* TODOS LOS CAMPOS SON DE LLENADO OBLIGATORIO. SERÁ MOTIVO DE RECHAZO EL LLENADO INCOMPLETO DE LOS CAMPOS.</p> RESPONSABLES: _____ _____			

Anexo 13. Características de colonias contaminantes

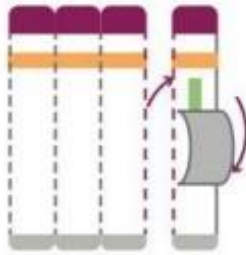
Las colonias contaminantes pueden presentar las siguientes características: pigmentadas, cremosas, lisas.



Fuente: Sección de micobacterias – Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Anexo 14. Procedimiento para LF-LAM

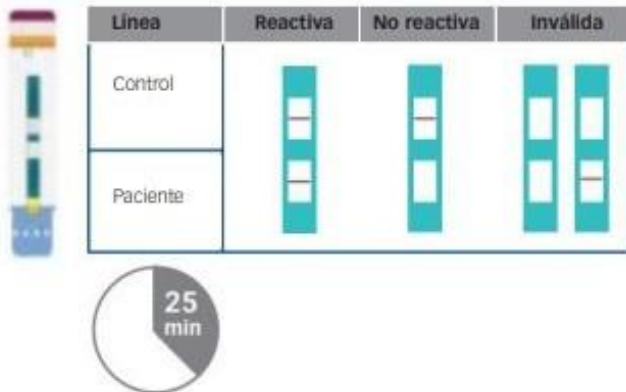
- 1 Preparar la prueba**
Separar una tira del lado derecho de la tarjeta y retirar la lámina protectora



- 2 Agregar la muestra**
Agregar 60 µl de orina en la almohadilla para la muestra



- 3 Leer los resultados**
Esperar 25 minutos y luego leer los resultados



- 4 Verificar los resultados**
Comparar los resultados con la tarjeta de escala de referencia

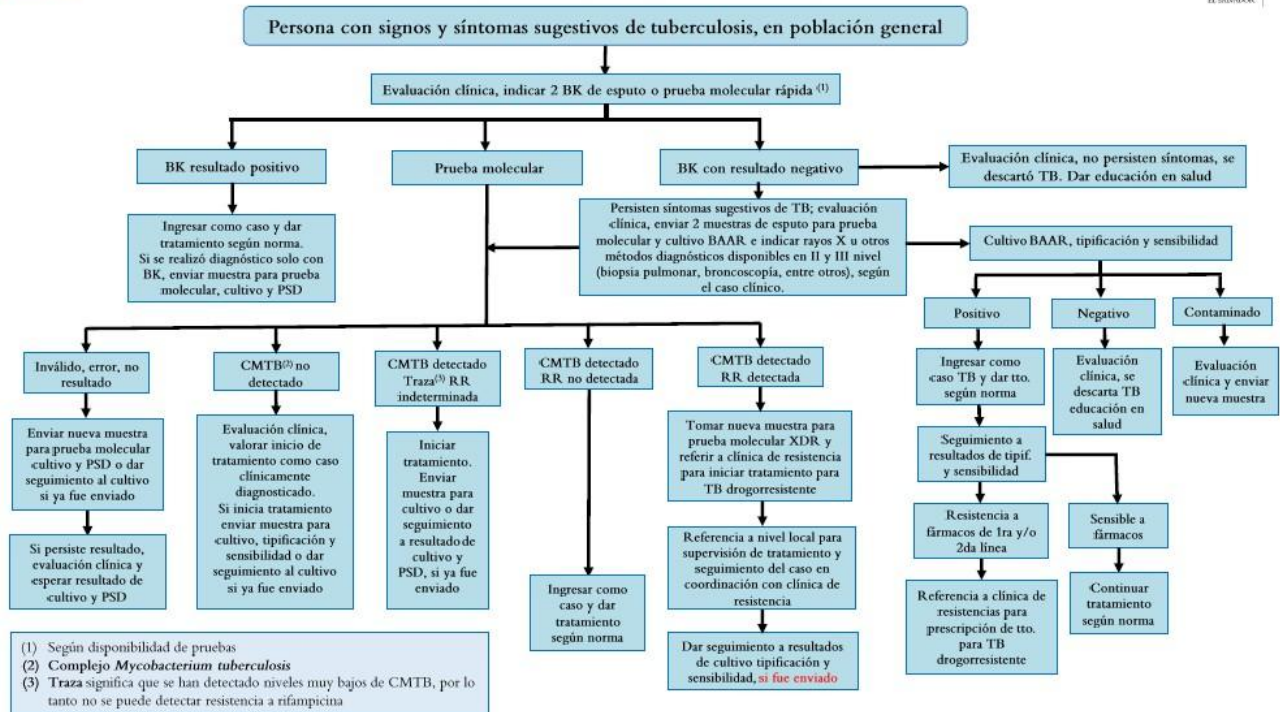


Fuente: Lineamientos técnicos para el uso de la prueba de Lipoarabinomano (LAM) como apoyo diagnóstico en pacientes con VIH y sospecha de tuberculosis. UPCTYER/MINSAL San Salvador, El Salvador, año 2020.

Anexo 15. Algoritmo para el diagnóstico y seguimiento de casos de tuberculosis

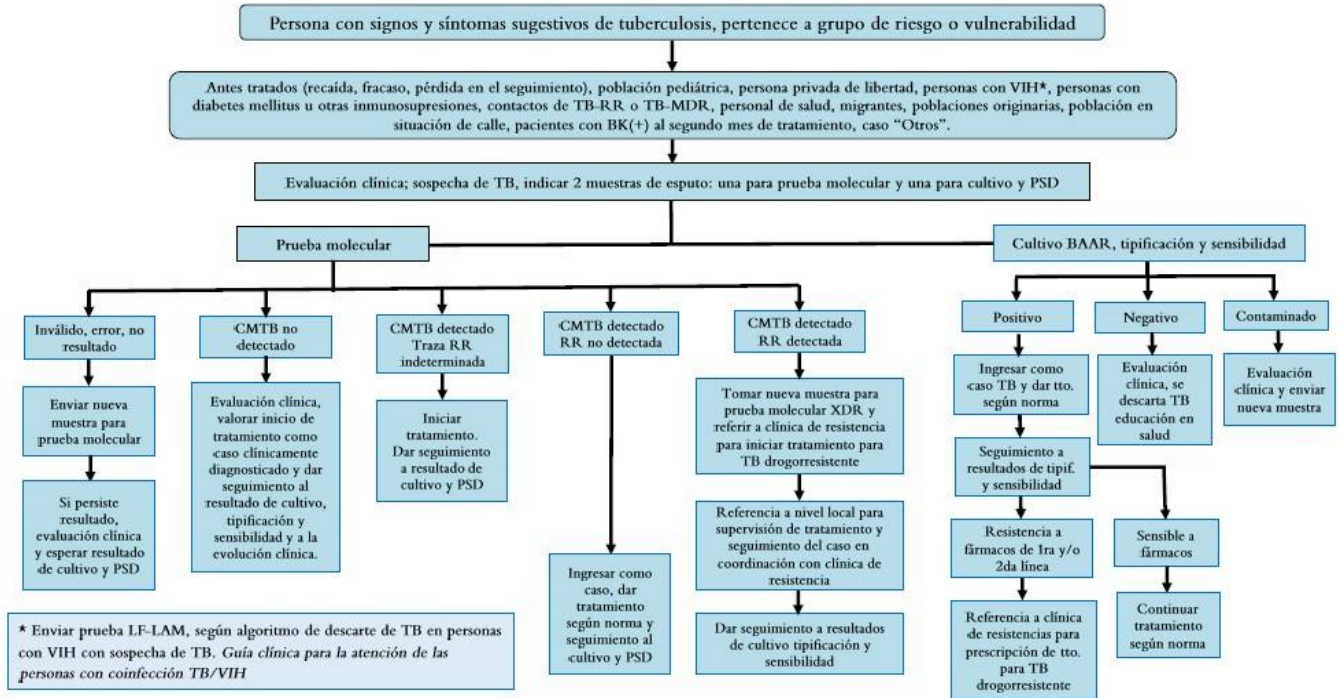


Algoritmo 1. Diagnóstico y seguimiento de casos de tuberculosis en población en general



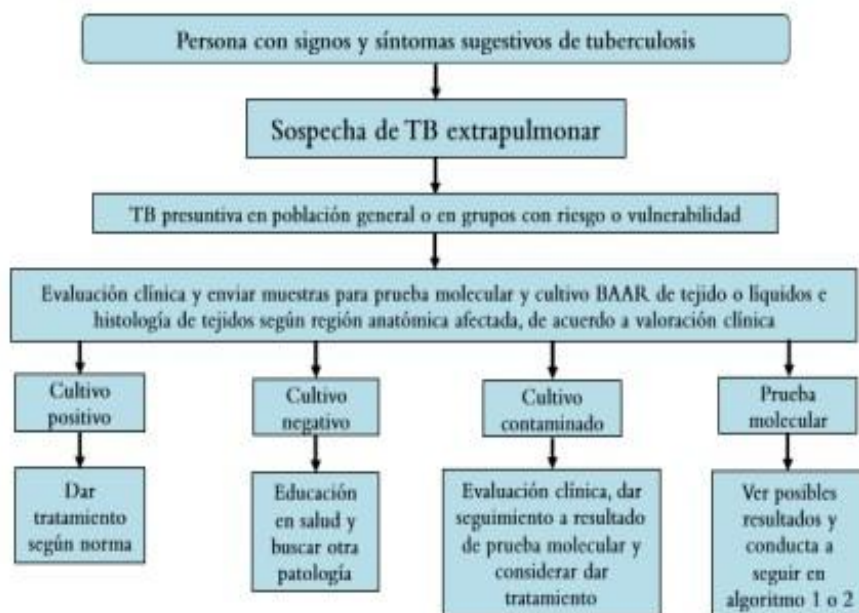
Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias/Sección de micobacterias - LNPS

Algoritmo 2. Diagnóstico y seguimiento de casos de tuberculosis en población con riesgo o vulnerabilidad



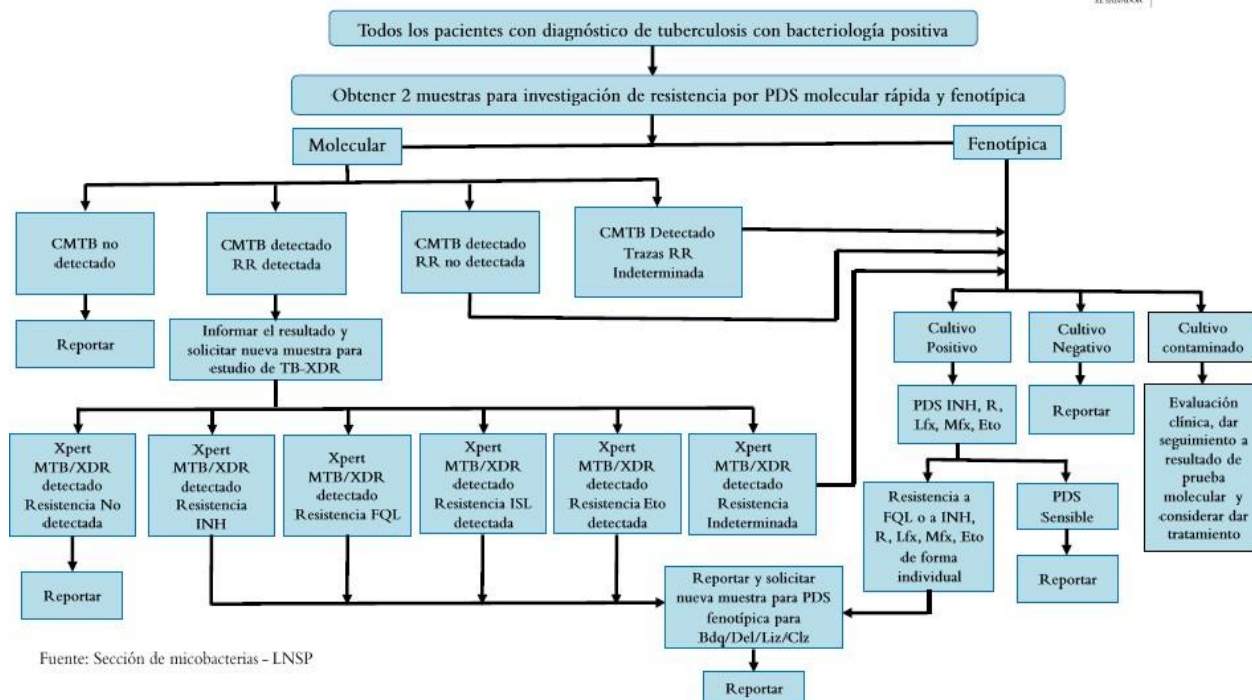
Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias/Sección de micobacterias - LNPS

Algoritmo 3. Diagnóstico de casos de tuberculosis extrapulmonar



Fuente: Unidad de prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias/Sección de micobacterias - LNPS

Algoritmo 4. Vigilancia de la resistencia a fármacos antituberculosis



Fuente: Sección de micobacterias - LNPS

Fuente: Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias/Sección de micobacterias - LNPS

Anexo 16. Envío de Control de calidad indirecto de baciloscopia



Ministerio de Salud

Unidad del Programa de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Instructivo para el llenado del libro de registro del control de calidad indirecto de baciloscopia



MINISTERIO
DE SALUD

Región: anotar el nombre de la región a la que corresponde el establecimiento de salud

SIBASI: registrar el nombre del SIBASI correspondiente.

Establecimiento: escribir el nombre del establecimiento de donde se está enviando el control de calidad.

Mes de envío: anotar el mes en que fueron vistas las láminas en el nivel local.

Fecha de envío: registrar la fecha en que se está enviando el control de calidad; ejemplo si se están enviando las láminas vistas, en el establecimiento de salud, durante el mes de enero, la fecha del mes de envío estará entre los primeros cinco días del mes de febrero

Total de láminas, de diagnóstico, enviadas: anotar en números absolutos del total de láminas de diagnóstico que están enviando a control de calidad; ejemplo: si el establecimiento de salud procesó 300 baciloscopias en un mes determinado, el total de láminas enviadas será 300.

Total de láminas, de control de tratamiento, enviadas: registrar la cantidad total de láminas de control de tratamiento enviadas para control de calidad.

Total de láminas de diagnóstico positivas, enviadas: en número absoluto registrar el total de láminas que el establecimiento de salud ha reportado como positivas (incluye de 1 a 9 bacilos) en su PCT-4; ejemplo, si el establecimiento de salud de 300 baciloscopias procesadas, reporto 50 positivas, este será el número absoluto registrado en total de láminas positivas enviadas (50).

Total de láminas de control de tto. positivas, enviadas: Anotar la cantidad de láminas de control de tratamiento, positivas, enviadas.

Total de láminas de diagnóstico negativas enviadas: en número absoluto registrar el total de láminas, de diagnóstico, que el establecimiento de salud reporto como negativas en su PCT-4; ejemplo si de 300 baciloscopias procesadas, el establecimiento de salud reporto 250 negativas, este será el número absoluto registrado en total de láminas negativas enviadas (250).

Total de láminas de control de tto. negativas, enviadas: Registrar el total de láminas de control de tratamiento, negativas que el establecimiento envía para control de calidad.

Número y porcentaje de láminas de diagnóstico, con mala calidad de muestra: Anotar el número de láminas enviadas que tienen mala calidad de muestra, también anotar el porcentaje de éstas.

Total de S.R de diagnóstico examinados: colocar el número de S.R de diagnóstico examinados en el laboratorio

Total de S.R con BK (+): colocar el número de S.R examinados en el laboratorio con al menos una BK (+).

Total de pacientes en control de tratamiento examinados: colocar el número de pacientes en tratamiento, examinados en el laboratorio.

Total de pacientes en control de tratamiento con BK (+): colocar el número de pacientes en tratamiento, examinados en el laboratorio con al menos una BK (+).

Tiempo de respuesta del laboratorio en el informe de resultados de la BK: Anotar el tiempo que transcurre desde la recepción de la muestra en el laboratorio, hasta la entrega de resultados de la BK.

Nº de cada lámina positiva: registrar los números correlativos de láminas vista como positivas y reportadas en la PCT-4 como tal; ejemplo: la baciloscopia 3, 15, 35, 45, 46, 150, fueron reportadas como positivas, estas son las que se reportarán en esta columna.

Resultado por cruces: registrar el número de cruces correspondientes a cada lámina positiva +, ++, +++ (en color rojo) o el número de bacilos observados (1 a 9 b.)

Baciloscopia diagnóstica SR: con una "X" marcar si la lámina positiva corresponde a la primera (1ra.) o segunda (2da.) del S.R.

Baciloscopia control de tratamiento: con una "X" marcar si la lámina positiva corresponde al 2do, 4to, 6to, 9no u otro mes de tratamiento.

Observaciones: anotar cualquier cosa relevante, por ejemplo: paciente con VIH, nombre del paciente, o cualquier otro aspecto que le sea de utilidad al responsable del centro de referencia de control de calidad.

Nombre del profesional que preparó el envío para el control de calidad: anotar el nombre de la persona de laboratorio que preparó el envío para el control de calidad, persona responsable de área (quien procesó la muestra).

Vo. Bo. del jefe de laboratorio: anotar el nombre del jefe de laboratorio, que revisó el envío para el control de calidad.

Sello: colocar el sello del laboratorio que está enviando el control de calidad de baciloscopia.

Anexo 17. Informe de resultado control de calidad indirecto de baciloscopías

Ministerio de Salud

Control de calidad indirecto de baciloscopías

Realizadas en la red de laboratorios clínicos de tuberculosis

Establecimiento: _____

Región: _____ SIBASI:

Baciloscopías correspondientes mes: _____ año:

Número de baciloscopías enviadas:

Número de baciloscopías supervisadas:

Fecha de recepción:

Resultados de calidad de muestra, extendidos y coloración

	Resultado %	Valor esperado
Muestras de esputo con calidad adecuada		
Extendidos buenos		
Coloración buena		

Discordancias encontradas:

Observaciones:

Recomendaciones:

Nombre y firma de responsable: _____

Sello: _____

Fecha de reporte: _____

Anexo 22. Registro de pruebas de tipificación y prueba de sensibilidad

LABORATORIO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA - SECCIÓN DE MICOBACTERIAS																		
Edición noviembre 2021																		
Fecha de recepción LNSP: _____			Fecha ingreso Micobacterias: _____			Fecha de ingreso PDS: _____												
No. de cepa	Criterio	Nombre del paciente	Tipo de muestra	VIH	Establecimiento	Expediente	Edad	Correlativo PDS										
TIPIFICACIÓN																		
Fecha de siembra de cultivo	Fecha de crecimiento de cultivo	Medio utilizado para cultivo	Catalasa T° ambiente	Catalasa 68° C	Reducción de Nitratos	ICL	Ziehl Neelsen	Fecha tipificación	Responsable									
PRUEBA DE SENSIBILIDAD																		
Fecha de lectura 21 días: _____						Fecha de siembra PDS: _____												
No de Lote medio con fármaco: _____																		
Dilución	Control 1	Control 2	Promedio	Isoniacida (I)			Rifampicina (Rif)			Moxifloxacina (Mfx)			Levofloxacina (Lfx)			Etionamida (Eto)		
				No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado
10 ⁻³																		
10 ⁻⁵																		
10 ⁻⁶																		
Dilución	Control 1	Control 2	Promedio	Isoniacida (I)			Rifampicina (Rif)			Moxifloxacina (Mfx)			Levofloxacina (Lfx)			Etionamida (Eto)		
				No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado	No de colonias	%	Resultado
10 ⁻³																		
10 ⁻⁵																		
10 ⁻⁶																		
RESULTADO																		
Resultado BK de Cultivo																		
Resultado de Cultivo																		
Resultado Xpert MTB/RIF																		
Calidad de la muestra																		
Tipificación:																		
Sensibilidad primera línea		I				R												
Sensibilidad segunda línea		Mfx				Lfx		Eto										
Fecha de resultado:				Responsable:														