Manual de técnicas y procedimientos de

BACTERIOLOGÍA de TUBERCULOSIS



GOBIERNO de GUATEMALA
DR. ALEJANDRO GIAMMATTEI

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

4ta. Edición
Guatemala 2021

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DIRECCIÓN GENERAL DE REGULACIÓN VIGILANCIA Y CONTROL DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE REGULACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE ATENCIÓN A LAS PERSONAS - DRPAP
PROGRAMA DE TUBERCULOSIS
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD

Manual de técnicas y procedimientos de

BACTERIOLOGÍA de TUBERCULOSIS

GOBIERNO de GUATEMALA
DR. ALEJANDRO GIAMMATTEI
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

Ministerio de Salud Pública
Programa de Tuberculosis
Departamento de Regulación de los Programas
de Atención a las Personas DRPAP
Guatemala 2021

AUTORIDADES

Dra. María Amelia Flores González
Ministra de Salud Pública y Asistencia Social

Dra. Norma Lucrecia Ramírez Sagastume
Viceministra Técnica

Dra. Nancy Ingrid Pezzarossi Barrera
Viceministra Administrativa y Financiera

Dr. Edwin Eduardo Montúfar Velarde
Viceministro de Atención Primaria en Salud

Dr. Francisco José Coma Martín
Viceministro de Hospitales

Dr. Bernardo Eliú Mazariegos Salazar
Dirección General del Sistema Integral de Atención en Salud –SIAS-

Dra. Mirna Floridalma Téllez Orellana
Dirección General de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud –DGRVCS-

Dra. Delmy Walesska Zeceña Alarcón
Departamento de Regulación de los Programas de Atención a las Personas –DRPAP-

Lic. César Roberto Conde Pereira
Laboratorio Nacional de Salud -LNS-

Licda. Ana Loyda Hesse
Coordinadora Programa de Tuberculosis
Departamento de Regulación de los Programas de Atención a la Personas –DRPAP-

LISTADO DE PARTICIPANTES EN LA ELABORACIÓN DE ESTE MANUAL

EQUIPO EJECUTOR

Licda. Nancy Ayala	Laboratorio Nacional de Salud
Licda. Wendy Paola Meléndez	Programa de Tuberculosis
Licda. Emilia Guzmán Ortiz	Programa de Tuberculosis

EQUIPO DE EXPERTOS

Lic. Rolando Lorenzana	Consultor Independiente
Licda. Elizabeth Gatica	Laboratorio Nacional de Salud
Licda. Vilma Samol	Laboratorio Nacional de Salud
Licda. Gilda Martínez	Programa de Tuberculosis
Licda. María Fernanda Barrios	Programa de Tuberculosis
Licda. Paola Manes	Programa de Tuberculosis
Lic. Luis Salguero	Programa de Tuberculosis
Lic. Allan Vásquez	Programa de Tuberculosis
Lic. Jorge García Salas	Programa de Tuberculosis

EQUIPO DE APOYO

Dra. Lucrecia Ramírez	Programa de Tuberculosis
Licda. Ana Loyda Hesse	Programa de Tuberculosis
Licda. Maritza Samayoa	Programa de Tuberculosis
Licda. Emilia Guzmán	Programa de Tuberculosis

EQUIPO CONDUCTOR

Dra. Carmen Lissette Vanegas	Unidad Técnica de Normas
Licda. Azucena Álvarez	Unidad Técnica de Normas

REVISORES EXTERNOS

Q.B. José Abdo Retana	Univesity Research Co., LLC
Dr. Pedro Avedillo	OPS
MsC. Carlos Arturo Vásquez Chacón	Laboratorio de Micobacterias InDRE
Dr. Armando Martínez Guarneros	Laboratorio de Micobacterias InDRE

EQUIPO DE VALIDACIÓN

Técnicos de Laboratorios. Químicos Biólogos y Supervisores de Laboratorio de las 29 Áreas de Salud.

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

Licda. Tanya S. Migoya G.	Unidad Técnica Normativa

PRESENTACIÓN

El desarrollo tecnológico ha permitido en los últimos años la fabricación de pruebas de laboratorio que han facilitado el diagnóstico de una variedad amplia de patógenos que afectan al hombre, incluido dentro de estos *M. tuberculosis*. Dichos avances han permitido que los tiempos de respuesta disminuyan, que la sensibilidad de las pruebas sea mayor y en algunos casos, requerir de infraestructura específica como en los análisis de biología molecular.

A nivel nacional la tuberculosis ha sido identificada como un problema de salud de carácter multisectorial, la cual ocasiona altas tasas de morbilidad y mortalidad que afecta a las poblaciones en edad productiva, disminuyendo la carga laboral y afectando los grupos familiares. Lo antes expuesto ha conllevado a que dicha enfermedad haya sido definida como una de las prioritarias a ser tratada y a disminuir su incidencia en Guatemala.

Actualmente el diagnóstico de tuberculosis es realizado en el segundo y tercer nivel de atención en salud, tomando como base la microscopía de bacilos ácido alcohol resistentes, el aislamiento en medios de cultivo y las pruebas moleculares, las cuales se encuentran organizadas y distribuidas acorde a una red de laboratorios que establece como nivel superior al Laboratorio Nacional de Salud.

El Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis forma parte del proceso técnico normativo que está dirigido a unificar y a fortalecer los conocimientos básicos de los trabajadores de la salud en cuanto a las pruebas diagnósticas de tuberculosis en el país, a través de la revisión de publicaciones actualizadas con alto valor científico y técnico de parte de entes internacionales especializados en la materia.

La información que ofrece este manual favorecerá al personal médico, de enfermería y especialmente al de laboratorio, para que tengan mayor conocimiento en cuanto a los fundamentos básicos de las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis, su sensibilidad y limitantes, normas de bioseguridad y gestión de la calidad en los laboratorios.

Dra. María Amelia Flores González
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DESPACHO MINISTERIAL
DE GUATEMALA, C. A.

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BAAR	Bacilo-ácido-alcohol resistente
BG	Bacillus Calmette-Guerin
BHI	Brain Heart Infusion
BK	Baciloscopía
BPM	Buenas Prácticas Microbiológicas
CBS	Cabina de Bioseguridad
CDC	Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
ECC	Evaluación externa de calidad
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPP	Equipo de Protección Personal
IGRA	Ensayo de Liberación de Interferón Gamma
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LJ	Löwenstein Jensen
LNS	Laboratorio Nacional de Salud
LPA	Ensayo Lineal de Sonda (Line ProbeAssay)
NIOSH	Instituto Nacional para la Salud y Seguridad Ocupacional, es la agencia federal estadounidense encargada de hacer investigaciones y recomendaciones para la prevención de enfermedades y lesiones relacionadas con el trabajo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos (phosphatebufferedsaline)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPD	Proteína Purificada Derivada
PSD	Prueba de susceptibilidad a drogas
PTB	Programa de tuberculosis
RAH	Recambios de aire por hora
RPM	Revoluciones por minutos
SR	Sintomático respiratorio
TB	Tuberculosis.
TBEP	Tuberculosis Extrapulmonar
TBL	Tuberculosis latente
TBP	Tuberculosis Pulmonar
TB-DR	Tuberculosis Drogorresistente
TB-MDR	Tuberculosos Multidrogorresistente
TB-RR	Tuberculosis Resistente a Rifampicina
TB-XDR	Tuberculosis Extensamente Resistente
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVOS 2

Objetivos específicos 2

Estrategia búsqueda de la evidencia 2

Resultados de la evaluación 3

Consulta de expertos 3

Declaración de conflicto de interés 3

Alcance del manual 3

Usuarios del manual 3

CAPÍTULO I: GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS.

1. Agente causal . 4
2. Huésped susceptible. 6
3. Ambiente favorable . 6
4. Infección y enfermedad. 6
5. Tuberculosis Drogo Resistente (TB-DR). 8
6. Tuberculosis y VIH. 8
7. Situación de la TB a nivel mundial regional y nacional 8
8. Estrategia Fin a la Tuberculosis. 9
9. Red de laboratorios de tuberculosis según complejidad. 9

CAPÍTULO II: BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE TUBERCULOSIS.

1. Clasificación de laboratorios por riesgo y técnicas a realizar en cada nivel. 11
2. Medidas de contención. 12
3. Medidas de contención primaria. 17
4. Medidas de contención secundarias. 17
5. Control de Infecciones de Tuberculosis 20
6. Uso de desinfectantes 24
7. Salud y seguridad ocupacional. 26

CAPÍTULO III. TOMA CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

1. Muestras de esputo 29
2. Muestras extra pulmonares 31

3. Transporte de muestras 33

CAPÍTULO IV: MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS.

1. Métodos para el diagnóstico de TB avalados actualmente por la OMS y recomendados por el PTB y LNS para su uso en el país 36
2. Baciloscopía. 39
   2a. Método de Ziehl-Neelsen. 40
   2b. Método de Fluorescencia. 43
3. Cultivo de micobacterias. 45
   3a. Cultivo en medio sólido. 51
   3b. Cultivo en medio líquido. 51
4. Ensayos de detección de Ácidos Nucleicos. 52
   4a. Xpert MTB/RIF®. 52
   4b. Xpert MTB/RIF® Ultra. 55
5. Algoritmos diagnósticos recomendados 57

CAPÍTULO V: MÉTODOS PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS.

1. Generalidades de la resistencia a drogas antituberculosas. 61
2. Prueba de sensibilidad a drogas por métodos fenotípicos. 65
   2a. Método fenotípico en medio sólido. 65
   2b. Método fenotípico en medio líquido MGIT. 67
3. PSD por métodos moleculares. 69
   3a. Ensayos de hibridación en línea (LPA). 70
   3b. Xpert MTB/RIF® 73

CAPÍTULO VI: OTROS MÉTODOS DE LABORATORIO.

1. Métodos para identificación de especies. 75
   1a. Detección de antígenos. 76
   1b. Métodos moleculares. 78
2. TB-LAM 80
3. TB-LAMP 81
4. Pruebas de detección de Interferon Gamma (IGRAS) 82

CAPÍTULO VII: SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE TB

1. Componentes de un sistema de gestión de calidad. 83
2. Elementos esenciales de un sistema de gestión de calidad en los laboratorios de TB 84

3. Entrenamiento y evaluación de competencias 85
4. Documentación y registros. 86
5. Mantenimiento de equipo. 87
6. Control de calidad interno. 94
6a. Control de Calidad de Baciloscopías. 94
6b. Control de Calidad de Cultivos 95
6c. Control de Calidad de Pruebas de Sensibilidad 96
7. Evaluación Externa de la Calidad 96
8. Indicadores de calidad 100
9. Mejora continua de la calidad 102
Glosario 103
Bibliografía 105
Anexos 109
Agradecimientos 127

LISTA DE TABLAS:

Tabla 1: Clasificación del género Mycobacterium según espectro de enfermedad. 5
Tabla 2: Métodos de diagnóstico por nivel de laboratorio según recomendaciones de OMS... 10
Tabla 3: Niveles de riesgo actividades de laboratorio asociadas y evaluación de riesgos en el laboratorio de tuberculosis. 12
Tabla 4: Equipo de Protección Personal (EPP) 14
Tabla 5: Recomendaciones para equipo de seguridad 16
Tabla 6: Características de los laboratorios según nivel de riesgo 18
Tabla 7: Clasificación estadounidense de los respiradores según eficiencia del filtrado 22
Tabla 8: Clasificación europea de los respiradores según eficiencia del filtrado 23
Tabla 9: Uso de desinfectantes 24
Tabla 10: Factores que incluir en la vigilancia de TB en trabajadores de salud 27
Tabla 11: Consideraciones para la toma de muestra de esputo. 30
Tabla 12: Consideraciones para el manejo de muestras para cultivo. 31
Tabla 13: Funciones del personal para el transporte de muestras 33
Tabla 14: Métodos avalados por la OMS y recomendados por el PTB y el LNS para el diagnóstico de TB en Guatemala 37
Tabla 15: Pasos para la realización de baciloscopía 40
Tabla 16: Clasificación de los resultados para baciloscopía de Ziehl Neelsen. 42

Tabla 17: Clasificación de los resultados para Baciloscopía de fluorescencia método de Auramina-O 43
Tabla 18: Cuantificación de cultivos en medios sólidos 50
Tabla 19: Interpretación de los resultados Xpert MTB/RIF® y Xpert MTB/RIF® Ultra 56
Tabla 20: Diferencias entre esquemas de TB de primera y segunda línea 62
Tabla 21: Métodos avalados por la OMS y aprobados por el PTB y el LNS para la detección de resistencia de TB en Guatemala. 64
Tabla 22: Genes asociados a resistencia a drogas de primera y segunda línea 70
Tabla 23: Sensibilidad y especificidad agrupada del Xpert MTB/RIF® para la detección de TB pulmonar y resistencia a la rifampicina 74
Tabla 24: Clasificación de métodos usados para identificación de micobacterias 76
Tabla 25: Componentes básicos de una evaluación de la competencia 85
Tabla 26: Resultados EEC para Baciloscopía 97
Tabla 27: Reporte de los resultados de panel de competencia para Xpert MTB/RIF® 99
Tabla 28: Indicadores de calidad recomendados para los laboratorios de TB 95 100

Lista de Figuras:

Figura 1: Red de laboratorios de tuberculosis en Guatemala en el año 2020 10
Figura 2: Bata de cierre delantero no desechable y bata desechable 13
Figura 3: Procedimiento para el descarte de guantes 15
Figura 4: Segregación de desechos 19
Figura 5: Flujograma para la realización de evaluación de riesgos 20
Figura 6: Ejemplo de almacenamiento de respiradores N95 22
Figura 7: Procedimiento para colocarse y retirarse el respirador N95 23
Figura 8: Kit de derrames 26
Figura 9: Ejemplo de frasco recomendado para muestras de esputo 29
Figura 10: Ejemplo de triple embalaje utilizando sistemas comerciales 34
Figura 11: Ejemplo de triple embalaje utilizando materiales presentes en el laboratorio 35
Figura 12: Tinción de Ziehl Neelsen 41
Figura 13: Ejemplo de cuadrícula de lectura de resultados 42
Figura 14: Tinción fluorescente 44
Figura 15: Procedimiento para realizar prueba Xpert MTB/RIF® 54
Figura 16: Algoritmo 1: Pacientes con sospecha de TB 58

Figura 17: Algoritmo Resumido para sospecha de TB a nivel local 59
Figura 18: Algoritmo 2: Pacientes con sospecha de TB de poblaciones con riesgo de TB-RR/MDR y vulnerables 60
Figura 19: Procedimiento de método de proporciones para drogas de primera línea 66
Figura 20: Procedimiento de método de proporciones para drogas de segunda línea 66
Figura 21: Genotype MTBDRplus® ver 2.0 71
Figura 22: Genotype MTBDRsl® ver 1.0 y ver 2.0 71
Figura 23: Interpretación para la prueba MPT64 78
Figura 24: Esquema y especies detectadas por Genotype Mycobacterium CM 2.0 79
Figura 25: Esquema y especies detectadas por Genotype Mycobacterium AS 1.0 79
Figura 26:Elementos de un sistema de gestión de calidad 84
Figura 27: Esquema del microscopio óptico y sus principales componentes. 88
Figura 28: Manejo de materiales dentro de la CBS 91
Figura 29: Colocación de material dentro de la CBS 91
Figura 30: Estuche 3M para la realización de prueba de ajuste cualitativa 123



INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad que aumenta a nivel mundial cada año y Guatemala no es la excepción, por lo que cada país debe de contar con pruebas diagnósticas que faciliten la detección rápida, económica y eficaz para la detección de los casos de tuberculosis.

Uno de los objetivos más importantes es la reducción sostenida de la prevalencia y de la mortalidad por tuberculosis. El diagnóstico de laboratorio es indispensable para confirmar la sospecha clínica de TB, es por esto que la red de laboratorios debe de funcionar de manera eficiente.

El laboratorio de bacteriología de tuberculosis es imprescindible por el rol que desarrolla en el diagnóstico y caracterización microbiológica, así como el seguimiento al tratamiento y determinación de resistencias por lo que es un factor crítico para alcanzar las metas establecidas.

La presente edición del Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis tiene como propósito ser una herramienta técnica que contribuya a mejorar los diversos procedimientos del laboratorio, que de manera resumida aborde los principales lineamientos para fortalecer el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis, así como el seguimiento al paciente con TB a través de métodos de laboratorio.

Este manual incorpora las nuevas tecnologías avaladas por la Organización Mundial de la Salud y recomendadas por el Programa de Tuberculosis y el Laboratorio Nacional de Salud, y hace una actualización de las técnicas utilizadas históricamente, como la baciloscopía y el cultivo de micobacterias.

La importancia de la publicación de este manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis es que la red nacional de laboratorios (públicos y privados) cuente con una herramienta práctica y actualizada, que pueda consultar para su aplicación en el trabajo cotidiano.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Brindar una herramienta técnica basada en lineamientos que contribuyan a mejorar el funcionamiento efectivo y de calidad, en los laboratorios de Tuberculosis.

Objetivos Específicos:

1. Describir las técnicas implementadas en Guatemala para el diagnóstico y seguimiento del paciente con tuberculosis.
2. Contribuir a la aplicación de las medidas de bioseguridad y controles de calidad que deben cumplirse, cuando se desarrolle un procedimiento técnico.
3. Describir los algoritmos diagnósticos recomendados en el país, tomando en cuenta enfermedades asociadas como VIH y diabetes, así como factores de riesgo para tuberculosis fármaco resistente.
4. Brindar lineamientos para asegurar la exactitud del resultado, a través del establecimiento de sistemas de gestión de calidad.

RESUMEN DEL PROCESO METODOLÓGICO

Este manual fue elaborado mediante la metodología AGREE basados en los siguientes documentos. “Manual para el procedimiento bacteriológico de la tuberculosis” 2018, parte 1-4. Los contenidos han sido actualizados a partir de recomendaciones de expertos de OPS/OMS, profesionales del Laboratorio Nacional de Salud y del Programa de Tuberculosis.

Estrategia búsqueda de la evidencia

El Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis fue elaborado por el Laboratorio Nacional de Salud y el Programa de Tuberculosis, para lo cual se revisó del último “Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología en el año 2008,” realizando consultas de actualizaciones avaladas por la OMS y otras guías internacionales de las cuales se hace referencia en la bibliografía.

Para la búsqueda de la evidencia se conformó un equipo de trabajo multidisciplinario integrado por: Médicos Epidemiólogos, Químicos Biólogos, Licenciados en Enfermería y personal de campo del Programa de Tuberculosis, técnicos de laboratorio de diferentes áreas de salud en diversas reuniones de trabajo.

Resultados de la evaluación

Al tener seleccionadas las referencias bibliográficas se procedió a efectuar la evaluación de la evidencia científica. La que mejor punteo obtuvo fue "Manual para el procedimiento bacteriológico de la tuberculosis" 2018 con un puntaje de 60-90 % la cual fue adaptada al contexto nacional.

Consulta de expertos

Las consultas realizadas para la actualización de "El Manual de Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis", están basadas en la búsqueda de información con respaldo científico y de opinión de expertos de: Organización Panamericana de la Salud OPS, Unirversity Research CO. URC; Laboratorio Supranacional de Tuberculosis de México.

Declaración de conflicto de interés

Todos los expertos involucrados expresaron no tener conflicto de interés en la revisión del manual. Para lo cual se utilizó instrumento correspondiente.

Alcance del manual

El Manual de Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis, será de observancia nacional en todos los laboratorios públicos y privados del país, en el primer, segundo y tercer nivel de atención en donde se realicen procedimientos para el diagnóstico, seguimiento, caracterización de tuberculosis y control de calidad de tuberculosis.

Usuarios del manual

El presente manual será de uso para todo el personal de salud que brinde servicios de laboratorio en el país (gubernamental y no gubernamental).

Marco Legal

- Constitución Política de la República de Guatemala
- Acuerdo Gubernativo 115-99
- Decreto 90-97 Código de Salud

CAPITULO 1

GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha acompañado a la humanidad desde sus inicios, identificándose rastros de ella en momias incas y egipcias. Es causada por la interacción entre las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (agente causal); un huésped susceptible (el ser humano) y el medio ambiente (se trasmite por vía aérea) (1).

1. Agente causal

El género Mycobacterium comprende en la actualidad más de 200 especies. Todas las micobacterias comparten en común una pared celular con alto contenido de lípidos (ácidos micólicos) lo que les confiere sus particulares características de tinción, haciéndolas resistentes a la decoloración con alcohol ácido (alcohol ácido resistente). Otras especies relacionadas también contienen ácidos micólicos (Ej. Nocardia y Rhodococcus) sin embargo, la cantidad de estos es mucho menor, por lo que se observan al microscopio de color menos intenso (parcialmente alcohol ácido resistente). Las micobacterias son preferentemente aerobias, no móviles, no forman esporas y la mayoría tiene forma de bacilos, ya sea rectos o ligeramente curvos. Otra característica importante es su lento crecimiento comparado con otras bacterias, necesitando desde 5 días hasta varias semanas para crecer en cultivos (2). Tomando en cuenta el tipo de enfermedad que causan, se pueden dividir en tres grupos: Complejo M. tuberculosis, M. leprae y otras Micobacterias (3).

Tabla No. 1

Clasificación del género *Mycobacterium* según espectro de enfermedad

Micobacteria	Especies	Enfermedad	Importancia en salud pública
Complejo M. tuberculosis[1]	M. tuberculosis, M. bovis, M africanum, M. pinnipedii, M. microti, M. caprae, M. orygis, M. mungi y M. canetti (2)	Todas causan TB, por lo que, desde el punto de vista de salud pública, no se recomienda la identificación de especies. (3).	Enfermedad bacteriana de mayor prevalencia a nivel mundial. El tratamiento es el mismo independientemente de la subespecie involucrada (2).
M. leprae	M. leprae.	Lepra; enfermedad crónica que afectapiel, sistemanervioso periférico y membranas mucosas.(2).	Algunas lesiones son baciloscopía positiva. M. leprae no se puede cultivar en medios sólidos o líquidos (2).
Otras Micobacterias	Aproximadamente 200 especies: M. avium,M. fortuitum, M. kansasii, M. xenopi, M. abscessus y el complejo M. chelonae(2).	Micobacteriosis[3].	Se encuentran en suelos y el agua, incluyendo agua tratada. No hay evidencia de trasmisión humano-humano (4). La mayoría no causa enfermedad. Algunas son patógenos oportunistas enpacientes inmunosuprimidos Ej. Pacientes VIH, cáncer, etc.). (2).

Fuentes: Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria Forbes et al., 2018; Practical guide for clinicians, nurses, laboratory technicians and medical auxiliaries Varaine & Rich, 2014; Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases Griffith et al., 2007.

1. En el presente manual, siempre que se describa M. tuberculosis, se está haciendo referencia al Complejo M. tuberculosis, a menos que se especifique lo contrario.
2. M. bovis tiene resistencia natural a la pirazinamida y M. africanum tiene resistencia natural a la tiacetazona.
3. Nombre que reciben un amplio número de condiciones clínicas causadas por las micobacterias que no pertenecen al complejo M. tuberculosis.

2. Huésped susceptible

A pesar de que algunos mamíferos pueden ser hospederos del complejo M. tuberculosis (vacas, cabras y alces pueden ser hospederos de especies del complejo M. tuberculosis como M. bovis, M. caprae y M. pinnipedii), el principal huésped es el ser humano. Prácticamente cualquier persona puede infectarse o enfermarse por tuberculosis, sin embargo, algunos factores favorecen la aparición de la enfermedad. Entre estos factores se encuentran la edad (extremos de la vida), el estado nutricional, la presencia de otras enfermedades y aspectos genéticos poblacionales (raza) e individuales. Es importante mencionar que solo las personas enfermas pueden trasmitir la bacteria a otras personas (5).

3. Ambiente favorable

Debido a que M. tuberculosis se trasmite principalmente por el aire, aquellos ambientes con poca ventilación o que favorecen la hacinación, son los ideales para la trasmisión de un huésped a otro, razón por la cual factores socioeconómicos que favorecen estos ambientes tienen gran impacto en la epidemia de tuberculosis en el mundo (5).

4. Infección y enfermedad

4.a Infección y factores de riesgo para infectarse

La infección es el momento en el que M. tuberculosis ingresa al cuerpo humano y se aloja en el tejido. El sistema inmune, por lo general, detiene su replicación, sin embargo, no es capaz de eliminarlo con lo que se produce la llamada infección latente (1).

La transmisión de los bacilos ocurre casi exclusivamente de persona a persona por vía aérea, es decir, mediante dispersión de aerosoles. La fuente es una persona con tuberculosis infecciosa, que al toser o hablar produce gotas diminutas que se esparcen fácilmente en el aire (5).

Una vez que M. tuberculosis llega a los pulmones y penetra en los alvéolos, se multiplica. La mayoría de las personas infectadas, aproximadamente 90% nunca enfermará. Los bacilos permanecen latentes en el organismo y sólo una pequeña proporción de los infectados (entre el 5 y 10%) desarrollará la enfermedad (1,6).

El riesgo individual de infección depende de la exposición a los núcleos infecciosos, la duración de laexposición y la concentración de los núcleos, así como de la sensibilidad del individuo a la infección (edad, desnutrición, enfermedades virales, predisposición genética, entre otras). Por consiguiente, el riesgo de infección es mayor cuando hay exposición continua y prolongada en un espacio reducido a casos de tuberculosis pulmonar (TBP) conbaciloscopía positiva (BK+)(5,7).

4.b Enfermedad y factores de riesgo para enfermarse

Solo unas pocas personas que se infectan enfermarán. Entre los que se enferman, la mitad lo harán entre los primeros 2 años de la primera infección. La otra mitad, se enfermarán después de 2 años de haberse infectado por primera vez (1).

El riesgo de pasar de infección a enfermedad depende de varios factores relacionados al agente causal, al ambiente o al huésped. En cuanto al agente, existen cepas con mayor virulencia que otras, por ejemplo, las cepas de M. bovis que se usan en la vacuna BCG tienen virulencia disminuida, por el contrario, algunas cepas de M. tuberculosis, como la cepa Beijing, son mucho más agresivas y letales que otras cepas (1,2).

Entre los factores ambientales, los más críticos son la distancia boca a boca, es decir, el grado de hacinamiento, la duración de la exposición y la ventilación (6). Entre los factores relacionados al huésped están la etnia (los descendientes de Europeos tiene mayor protección), desnutrición, el alcoholismo, el tabaquismo, enfermedades debilitantes, infecciones virales, sobre todo el VIH, la diabetes y el cáncer (1).

Una vez se da la enfermedad, esta se puede dividir en dos tipos: la Tuberculosis Pulmonar (TBP) y la Tuberculosis Extra Pulmonar (TBEP, Tuberculosis en un sitio anatómico distinto al pulmón). La TBP es la forma más frecuente (≈80% de los casos) e infecciosa. Las formas de TBEP (aproximadamente 20% de los casos), son menos comunes y por lo general se dan en personas con inmunosupresión siendo frecuentemente menos infecciosas (8).

La TBP comúnmente presenta los siguientes síntomas: tos de larga duración (más de dos semanas) con expectoración (producción de esputo), fiebre, pérdida de peso y sudoración nocturna. Las formas de TBEP se pueden presentar a cualquier edad, sin embargo, son más frecuentes en niños pequeños y personas con VIH (PV). Los síntomas dependerán del sitio anatómico afectado.

Entre las formas de TBEP más comunes están: miliar, linfática, meníngea osteoarticular, abdominal, mal de Pott (TB en la columna vertebral), pleural y pericárdica (3).

5. Tuberculosis Drogo Resistente (TB-DR)

Las formas de TB resistentes a los fármacos anti-tuberculosos, son un obstáculo importante para el cuidado y la prevención de la TB a nivel mundial. Desde el punto de vista de los fármacos involucrados, la TB-DR puede clasificarse como mono-resistente (resistente a una sola droga), poli-resistente (resistente al menos a 2 drogas, sin la combinación isoniacida y rifampicina),multidrogo resistente (TB-MDR, resistente a la isoniacida y la rifampicina simultáneamente) y extensamente resistente TBXDR (TB causadas por cepa de *M. tuberculosis* que cumple con la definición de TB-RR/MDR y que también son resistentes a cualquier fluroquinolona y adicionalmente al menos a un medicamento del grupo A) (9,10). Actualmente, por el uso de algunos métodos comerciales que detectan la resistencia a la rifampicina y las implicaciones de esta se ha adoptado el término Tuberculosis Rifampicina Resistente (TB RR) (11).

6. Tuberculosis y VIH

El impacto de la co-infección VIH y tuberculosis es bidireccional. La Tuberculosis aumenta la Carga Viral de VIH, acelerando la progresión de la infección por VIH a VIH avanzado y con ello a la muerte. Por su parte, la infección por VIH causa una disminución de linfocitos CD4 (importante en la respuesta inmune celularante la TB) y afecta la presentación clínica y evolución de la tuberculosis, promoviendo la progresión a enfermedad y aumentando la tasa de recurrencia por TB, la mortalidad y el desarrollo de formas de TBEP y baciloscopía negativa (BK-), lo que afecta directamente el rendimiento de los métodos diagnósticos convencionales (8).

7. Situación de la TB a nivel mundial, regional y nacional

Mundialmente, se estimaron 10.4 millones (8.8 a 12.2) de casos nuevos en el 2016, lo que equivale a 140 casos por 100,000 habitantes. Se estimó que el 3% del total de casos ocurrió en la región de las Américas. A nivel mundial, existen 30 países de alta carga que representan el 87% de los casos nuevos para este año y 5 países (India, Indonesia, China, Filipinas y Pakistán) acumulan el 56% de todos los casos nuevos. En cuanto a la notificación de casos, en el año 2016 se reportaron 6.6 millones de personas con TB en todo el mundo, de los cuales 6.3 millones fueron casos nuevos o recaídas, y 300,000 fueron casos previamente diagnosticados (12).

En las Américas se estimaron 274 mil casos (255 – 294) nuevos en el año 2016, lo que representa una tasa de 27 por cada 100,000 habitantes (26 – 29). Por otro lado, se notificaron 233,793 casos, de los cuales 221,008 fueron casos nuevos o recaídas, con 77% de casos bacteriológicamente confirmados (12).

En Guatemala, La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 4,000 casos de TB en todas sus formas para el año 2016 lo que representa una tasa de 24.1/100.000 habitantes. Ese mismo año, se notificaron al PTB un total de 3.281 casos de TB, de los cuales 3.090 (94%), fueron casos nuevos, que corresponde a una tasa de incidencia de 19.4/100.000 habitantes (13).

8. Estrategia fin a la Tuberculosis

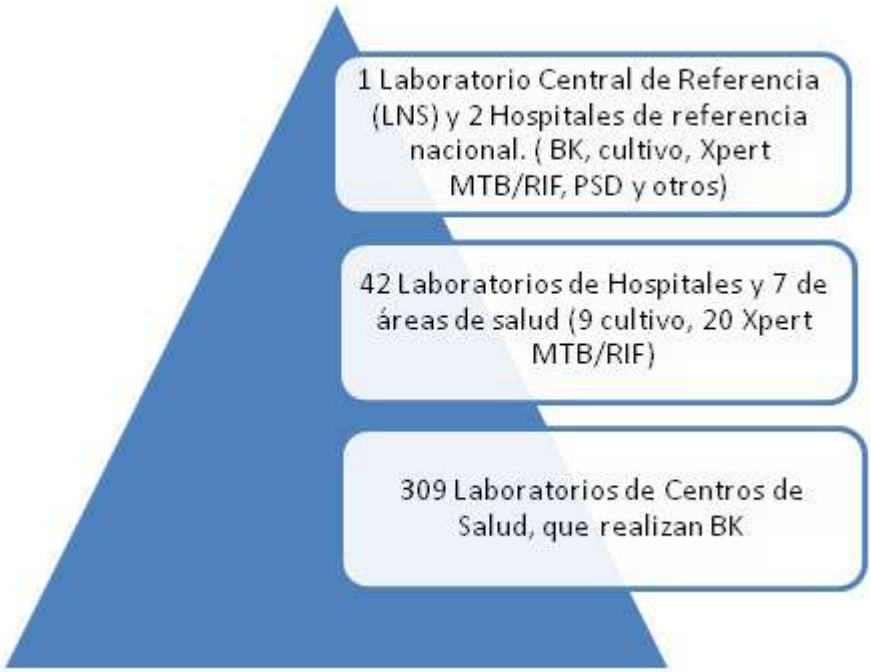
Ésta fue lanzada por la OMS como una estrategia de continuación a la estrategia "Alto a la TB". Tiene como visión un mundo libre de tuberculosis, con cero muertes, enfermos y sufrimiento debido a esta enfermedad. El objetivo de esta es poner fin a la epidemia de TB. Guatemala, al igual el resto de estados miembros de la OMS, se comprometió a la implementación de esta estrategia (14).

9. Red de laboratorios de tuberculosis según complejidad

Debido a la naturaleza especializada de las diferentes técnicas y procedimientos necesarios para el diagnóstico de la TB, se debe contar con redes estratificadas de laboratorios con diferentes niveles de complejidad, así como sistemas de referencia de muestras y resultados eficientes (15).

Actualmente, en la red de laboratorios de Guatemala se realiza: baciloscopía (BK), cultivos, identificación de especies de micobacterias, pruebas de sensibilidad a drogas (PSD) y pruebas moleculares(Xpert MTB/RIF®, entre otros) (16).

Figura No. 1
Red de laboratorios de tuberculosis en Guatemala en el año 2018



Fuente: MSPAS, DRPAP, Componente de laboratorio PTB, Guatemala,2018.

Tabla No. 2

Métodos de diagnóstico por nivel de laboratorio según recomendaciones de OMS

Nivel de laboratorio	Técnicas recomendadas
Periférico	• Baciloscopía, utilizando tinción de ZiehlNeelsen o tinción de fluorescencia. • Xpert MTB/RIF®.
Intermedio	• Todos los realizados en el nivel periférico. • Cultivos en medios sólidos. • Ensayos de hibridación en tira (LPA) directo de muestras de esputo BK+. • Evaluación externa de calidad de baciloscopía.
Laboratorio Nacional de Salud y otros laboratorios de referencia	• Todos los realizados en el nivel periférico e intermedio. • Cultivos en medios líquidos. • Pruebas de sensibilidad a drogas de 1ra y 2da línea en medios sólidos o líquidos. • Ensayos de hibridación en tira de cultivos positivos. • Pruebas para identificación de especies.

Fuente: Raviglione M,The End TB Strategy, World Health Organization,Geneve, Switzerland, 2015

Esta tabla, muestra las recomendaciones de la OMS sobre el uso de técnicas complementarias en diferentes niveles de complejidad.

CAPITULO

2

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE TUBERCULOSIS

1. Clasificación de laboratorios por riesgo y técnicas a realizar en cada nivel

El abordaje de bioseguridad más apropiado para un laboratorio de tuberculosis es enfocarse en la evaluación de riesgo, teniendo en cuenta los distintos tipos de procedimientos que se realicen en el laboratorio. Debido a lo anterior, cada prueba relacionada con M. tuberculosis debería ser asignada a un nivel de bioseguridad que tome en cuenta al menos el nivel de carga bacilar de la muestra y la probabilidad del procedimiento de generar aerosoles (17) .

Tabla No. 3

Niveles de riesgo, actividades de laboratorio asociadas y evaluación de riesgos en el laboratorio de tuberculosis

Nivel de riesgo	Actividad de laboratorio	Evaluación de riesgo
Bajo	BK directo de esputo. Preparación de muestras para la prueba Xpert MTB/RIF®.	Bajo riesgo de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; baja concentración de partículas infecciosas.
Moderado	Preparación de muestras para cultivos primarios (sólido o líquido). Pruebas de sensibilidad directa (por ejemplo, LPA de muestra directa).	Riesgo moderado de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; baja concentración de partículas infecciosas.
Alto	Pruebas de sensibilidad por métodos fenotípicos, manipulación de cultivos para identificación de especies de micobacterias. Procedimientos de extracción para PCR a partir de cepa (ejemplo ensayos de LPA).	Alto riesgo de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; alta concentración de partículas infecciosas.

Fuente: Lumb R, Shephard L, Bastian I, Fitz M., (Global Laboratoy Initiative (GLI). Laboratory Safety.Geneva, Switzerland, 2019. P. 18.

2. Medidas de contención

Las medidas de contención son la combinación de parámetros de diseño físico y prácticas operativas que protegen al personal, el entorno de trabajo inmediato y la comunidad de la exposición al material biológico. Las medidas de contención se dividen en primarias y secundarias (18).

3. Medidas de contención primaria

Corresponden a las buenas prácticas de trabajo y el uso adecuado de los equipos de protección (elementos de protección personal y equipos de contención) y buscan proteger al personal y el ambiente del laboratorio (19).

Equipo de Protección Personal (EPP)

El equipo de protección personal se refiere a los dispositivos y la ropa diseñados para minimizar el riesgo de exposición a diversos peligros. Se debe aclarar que el EPP es la última línea de defensa para proteger al personal de laboratorio de los riesgos de infectarse o evitar la transmisión de un patógeno a terceros (18).El uso consistente de EPP debe ser la última forma de control del personal de laboratorio, el uso de estas jamás suplirá los controles administrativos o de ingeniería que deben tomarse en el laboratorio (18).

Figura No. 2
Bata de cierre delantero no desechable y bata desechable



Fuente: MSPAS, Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

Tabla No. 4

Equipo de Protección Personal (EPP)

Equipo	Recomendación
Ropa de protección personal	• El personal del laboratorio debe vestir en todo momento ropa de protección mientras realiza procedimientos dentro del laboratorio. • La ropa de protección no debe llevarse fuera de la zona del laboratorio y debe guardarse en un lugar separado de la ropa de calle. • Las batas de laboratorio deben tener manga larga, puño elástico y de apertura frontal, el personal debe tener a su disposición batas de distintas tallas; esta bata se utilizará en todo momento dentro del laboratorio. • En laboratorios de mediano y alto riesgo el personal deberá vestir además de la bata de apertura frontal, por encima una bata descartable de apertura trasera. • No debe llevarse calzado abierto en el laboratorio y no deben utilizarse teléfonos móviles al momento de estar realizando trabajos operativos.
Guantes	• Se deben utilizar guantes en todos los procedimientos que requieran contacto directo o exista riesgo de contacto accidental con esputos, sangre, líquidos corporales u otros materiales potencialmente infecciosos. • Los guantes desechables no deben reutilizarse nunca; una vez usados, deben eliminarse con los desechos infecciosos del laboratorio en la bolsa roja.
Respiradores	• La protección respiratoria tiene por objetivo proteger al personal de salud en áreas donde la concentración de núcleos de gotitas de M. tuberculosis no puede ser reducida adecuadamente por medidas de control administrativo y ambiental (17). • Deben utilizarse respiradores N95 (norma de los EE. UU. NIOSH) o FFP2 (norma europea EN). Estos respiradores filtran el 94%–95% de las partículas de ≥ 0.3–0.4 µm (14). Deben eliminarse con los desechos infecciosos del laboratorio en la bolsa roja.

Fuente: Minister of Health and the Minister of Agriculture and Agri-Food,Canadian Biosafety Handbook Public Health Agency of Canada, 2016.

Figura No.3
Procedimiento para el descarte de guantes



Fuente: Minister of Health and the Minister of Agriculture and Agri-Food,Canadian Biosafety Handbook Public Health Agency of Canada, 2016.

Equipo de seguridad

El buen uso del equipo de seguridad tiene como finalidad minimizar los riesgos en los laboratorios de TB. Este equipo no ofrece una garantía total de protección a menos que el operador sea competente y use las técnicas adecuadas. El equipo también se debe probar regularmente para garantizar que continúe funcionando de forma segura (18). Acontinuación, en la tabla No. 5 se describen los principales equipos.

Tabla No.5

Recomendaciones para equipo de seguridad

Equipo de seguridad	Función	Recomendaciones
Mechero	Crear un ambiente estéril por encima y alrededor de nuestra área de trabajo.	• No debe utilizarse dentro de la cabina de bioseguridad para evitar dañar los filtros de la cabina o interferir con el flujo laminar. • Se debe evitar flamear cualquier objeto con material biológico, para reducir el riesgo de aerosoles. • En caso de utilizarse mechero bunsen, el diseño debe asegurar que el cilindro de gas propano no se encuentre dentro del laboratorio.
Autoclave	Esterilizar instrumentos y material. Descontaminación de material biológico dentro del laboratorio.	• Las autoclaves deben situarse lejos de la zona principal del trabajo, debe destinarse un área especial para su uso. • Debe utilizarse una bolsa adecuada para la descontaminación de material biológico. • En caso de autoclavear las muestras dentro del servicio, se debe evitar agregar soluciones como cloro o fenol (para evitar vapores tóxicos).
Centrífuga	Permite la sedimentación de la muestra en sus componentes (fase sólida y líquida), según su densidad.	• Riesgo de generación de aerosoles infecciosos. • Se deben usar tubos de plástico que sean adecuados para la centrifugación, preferentemente tubos de plástico con tapa de rosca. • Los contenedores con muestras de material infeccioso deben abrirse solamente dentro de una cabina de bioseguridad. • Se debe esperar por un tiempo suficiente para que los aerosoles se asienten antes de abrir los contenedores.

Fuente: Minister of Health and the Minister of Agriculture and Agri-Food, Canadian Biosafety Handbook Public Health Agency of Canada, Ottawa, 2016, p 146, 147.

Cabina de Bioseguridad (CBS)

Todas las actividades que correspondan a un moderado o alto riesgo (ver cuadro No.1), deben ser realizados dentro de una cabina de bioseguridad (CBS). Esta es la forma primaria de contención mientras se manipulan muestras y realizan procedimientos para la inoculación de cultivos o para la realización de pruebas de sensibilidad a drogas –PSD-. Por consiguiente, una buena técnica microbiológica y el uso adecuado de las CBS son fundamentales para que el trabajo se realice en condiciones de seguridad.

El uso inadecuado de la CBS permite que se liberen aerosoles al laboratorio (17).

La CBS recomendada es la de clase II tipo A2, mismas que protegen al personal, el ambiente y los medios que se están inoculando (protección del producto). En aquellos lugares donde el suministro eléctrico sea poco fiable, se debe contar con unaunidad de suministro de energía (UPS), de modo que si en caso existiera una interrupción, el personal del laboratorio tenga tiempo suficiente para terminar con seguridad toda tarea peligrosa y para que el aire contaminado que se encuentra dentro de la cámara no sea expulsado al exterior de manera abrupta (17). En el capítulo 6, se hace una descripción más detallada del uso correcto de la CBS.

4. Medidas de contención secundarias

Estas corresponden a las condiciones de infraestructura que buscan proteger al ambiente externo del laboratorio.El diseño del laboratorio, independientemente de su tamaño o del trabajo que realiza, debe brindar un ambiente seguro a las personas que permanecen o circulan en el mismo (19).

Tabla No.6

Características de los laboratorios según nivel de riesgo

Nivel de riesgo	Características
Bajo riesgo	• La mesa utilizada para tratar las muestras debe estar separada de las zonas utilizadas para recibir las muestras y de las zonas administrativas. • Las áreas deben ser espaciosas, iluminadas y ventiladas. • En general, se recomienda tener una temperatura controlada, el laboratorio debe contar con la opción de poder abrir ventanas que favorezcan un flujo de aire unidireccional. • Asegurar un mínimo de 6 a 12 Recambios de Aire por Hora (RAH) en el laboratorio. • Pisos y mesas de trabajo de materiales impermeables, no porosos y fácilmente lavables. • Contar con un lavamanos para el personal, no se recomienda utilizar el mismo espacio físico para el lavado de manos y las tinciones de BK.
Moderado riesgo	• Contar con requerimientos mínimos de un laboratorio de bajo riesgo. • Las áreas del laboratorio separado de las zonas abiertas al tránsito. • Contar con una CBS (recomendable tipo II A2). La CBS debe situarse lejos de las zonas de paso y fuera de las corrientes cruzadas de puertas y sistemas de entrada de aire (aire acondicionado). • Disponerse un lugar para lavarse las manos en las proximidades de la salida del laboratorio. • Espacio separado para la descontaminación de material y muestras.
Alto riesgo	• Contar con requerimientos mínimos de un laboratorio de moderado riesgo. • El laboratorio debe contar con dos conjuntos de puertas de entrada para crear una antesala al área de procesamiento. Este diseño crea una barrera física entre la sección de procesamiento y otras zonas del laboratorio. • El área de procesamiento de muestra debe contar con un sistema de presión negativa.

Fuente: Lumb R, Shephard L, Bastian I, Fitz M., Global Laboratoy Initiative (GLI). Laboratory Safety.Geneva, Switzerland: 2019. P. 19.

Manejo de desechos

El principio fundamental del manejo de desechos es la reducción del riesgo de exposición del personal de laboratorio, el servicio o de la comunidad. El primer paso para el manejo efectivo de los desechos es adoptar un sistema para identificar y separar el material infeccioso y los recipientes que lo contienen (17).

Figura No. 4
Segregación de desechos



Fuente: Manual de bioseguridad en el laboratorio de Tuberculosis,Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, 2013.

Evaluación de riesgo

Consiste en evaluar minuciosamente aquello que puede ser nocivo para las personas en el lugar de trabajo; ello permite valorar si se han adoptado las suficientes precauciones o es preciso adoptar otras nuevas para prevenir daños. En ocasiones, la evaluación se basa en información incompleta o que no se conoce del todo. Según la OMS no existe un enfoque único para realizar una evaluación de riesgo, pero al momento de hacerlo en el laboratorio se debería considerar al menos (17).

Figura No. 5
Flujograma para la realización de evaluación de riesgos



Fuente: Lumb R, Shephard L, Bastian I, Fitz M., Global Laboratoy Initiative (GLI). Laboratory Safety.Geneva, Switzerland: 2019. P. 21.

5. Control de Infecciones de Tuberculosis

Como se ha mencionado previamente, debido a que la TB se transmite principalmente de persona a persona a través del aire, la mejor forma de evitar su transmisión dentro de los servicios de salud es a través de la implementación de medidas de control de infecciones. Las principales medidas de control de infecciones son la detección, el diagnóstico oportuno de casos de TB, su aislamiento y tratamiento inmediato. Existen tres medidas de control de infecciones de TB para los establecimientos, siendo estas:

- Controles administrativos y gerenciales
- Controles ambientales
- Protección respiratoria(21).

Controles administrativos y gerenciales

Las medidas de control administrativas y gerenciales son las más importantes para el control de infección de la TB y son prioritarias por sobre otras medidas para la prevención de la transmisión dentro del establecimiento de salud. Sin la implementación de estas las otras medidas no serán suficientes para proteger al personal de salud ni a los pacientes. Estas medidas son regulaciones de gestión que buscan reducir el riesgo de transmisión de la TB al disminuir la exposición del trabajador de salud y de los pacientes a través del diagnóstico temprano, aislamiento o separación inmediata de pacientes con sospecha de TB y la implementación inmediata de un tratamiento antituberculoso adecuado (21).

Controles ambientales

Las medidas de control ambiental son la segunda línea de defensa para prevenir la transmisión de M. tuberculosis al personal de salud y a los pacientes. Las medidas de control ambiental tienen por objetivo reducir la concentración de núcleos infecciosos y controlar el flujo y dirección del aire. Se basan en la ventilación natural o mecánica, la cual puede ser complementada con filtros (HEPA) y/o luz ultravioleta, aunque esta última no es indispensable (21).

Las medidas de control ambiental basadas en el mejoramiento de la ventilación natural requieren pocos recursos, ya que principalmente implica abrir puertas y ventanas para mejorar los RAH dentro del laboratorio (un mínimo de 6 a 12). La ventilación mecánica facilita el flujo de aire y busca dirigir el movimiento del aire de manera que los núcleos infecciosos sean más fácilmente eliminados. Los ventiladores de ventana son el método menos costoso y más factible para dirigir el flujo de aire (21).

Métodos adicionales de ventilación mecánica que requieren más recursos incluyen sistemas de extracción mecánica que bombean aire externo limpio hacia adentro del edificio y luego extraen el aire contaminado hacia afuera y/o el uso de sistemas de filtros HEPA. Estos métodos son eficaces pero costosos y requieren de mantenimiento constante (21).

Protección respiratoria.

Normalmente la OMS no considera necesario el uso de respiradores para el trabajo en un laboratorio de tuberculosis que realiza pruebas de bajo riesgo; sin embargo, ya que en el país no se han efectuado evaluaciones de riesgo sistematizadas, se recomienda su uso para todos los laboratorios. Si se utilizan respiradores N95 en un laboratorio, todo el personal debe ser capacitado en su uso correcto y las limitantes de este. En condiciones ideales, el personal debe pasar una prueba de ajuste para asegurar que no se producen fugas del respirador (17).

El uso de respiradores sin realizar la prueba de ajuste ofrece una protección de solo 67%, mucho menos que el nivel esperado. Usando la prueba de ajuste el nivel de protección sube a 96%, lo que se considera protección adecuada. El Anexo 10 muestra los materiales necesarios y el procedimiento para realizar la prueba de ajuste. Los respiradores no deben utilizarse en personas con vello facial o maquillajey una vez que se ha colocado el respirador, el usuario nunca deberá tocar su parte frontal. No se debe colocar debajo de la barbilla ni sobre la cabeza (21).

Para guardarse, debe evitar ser colgado de las correas, ya que esto puede aflojarlas y el respirador ya no se ajustará apropiadamente, debe elegirse un lugar práctico, limpio, seco e higiénico para guardarlo, idealmente adecuar un espacio para esto. Se recomienda leer el inserto del respirador para su uso correcto. Si se observa que el respirador no ajusta de manera correcta, el filtro se encuentra deteriorado o el tiempo de vida (recomendado por el fabricante) del respirador ha llegado a su límite, descarte en bolsa roja (21).

Figura No.6

Ejemplo de almacenamiento de respiradores N95.



Fuente: MSPAS, Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

Tabla No.7

Clasificación estadounidense de los respiradores según eficiencia del filtrado

Categoría del filtro*	Eficiencia del filtro		
N	94 - 95%	99%	99.97%
P	94 - 95%	99%	99.97%
R	94 - 95%	99%	99.97%

Fuente: Instituto de Salud Pública de Chile, Guía para la selección y control de equipos de protección respiratoria, 2018 v.2 P.23.

* **N**: no resistente al aceite

P: parcialmente resistente al aceite

R: resistente al aceite

Tabla No.8

Clasificación europea de los respiradores según eficiencia del filtrado

Categoría del filtro	Eficiencia del filtro
FFP1	≈80%
FFP2	≈94-95%
FFP3	≈99%

Fuente: Instituto de Salud Pública de Chile, Guía para la selección y control de equipos de protección respiratoria, 2018 v.2 P. 24.

Figura No.7
Procedimiento para colocarse y retirarse el respirador N95



Fuente: MSPAS, Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

6. Uso de desinfectantes

La acción microbicida de los desinfectantes dependerá del tipo de microorganismos que queramos erradicar. Los desinfectantes registrados cuyo uso se recomienda en los laboratorios de Tuberculosis son los que contienen fenoles, cloro o alcohol (17).

Tabla No.9

Uso de desinfectantes

Desinfectante	Preparación	Tiempo de vida media	Precauciones
Fenol 5%	**Cristales de fenol ...5 g** **Agua destilada ...100 ml** **(puede ser preciso calentar suavemente el agua)**	15 días	Irritante ante la inhalación y la exposición en piel, cancerígeno. Se recomienda el uso de los derivados de fenol en lugar de fenol puro. En el laboratorio de tuberculosis las soluciones de fenol se utilizan para manejo de derrames (17)
Cloro 0.5%	**Hipoclorito comercial** **(5%) ..... 25 ml** **Agua destilada.... 475 ml**	24 horas solución diluída	Provoca irritación en la piel y lesiones oculares. Se recomienda que al momento de utilizarse sobre una superficie de metal (CBS), posteriormente sea removido con alcohol al 70% para evitar corrosión sobre el metal.
Alcohol 70%	**Venta comercial**	Indefinido evitando evaporación	Irritación ante inhalación prolongada, inflamable. El uso del alcohol etílico al 70% está recomendado como parte de la limpieza de rutina en las superficies de trabajo del laboratorio y las CSB.

Kit de derrames

El derrame de sustancias potencialmente infecciosas puede ocurrir dentro de la rutina del laboratorio, almacenaje o transporte de muestras.Cuando esto ocurre es importante manejar de manera apropiada el incidente, debido a que podemos no hacer una limpieza adecuada y correr el riesgo de contraer una infección. Todo laboratorio y mensajero que transporta muestras debe contar con un kit de derrames, el cual debe incluir:

- Material absorbente
- Desinfectante
- Guantes
- Lentes de protección
- Respirador N95 en buenas condiciones
- Cartel de precaución
- Recogedor
- Bolsa para residuos biológicos (19)

Procedimiento para la limpieza de un derrame

- Utilizar el equipo de protección personal al momento de realizar el procedimiento
- Colocar un cartel que prevenga a terceros de ingresar al laboratorio
- Cubrir de manera completa el derrame con papel absorbente (papel toalla)
- Cubrir con desinfectante el papel absorbente de afuera hacia adentro, dejar actuar 30 a 60 minutos antes de remover el derrame
- Abandonar el laboratorio y esperar hasta que el desinfectante actué y los aerosoles sean eliminados por el sistema de ventilación
- Descarte el material en bolsa roja
- Desinfectar pisos o superficies afectados(19).

Figura No. 8

Kit de derrames



Fuente: MSPAS, Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

7. Salud y seguridad ocupacional

Los trabajadores de salud son considerados grupos de alto riesgo para la infección porM. tuberculosis y el posterior desarrollo de enfermedad. La implementación de un sistema de vigilancia permitirá la detección y tratamiento oportunos de los casos TB en este grupo de riesgo para mejorar así el control de infecciones de TB dentro de los establecimientos de salud (18).

La vigilancia de tuberculosis en trabajadores de salud debe incluir 3 factores, los cuales se describen a continuación:

Tabla No.10

Factores que incluir en la vigilancia de TB en trabajadores de salud.

Manifestaciones clínicas (signos y síntomas) Anual	•Búsqueda de hallazgos compatibles con TB (tos, fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, u otros). El tamizaje basado en manifestaciones clínicas tiene baja sensibilidad, especialmente para detectar tuberculosis tempranamente.
Radiografia de tórax* Cada 2 años y en todo trabajador de nuevo ingreso	• Metodología con una sensibilidad enfocada a TB pulmonar alta (87– 98%); pero, cuya especificidad puede ser muy baja (46 – 89%). Esto fundamenta su uso para fines de tamizaje; pero no así para fines diagnósticos, a menos que se utilice con otras metodologías complementarias.
Proteína Purificada Derivada (PPD) o Ensayo de Liberación de Interferon Gamma (IGRA) Anual	•Proteína Purificada Derivada (PPD) o Ensayo de Liberación de Interferon Gamma (IGRA). Destacando que estas pruebas sólo determinan la exposición de la persona a *M. tuberculosis*.

Fuente: Protocolo Microbiología Bykowski & Stevenson, 2008.

* Debido al potencial riesgo de la radiografía sobre el embrión, se debe tomar precauciones en toda mujer en edad fértil y sexualmente activa debido a la posibilidad de un embarazo.

Las personas con hallazgos compatibles con TB deben someterse a pruebas diagnósticas para descartar o confirmar dicha patología (Xpert MTB/RIF®, cultivo, microscopía). Además de la vigilancia de TB, se recomienda complementar con otras pruebas:

- Química sanguínea (glucosa, creatinina, nitrógeno de urea), realizar al menos anualmente
- Otras enfermedades infecciosas (VIH, Hepatitis B, Hepatitis C), realizar al menos anualmente (18).

CAPITULO

3

TOMA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

1. Muestras de esputo

Una buena muestra de esputo es la que proviene del árbol bronquial (expectoración mucopurulenta), obtenida en cantidad suficiente (3-5 ml), colocada en un envase adecuado, identificada, conservada y transportada correctamente al laboratorio. Es importante mencionar que muestras diferentes al esputo pueden ser procesadas por BK, pero deben ser referidas para la realización de otros métodos diagnósticos más sensibles, como el cultivo y el Xpert MTB/RIF®(22).

El envase debe cumplir con las siguientes especificaciones:

- Boca ancha, de no menos de 50 mm de diámetro.
- Capacidad entre 30 y 50 ml.
- Cierre hermético, con tapa de rosca para evitar derrames.
- Material plástico transparente, resistente a roturas (no utilizar frascos de vidrio) (22).

Figura No.9
Ejemplo de frasco recomendado para muestras de esputo



Fuente: MSPAS, Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

Para recolectar la muestra de esputo, el personal de salud de la unidad debe realizar los siguientes pasos, que aparecen a continuación:

Tabla No. 11

Consideraciones para la toma de muestra de esputo

Pasos	Explicación
Etiquete	El nombre completo y legible del paciente en las paredes del envase (no en la tapa).
Verifique	Que cada paciente o muestra referida tenga un registro adecuado en el formato de solicitud de baciloscopía (Anexo 4).
Recolecte	De forma clara y sencilla indique al paciente: • Que debe cubrirse la boca con un pañuelo, papel o con el antebrazo cuando tiene tos. • Recoger las muestras en un lugar bien ventilado y donde el paciente esté solo y cómodo, de preferencia afuera, para que los aerosoles puedan dispersarse. • Que demore el tiempo necesario para la obtención de una buena muestra. • La importancia de una buena muestra de esputo. • El lavado de manos después de este procedimiento.
Verifique y explique	Cuando el paciente regrese con la muestra de esputo: • Asegúrese que la cantidad de muestra sea suficiente (3 a 5 ml) y que sea la adecuada. • Explique al paciente que debe recolectar al menos 2 muestras, preferentemente la primera al momento de la consulta y la segunda en la mañana siguiente. Si el paciente tiene dificultades de regresar el siguiente día, se puede tomar la segunda muestra el mismo día, con 2 horas de diferencia.
Muestras inadecuadas	Este tipo de muestras reducen la posibilidad de detectar BAAR, e incluyen: • Saliva • Moco • Muestras sanguinolentas • Muestras con tierra o restos de alimentos Toda muestra inadecuada deberá ser aceptadapor el laboratorio y registrarse en el libro de laboratorio de TB. Explicar al paciente como debe ser una buena muestra y evaluar el porcentaje de muestras inadecuadas con el encargado del PTB para acciones correctivas.
Criterios de rechazo de muestras	Todo rechazo de muestras deberá ser documentado en el formato de rechazo de muestras (Anexo 8) y de preferencia tomar fotos que demuestren el motivo del rechazo. Sin identificación o identificación errónea Derrames de volúmenes grandes que contaminen otras muestras o aumente el riesgo de trasmisión de TB Recipiente inadecuado (contaminado, vidrio, etc.) Frascos vacíos o con volumen insuficiente para realización de la prueba. Tiempo > de 7 días

Fuente: Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis, MSPAS, Guatemala, 2018.

2. Muestras Extrapulmonares

La toma y manejo de muestras de TBEP se describe a continuación; en la tabla número 12

Tabla No.12

Condiciones para el manejo de muestras para cultivo

Tipo de muestra	Recipiente	Cantidad de muestras y Volumen	Tiempo desde la toma hasta el cultivo	Manejo de muestras	Observaciones
Investigación de TB pulmonar					
Esputo	De plástico nuevo, transparente, de boca ancha (50 mm de diámetro), volumen entre 30-50 ml, cierre hermético.	1 muestra, 3-5 ml.	Lo más pronto posible, no más de 72 horas.	Mantener de 2-8˚C	Muestra más común para investigación de TB pulmonar.
Lavado Gástrico	Mismo que para esputo.	3 muestras, 10-15 ml.	No más de 4 horas. 24 horas si se neutraliza con 1 mg de bicarbonato de sodio.	Mantener de 2-8˚C	Para investigar TB pulmonar en niños y personas que no pueden expectorar. No usar para control de tratamiento. El paciente debe estar en ayuno.
Lavado bronquial	Mismo que para esputo.	1 muestra, 3-5 ml.	Lo más pronto posible, no más de 72 horas.	Mantener de 2-8˚C	Antes de tomar la muestra, realizar baciloscopías de dos muestras espontáneasde esputo para intentar evitar procedimientos invasivos.

Investigación de TB extrapulmonar

Orina	Recipiente de 100 ml, estéril y de boca ancha para posibilitar la recolección directa.	3-6 muestras (una por día), 50 ml como mínimo.	Inmediatamente si se centrifuga a 3000g y se envía el sedimento neutralizado con 1 mg de bicarbonato de sodio, 12 horas.	Mantener de 2-8˚C	Previa higieneexterna con agua, el paciente debe recoger el segundo chorro de la primera micción de la mañana.
LCR	Estéril, tapa de rosca, cierre hermético, volumen entre 10-15 ml.	Las que el médico considere. Se recomienda al menos 1 ml.	Lo más pronto posible, máximo 12 horas.	Mantener de 2-8˚C	Debe ser tomada por personal médico. No usar ningún aditivo.
Líquidos (pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros)	Estéril, de cierre hermético, adecuado según el volumen de muestra recolectada.	Las que el médico considere. Se recomienda al menos 1 ml.	Lo más pronto posible, máximo 12 horas.	Mantener de 2-8˚C	Debe ser tomada por personal médico. Se puede agregar 3 gotas de EDTA o citrato de sodio al 10% por cada 10 ml de muestra.
Biopsias	Estéril, adecuado para el volumen de muestra recolectada.	Lo que el médico considere.	Lo más pronto posible, máximo 12 horas.		Debe ser tomada por personal médico. Embeber en 1 o 2 ml de agua destilada estéril o solución fisiológica estéril. **No agregar formol.**
Pus	Estéril, de preferencia no usar hisopos. Si se utilizan estos, humedecerlos con solución fisiológica estéril.	La mayor cantidad posible.	Lo más pronto posible, máximo 12 horas.	Mantener de 2 – 8˚C	
Sangre	Recipiente para hemocultivo de micobacterias.	De acuerdo con el volumen de muestra según el recipiente de hemocultivo.	Lo más pronto posible. Si no puede ser enviada inmediatamente, colocar en BHI.	Incubar a 37˚C hasta su envío.	Reservada para pacientes con inmunosupresión severa. Se puede recolectar en tubos con heparina o EDTA.

Fuente: Sequeira M, Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis,Organización Panamericana de la Salud, Washinton, 2008.

3. Transporte de muestras

Como se ha mencionado con anterioridad, la recolección y transporte de la muestra es esencial para obtener resultados precisos y confiables. Se recomienda que cada unidad de salud delegue claramente al responsable que coordine la recepción, transporte y envío de las muestras (24,25).

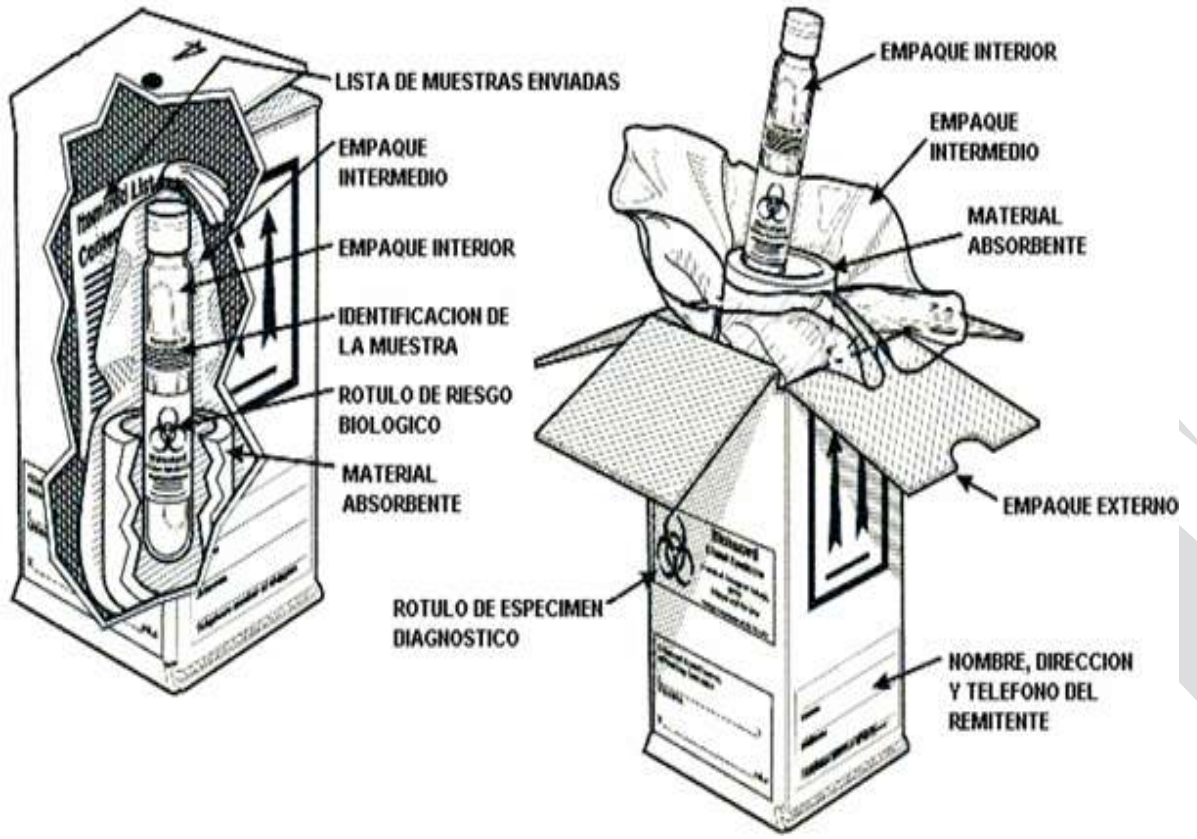
Tabla No.13

Funciones del personal para el transporte de muestras

Personal	Funciones
Remitente (quien envía la muestra)	• Colocar enlas paredes del recipiente (nunca en la tapa) con tinta indeleble y letra legible los nombres y apellidos. • Llenar la ficha de envío de muestra (Anexo 5) con letra legible. Asegurarse de entregarla al que transportará la muestra. • Asegurarse que los frascos tengan su tapón bien ajustado. No enviar muestras en tubos con tapones de algodón (se pierde muestra por absorción) o sin tapón envueltos en papel parafilm. • Sellar las tapas de los frascos, tubos o viales con papel parafilm. • Los recipientes con muestras deben ser enviadas adentro de otro mayor como una hielera o caja de metal (tomar en cuenta la cadena de frío). En caso de las muestras enviadas en cadena de frío en hieleras, deben utilizarse refrigerantes (baterías) para asegurar la integridad de la muestra. • Verificar la concordancia de los datos de la ficha y datos en la muestra. • Introducir los frascos, tubos o viales en bolsitas plásticas limpias. • Colocarlos en una gradilla u otro recipiente de forma vertical • Una vez colocados dentro de este recipiente, colocar la gradilla/ recipiente en posición vertical dentro de una hielera sobre papel absorbente. • Introducir los paquetes fríos o baterías congeladas para mantener la temperatura de 2 a 8°C. • Cerrar la hielera manteniéndola en posición vertical para evitar algún derrame.
Destinatario (quien recibe la muestra)	• Recibir las muestras. • Verificar que cumpla con las condiciones y requisitos de envío. • Verificar que la boleta de envío de muestra esté completamente llena. • Asignar el código de laboratorio correspondiente. • Dar aviso e ingresar la muestra al laboratorio para su análisis
Transportador (Piloto o mensajero)	• Verificar la concordancia del número de muestras y fichas que le entregan. • Guardar la documentación correspondiente. • Transportar la hielera con especial cuidado de no voltearla. • Asegurarse que el vehículo del transporte cuente con un kit de derrames.

Fuente:MSPAS, Manual de normas y procedimientos para la toma de muestras y su envío al Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2015

Figura No.10
Ejemplo de triple embalaje utilizando sistemas comerciales



Fuente:MSPAS, Manual de normas y procedimientos para la toma de muestras y su envío al Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2015.

Figura No.11

Ejemplo de triple embalaje utilizando materiales presentes en el laboratorio



Fuente: MSPAS, Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

Preservantes comerciales

En el mercado existen reactivos comerciales para licuar y descontaminar la muestra, permitiendo su transporte sin cadena de frío y manteniendo las muestras viables a temperaturas tan altas como 40 ˚C por 8 días, además de reducir la contaminación y aumentar el diagnostico cuando las muestras son cultivadas. Las muestras transportadas pueden usarse para microscopía, cultivo o prueba de ácido nucleicos (26).

CAPITULO

4

MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS.

Métodos para el diagnóstico de TB avalados actualmente por la OMS y recomendados por el PTBy LNS para su uso en el país.

Por muchos años el principal método para el diagnóstico de TB fue la baciloscopía. A pesar de las ventajas de este método, existen limitantes importantes respecto a la sensibilidad y sobre todo que no detecta TB-DR. Desde el año 2007, una gran variedad de métodos de laboratorio han sido desarrollados y comercializados, sin embargo, no todos cumplen con los estándares necesarios para ser recomendados por la OMS y ser implementados en el país (27).

Tabla No.14

Métodos avalados por la OMS, PTB y LNSpara el diagnóstico de TB en Guatemala

Prueba o Procedimiento	Descripción	Tiempo de respuesta	Comentarios
Microscopía	Microscopio convencional con tinción de Ziehl-Neelsen	48 horas	Menos sensible que fluorescencia.
	Microscopio de fluorescencia convencional		Requiere cuarto oscuro y equipo de alto costo.
	Microscopio de fluorescencia LED		Aproximadamente 10% más sensible que microscopía convencional y reduce el tiempo de observación. No requiere cuarto oscuro y existen kits para convertir microscopios convencionales en fluorescencia LED.
Cultivo en medio sólido	Cultivo en Löwenstein-Jensen (LJ)	3-5 semanas para resultados positivos. 8 semanas para resultados negativos	Medios a base de huevo. Niveles de contaminación aceptables entre 3-5%.
	Cultivo en Middlebrook 7H10 o 7H11		Medios a base de agar. Niveles de contaminación aceptables entre 3-5%.
Cultivo en medio líquido	Sistemas comerciales y no comerciales	8 – 14 días para resultados positivos. 6 semanas para resultados negativos	Más susceptibles a la contaminación. Niveles de contaminación aceptables entre 8 – 10% Ejemplos de sistemas comerciales: BACTEC MGIT 960 TB System (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA).

Pruebas rápidas para identificación de especies	Sistemas comerciales para identificar especies a partir de cultivos positivos (sólidos o líquidos)	15 minutos (Tiempo por 1 prueba)	Reservados para los laboratorios que realizan cultivos. Ejemplos de marcas: Capilia TB-Neo® (TaunsLaboratories, Numazu, Japan) TB Ag MPT64 Rapid Test© (SD Bioline, Kyonggi-do, South Korea) TBcID© (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA)
Pruebas Moleculares	Xpert MTB/RIF® Xpert MTB/RIF® Ultra	2 horas (tiempo por 1 prueba, no incluye tiempo pre y post analítico)	Diseñado para ser usado en todos los niveles de laboratorios (ver tabla 2, capitulo 1). Requiere de fuente de energía ininterrumpida y ambientes con temperatura controlada. Nivel de errores aceptable < 3%. Detecta la presencia de Complejo M. tuberculosis y su resistencia a la rifampicina en el mismo ensayo

Fuente: Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis World Health Organization, 2014.

2. Baciloscopía

Principio

La baciloscopía consiste en el uso de tinciones diferenciales que permiten observar por medio de un microscopio el bacilo alcohol-ácido resistente (BAAR). Para que el laboratorio pueda obtener un resultado confiable, no sólo es preciso que ejecute las técnicas en forma correcta, sino que reciba una buena muestra, actualmente se recomienda que las muestras inadecuadas (salivas, sanguinolentas, con restos alimenticios, etc.) no superen el 25% de las muestras pulmonares de diagnóstico que llegan al servicio (24).

Nivel de bioseguridad

Como se ha mencionado con anterioridad, la BK es un método de bajo riesgo, sin embargo, deben evitarse ciertas situaciones que pueden aumentar el riesgo de genwidado en la manipulación de muestras, lo que puede generar aerosoles.

- Agitación enérgica de las muestras.
- Insuficiente ventilación o iluminación (17).

Manejo de muestras

Una buena muestra de esputo es la que proviene del árbol bronquial (expectoración mucopurulenta), obtenida en cantidad suficiente (3-5 mL), colocada en un envase adecuado, identificada, conservada y transportada correctamente al laboratorio (22). Verificar capítulo 3 toma, conservación y transporte de muestras.

Ventajas y desventajas

La baciloscopía es una técnica sencilla que necesita recursos mínimos para su realización, por lo que este método continúa siendo la piedra angular del diagnóstico de la TB en entornos con recursos limitados, dentro de las principales ventajas de la técnica se encuentran:

- Capacidad de diagnosticar casos con alta contagiosidad (alta carga bacilar).
- Utilidad como seguimiento terapéutico.
- Técnica sencilla y económica(24).

Sin embargo, la sensibilidad analítica de este método comparado con otros es bajo (5,000 a 10,000 bacilos/ml de esputo y disminuye en pacientes con baja carga bacilar (pacientes VIH, niños, algunos casos MDR) (24).

Realización del extendido

Independientemente del método de tinción a realizar, el primer paso es realizar el extendido de la muestra en una lámina portaobjetos. En la tablanúmero 15se resume los pasos a seguir para la realización del extendido para su posterior tinción y lectura microscópica.

Tabla No. 15

Pasos para la realización de baciloscopía

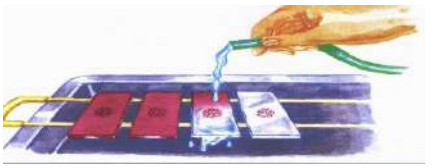
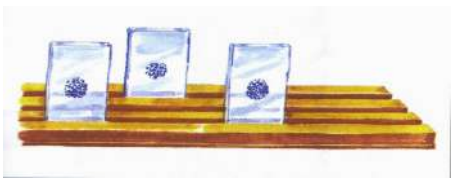
Pasos	Explicación
1. **Recibir**	Todas las muestras en cualquier hora de la jornada laboral.
2. **Registrar**	Registrar en el libro de laboratorio de Tuberculosis previo a la verificación de la boleta con la muestra e identificar el recipiente con el número correlativo de BK.
3. **Rotular**	Tomar los portaobjetos necesarios y en una tercera parte colocar la identificación y dejar las dos terceras partes para realizar el extendido. En el área de rotulación anotar el número correlativo de lámina, colocar cada portaobjeto frente al recipiente respectivo.
4. **Realizar frote y teñir**	Con un aplicador de madera con el extremo quebrado escoger una pequeña porción de la parte más densa y purulenta de la muestra. Colocar esta partícula sobre la lámina; hacer un extendido fino y circular, de aproximadamente 1 a 2 cm de diámetro, evitando llegar al borde. Dejar secar a temperatura ambiente, fijar con llama y teñir el extendido (ver figura 12Tinción método ZN).
5. **Observar**	Sistemáticamente cien (100) campos microscópicos útiles en búsqueda de BAAR. Si los BAAR están presentes, contarlos y la cantidad será clasificada de acuerdo con la escalaque se muestra en la tabla número13. Si no se encuentra ningún BAAR, es recomendado observar todos los campos útiles del extendido.
6. **Registrar**	Los resultados de diagnóstico en el libro de laboratorio de TB con número de cruces, usando una sola línea por SR. Las baciloscopías de control de tratamiento se registran en una nueva línea según fecha de ingreso (Anexo 1). Estos mismos datos deben consolidarse para llenar el informe mensual de laboratorios (Anexo 6).
7. **Reportar**	El resultado de la baciloscopía dentro de las 48 horas siguientes a la recepción de la muestra.

Fuente:Sequeira M, Malbran C. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis Organización Panamericana de la Salud, 2008.

2a. Método de Ziehl-Neelsen

Consiste en la coloración del bacilo utilizando la fucsina, el colorante tiene la capacidad de interactuar con los ácidos grasos (micólicos) de la pared celular de la micobacteria, la cual es resistente a la acción del alcohol-ácido que se utiliza posteriormente para decolorar las células que no son teñidas debido a que su pared no es lo suficientemente afín al colorante. Su valor de sensibilidad (20-80%) tiene rangos muy amplios, por lo cual este método no es el recomendado para pacientes con baja carga bacilar y muestras extra pulmonares (28).

Figura No. 12
Tinción de ZiehlNeelsen.

Pasos para la tinción	
	Cubrir con fucsina fenicada
	Calentar hasta emisión de vapores 3 vecesdurante 5 minutos
	Lavar con agua y eliminar el excedente
	Cubrir con alcohol-ácido durante 3 minutos
	Lavar con agua y eliminar el excedente
	Cubrir con azul de metileno durante 1 minuto
	Lavar con agua y eliminar el excedente
	Limpiar la parte de atrás del frote y secar al aire

Fuente: Sequeira M, Malbran C,Manual para el diangóstico bacteriológico de la tuberculosis Organización Panamericana de la Salud, 2008.

Interpretación de resultados

Los resultados se reportaran de forma semi-cuantitativa, utilizando los criterios de reporte de la OPS, mismos que se describen en la tabla 16 (24).

Tabla No.16

Clasificación de los resultados para baciloscopía de ZiehlNeelsen

Resultado	Explicación	Número de campos útiles a examinar
Negativo	No se observan BAAR en toda la lámina.	Toda la lámina
Positivo **1 a 9 BAAR**	Informar el número de bacilos exactos.	100 campos
Positivo (+)	Menos de un bacilo por campo en promedio.	100 campos
Positivo (++)	De 1 a 10 bacilos por campo en promedio.	50 campos
Positivo (+++)	Más de 10 bacilos en promedio.	20 campos

Fuente: 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" Organización Panamericana de la Salud, 2018.

Una herramienta útil para asegurar la lectura de los 100 campos, es utilizar la cuadríca la de lectura que fue publicada en la versión anterior de este manual (22).

Figura No.13
Ejemplo de cuadrícula de lectura de resultados

0	0	0	1	0	1	0	0	0	3
2	0	1	1	1	0	0	0	2	1
1	0	0	2	3	0	3	2	0	0
1	1	1	2	3	3	0	0	0	0
0	0	1	2	0	2	1	2	1	0
1	1	1	2	2	3	3	1	3	1
0	0	0	0	0	0	1	2	1	0
1	2	1	3	1	3	2	0	0	0
1	0	2	0	0	0	1	2	0	0
1	2	1	2	1	0	0	1	2	3

Fuente: 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" Organización Panamericana de la Salud, 2018.

Número de bacilos: 98
Número de campos observados: 100
Promedio de bacilos / campo: 98/100 = 0.98
Resultado: (+)

2b. Método de Fluorescencia

La baciloscopía por el método de fluorescencia es más sensible (10%) que la baciloscopía convencional por método de Ziehl-Neelsen, además tiene la ventaja que la observación de las láminas demora menos tiempo ya que la lectura se realiza en los objetivos de 40x o 20x. La coloración consiste en utilizar la afinidad de la auramina-O con la pared celular de la micobacteria, la cual es resistente a la acción del alcohol-ácido que se utiliza posteriormente para decolorar las células que no fueron teñidas por la auramina-O, un fluorocromo que permite la visualización de la bacteria en un amarillo brillante (28).

Esta técnica requiere de un microscopio de fluorescencia o un adaptador de fluorescencia LED. La OMS recomienda que la microscopía de fluorescencia LED sustituya a la baciloscopía convencional a través de un cambio paulatino por medio de un plan de implementación, especialmente en aquellos laboratorios con alta carga de baciloscopías(28).

Interpretación de resultados

Al igual que el método del ZiehlNeelsen, los resultados se reportan de forma semi-cuantitativa, según los criterios de la tabla numero 17(29).

Tabla No.17

Clasificación de los resultados para Baciloscopía de fluorescencia, método deAuramina-O

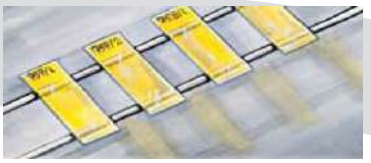
Resultado	Lectura con objetivo 20x	Lectura con objetivo 40x
Negativo	No se observan BAAR en una línea*	No se observan BAAR en una línea*
Requiere confirmación**	1 a 4 BAAR en una línea	1 a 2 BAAR en una línea
Contable	5 a 49 BAAR en una línea	3 a 24 BAAR en una línea
Positivo (+)	3 a 24 BAAR en un campo	1 a 6 BAAR en un campo
Positivo (++)	25 a 250 BAAR en un campo	7 a 60 BAAR en un campo
Positivo (+++)	Más de 250 BAAR en un campo	Más de 60 BAAR en un campo

Fuente: Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis Policy statement World Health Organization, 2011.

*Una línea es considerada como 20 campos

** Se requiere confirmación con una nueva lectura de la lámina por otro personal o realizar un nuevo extendido, tinción y lectura.

Figura No.14
Tinción fluorescente

Tinción de Auramina- O	
	Cubrir las láminas con auramina-O filtrada
	Dejar actuar al colorante por lo menos 20 minutos (no calentar)
	Lavar con agua (evite salpicaduras)
	Cubrir con alcohol-ácido durante 1 o 2 minutos
	Lavar con agua (evite salpicaduras)
	Cubrir con azul de metileno durante 1 minuto o permanganato de potasio por 2 minutos (este último requiere una monitorización cuidadosa del tiempo de contacto)
	Lavar con agua (evite salpicaduras)
	Limpiar la parte de atrás del frote y secar al aire

Fuente: Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis Policy statement World Health Organization, 2011.

3. Cultivo de Micobacterias

El cultivo produce resultados tardíamente, pero es más sensible que la baciloscopía, pudiendo evidenciar un mínimo de 10 a 100 bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) presentes en una muestra (30). Las micobacterias pueden ser cultivadas en diferentes medios específicos, líquidos y sólidos. A pesar de la gran variedad de medios que existen actualmente, todos tiene en común la incorporación de nutrientes específicos para el crecimiento de micobacterias, uno o más reactivos que inhiben el crecimiento del resto de microbiota y que también permiten el crecimiento de otras micobacterias, razón por la que atodo cultivo positivo se le deberá realizar una prueba para identificación de especie(15). El cultivo no solo tiene utilidad en el diagnóstico de TB, sino también es importante en el control del tratamiento (ver capítulo 4).

3a. Cultivo en medio sólido

Los medios de cultivo sólidos pueden ser a base de huevo como el LJ, Ogawa o Stonebrink; o a base de agar, como los medios Middlebrook 7H11 y 7H9 (27). En la red de laboratorios de Guatemala, el medio LJ es el más utilizado por lo que, en este manual a menos que se indique lo contrario, siempre que se mencione cultivo en medio sólido se referirá al cultivo en LJ(30).

Principio:

El cultivo en medio sólido incluye la descontaminación de la muestra a través del uso de sustancias químicas con el propósito de eliminar lamicrobiotaacompañante y favorecer el crecimiento de la micobacteria, que por lo general crecerá más lentamente.Los medios de cultivo a base de huevo incorporan sales de fosfato para mantener el pH lo más cercano a 7, fuentes de carbono como el glicerol y moléculas como albúmina, indispensable para el desarrollo del bacilo. Las condiciones de incubación son temperaturas de 36 – 37°C y ambientes con concentraciones altas de oxígeno (30). Tiene un tiempo de respuesta de 3 semanas (cultivos positivos) a 8 semanas (cultivos negativos).

Nivel de bioseguridad:

Como se discutió en el capítulo 2, el cultivo de micobacterias se clasifica como actividad de riesgo moderado, por lo que se deben de seguir las recomendaciones descritas en la tabla numero 3 (17).

Manejo de muestras:

La muestra más usada para el cultivo de micobacterias es el esputo, debido a que la forma más común de enfermedad es la pulmonar. No obstante, la TB puede afectar prácticamente cualquier órgano, por lo que el uso de otras muestras diferentes al esputo es muy frecuente (para verificar las condiciones de toma y envío de muestras ver capítulo 3, Tabla número 11. Condiciones para el manejo de muestras para cultivo (24).

En términos generales, cuando se procesan muestras para cultivo hay que tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. Procesar las muestras con la menor demora posible
2. Preservar las muestras en cadena de frío durante su almacenamiento y transporte
3. Si la muestra no puede ser almacenada en refrigeración desde su toma hasta su procesamiento, se puede agregar soluciones como el cloruro de cetilpiridinio, trifosfato de sodio o preservantes comerciales, para preservar la muestra
4. Nunca agregar a las muestras fenol, formol o solución de formaldehido, ya que estas son sustancias micobactericidas(30).

Ventajas y desventajas

El cultivo de micobacterias es el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad. Entre sus principales ventajas se encuentran:

- Tiene mayor sensibilidad que la baciloscopía, pudiendo detectar micobacterias en una concentración de 10 a 100 bacilos en una muestra.
- Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar, comparado con la baciloscopía.
- Permite diferenciar entre bacilos vivos y muertos.
- Permite la realización de otras pruebas de seguimiento, tales como las pruebas de sensibilidad a drogas, identificación de especies y métodos útiles en epidemiología (30).

A pesar de sus ventajas, también tiene algunas limitantes, entre las que se destacan:

- Tiempo prolongado de respuesta: entre 3 y 8 semanas.
- Es mucho más complejo y costoso que la baciloscopía.
- Es susceptible a la contaminación por microbiota acompañante.
- A pesar de que su sensibilidad es mayor que labaciloscopía, esta no es del 100%, por lo que es posible obtener un resultado negativo aun cuando la tuberculosis esté presente (30).

Procedimiento

Existen diversas metodologías para realizar el cultivo de micobacterias. A continuación, se hace una descripción del método de Petroff modificado utilizado por el LNS(30,31).

Preparación de Material

1. Antes de ingresar al área, colocarse bata, guantes, respirador N95 y cofia.
2. Realizar la limpieza diaria de la cabina de bioseguridad.
3. Rotular un tubo cónico de cierre hermético (de 15 o 50 ml) para cada muestra y uno para el control (agua desmineralizada), una lámina portaobjetos y dos tubos con medio LJ.
4. Ingresar el siguiente material a la cabina de bioseguridad: papel toalla, tubos cónicos estériles con tapón de rosca, láminas portaobjetos rotulados, pipetas Pasteur, palillos de madera, recipiente para descarte líquido, bolsa roja, NaOH al 4%, PBS o agua destilada estéril y las muestras.

Decontaminación

1. Abrir el tubo cónico de 15 m rotulado, colocar máximo 3 ml de muestra.
2. Colocar la misma cantidad de NaOH al 4% a cada tubo con muestra, (proporción 1:1).
3. Cerrar el tubo cónico de 15 ml.
4. El tiempo de exposición con el NaOH al 4% no debe sobrepasar los 30 minutos, incluyendo el proceso de centrifugación, iniciando el conteo al entrar en contacto el NaOH con la primera muestra.

Homogenización

1. Limpiar el exterior del tubo cónico con papel toalla y alcohol al 70%, eliminando fuentes de contaminación (evitando borrar la identificación).
2. Agitar la muestra en vórtex como mínimo 1 minuto, hasta lograr la homogenización completa, dejando actuar de 10-12 minutos con el NaOH.
3. Si no se lograra la homogenización, incubar a 37 ˚C durante unos minutos, sin sobrepasar el tiempo de exposición al NaOH al 4% (30 minutos).
4. Dentro de la cabina, colocar los tubos en los contenedores herméticos de la centrífuga.
5. Centrifugar durante 15 minutos a 3000 gravedades.
   Nota: tomar en cuenta que las gravedades o fuerza relativa de centrífuga, dependen de la velocidad (RPM) y el diámetro de la centrífuga.
6. Reposar durante 3 minutos dentro de la centrífuga, evitando la exposición de aerosoles.
7. Ingresar los contenedores herméticos a la cabina y sacar los tubos, abrir cada tubo y descartar sobrenadante cuidadosamente dentro del recipiente de descarte.

Neutralización

1. Agregar al sedimento PBS o agua destilada estéril hasta alcanzar el aforo de 12 ml.
2. Agitar la muestra en un vórtex con un tiempo mínimo de 30 segundos hasta homogenizar completamente.
3. Centrifugar durante 15 minutos a 3000 g.
4. Reposar durante 3 a 5 minutos dentro de la centrífuga para evitar la exposición de aerosoles.
5. Ingresar los contenedores herméticos con los tubos cónicos a la cabina de bioseguridad, abrir de uno en uno y descartar sobrenadante cuidadosamente dentro del recipiente de descarte, dejando aproximadamente 2 ml.

Inoculación e Incubación de medios

1. Ingresar a la cabina de bioseguridad la gradilla con los medios de cultivo necesarios (2 LJ por muestra) previamente rotulados con el número correspondiente de la muestra y fecha de inoculación.
2. Abrir los tubos con medio,si existe agua de condensación descartar la misma sobre una toalla de papel absorbente.
3. Agitar el sedimento descontaminado en un vórtex hasta homogenizar.
4. Con una pipeta Pasteur estéril, tomar una alícuota del producto neutralizado y agregar entre 0.2 a 0.5 mL (4-10 gotas) a cada uno de los tubos con medio. Por último, agregar una gota a la lámina portaobjetos correspondiente y realizar el extendido.
5. Distribuir la muestra en toda la superficie del medio (el pico de flauta), rotando el tubo de lado a lado en un ángulo de 45° sobre su eje horizontal, sin llegar a tocar la tapa del tubo.
6. Tapar los medios de cultivo girando el tapón hasta el primer tope, sin apretar.
7. Colocar los tubos en la gradilla de forma inclinada, con el pico de flauta hacia arriba.
8. Colocar los tubos dentro de la incubadora a 37 °C hasta su lectura.

Lectura

1. Después de 48 horas revisar los tubos, si se ha evaporado el líquido ajustar la tapa a tope (no enroscar con fuerza). En caso de observar contaminación en alguno de los tubos inoculados, descartar el mismo y anotar en la hoja de registro de lectura.
2, Revisar los tubos por lo menos a los 7, 15, 30 y 60 días después de la inoculación.
3. Anotar el resultado en la hoja de registro de lectura de cultivo.

Interpretación de resultados

1. Reportar Negativo si no se observa crecimiento después de 8 semanas (60 días) de incubación.
2. Si se observa crecimiento, con colonias típicas de M. tuberculosis (colonias secas, rugosas, de color beige o crema), reportar Positivo, cuantificando el crecimiento según tabla número 17.
3. Reportar Contaminado si se observa contaminación (colonias no características) o acidificación en el 100% de los tubos (viraje de color a verde oscuro), se deberá solicitar el envío de una nueva muestra.

Cultivo de muestras extrapulmonares

Se debe efectuar un frote del sedimento como orientación para el médico; en el caso de los líquidos, colorear 24 horas después para permitir el secado del material, baciloscopías positivas no son diagnóstico, especialmente si provienen de muestras de cavidades anatómicas.

Cultivo de muestras líquidas estériles: médula ósea, LCR, líquido pleural, líquido peritoneal o de articulaciones

1. Preparar material según se describe en la sección “preparación de material”.
2. Agregar el líquido a un tubo cónico estéril y centrifugar la muestra en su totalidad por 15 minutos a 3000 gravedades, descartar el sobrenadante.
3. Dividir el sedimento en dos alícuotas.
4. Tomar una de las alícuotas e inocular directamente.
5. Tomar la otra alícuota y procesar como se describe previamente en el procedimiento de cultivo por método de Petroff modificado.
6. Leer y reportar como se describe en la sección de lectura e interpretación.

Cultivo de muestras sólidas estériles: materiales de biopsia pleural, hepática o ganglionar, piezas de resección quirúrgica

1. Preparar el mismo material que el utilizado para el cultivo de muestras pulmonares, agregando a este: bisturí, mortero y pistilo estériles.
2. Fraccionar la muestra en el mortero con el bisturí.
3. Macerar la muestra con el pistilo y agregar agua destilada estéril hasta cubrirla.
4. Inocular 4 gotas de esta suspensión directamente al medio de cultivo.
5. Tomar el resto de la suspensión y procesar como se describe previamente en el procedimiento de cultivo por método de Petroff modificado.
6. Leer y reportar como se describe en la sección de lectura e interpretación.

Cultivo de muestras líquidas no estériles: orina, lavado gástrico, lavado bronquial

1. Preparar material según se describe en la sección “preparación de material”.
2. Proceder conforme al volumen de muestra:
   a. En muestras < 4 mL procesar según el método de Petroff (sin centrifugar previamente).
   b. En muestras > 4mL proceder a centrifugar por 15 minutos a 3000 gravedades. Si se utilizan tubos de 50 ml conteniendo más de 15 ml de muestra, prolongar la centrifugación hasta 30 minutos.
      i. Descartar el sobrenadante.
      ii. Agregar 1 ml de buffer a cada sedimento.
3. Procesarla muestracómo se describe previamente en el procedimiento de cultivo por método de Petroff modificado.
4. Leer y reportar como se describe en la sección de lectura e interpretación.

Tabla No.18
Cuantificación de cultivos en medios sólidos

Reporte	Crecimiento
Contaminado	Todos los tubos inoculados contaminados
Negativo	Sin crecimiento a los 60 días de incubación (8 semanas)
Número exacto de colonias	Entre 1 y 19 colonias en todos los tubos inoculados
Positivo (+)	20 a 100 colonias
Positivo (++)	Más de 100 colonias, colonias separadas
Positivo (+++)	Colonias confluentes (incontables)

Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II Cultivo Organización Panamericana de la Salud, 2008.

Recomendaciones sobre su uso

Debido a su complejidad, el cultivo de micobacterias debe utilizarse según algoritmo diagnóstico descrito en las figuras 17-19.
Algunas de las principales recomendaciones del uso del cultivo son:

- Para identificación correcta de cepas aisladas (micobacterias no tuberculosas)
- En control mensual de tratamiento en pacientes TB-DR y para completar condición de egreso.
- Pacientes con baciloscopia positiva a partir del segundo mes de tratamiento.
- Pacientes antes tratados (24).

Se recomienda seguir los algoritmos descritos en la sección 5 de este capítulo para el uso del cultivo en situaciones específicas.

3b. Cultivo en medio líquido

Los medios de cultivo líquido, tales como el MGIT (MycobacterialGrowthIndicatorTube), son medios ricos en nutrientes y que utilizan antibióticos para inhibir el crecimiento de otras bacterias (30).

Principio

El crecimiento bacteriano es detectado a través de la producción de fluorescencia, la cual aumenta proporcionalmente conforme disminuye la concentración de oxígeno dentro del medio, al ser este último consumido por el crecimiento de bacterias. Este tipo de cultivos puede ser utilizado de forma automatizada, con el equipo BACTEC MGIT 960 o de forma manual, con el sistema BBL MGIT (Becton Dickinson, New Jersey) (32).

Manejo de muestras

Al igual que los medios de cultivo sólido, la muestra utilizada para el cultivo en medios líquidos dependerá del sitio anatómico de la lesión. Para una descripción detallada del envío de los diferentes tipos de muestras, consultar la Tabla 11. Condiciones para el manejo de muestras para cultivo en capítulo número 3(24).

Ventajas y Desventajas

Entre sus principales ventajas se encuentran:

- Tiempo de respuesta menor (8 – 42 días) comparado con el cultivo en medios sólidos
- Mayor sensibilidad que un medio sólido(aproximadamente 10% más)
- Al igual que los medios sólidos, permite la realización de pruebas de sensibilidad (24).

Entre sus desventajas se pueden mencionar:

- Mayor porcentaje de contaminación comparado con los medios sólidos.
- Mayor riesgo de producción de aerosoles.
- Mayores costos relacionados con los reactivos, equipo e infraestructura.
- No permite el cultivo de muestras de sangre (24).

Interpretación de resultados

Al igual que el cultivo sólido, los resultados del cultivo en medios líquidos pueden ser los siguientes:

- Contaminado
- Negativo
- Positivo para M. tuberculosis(requiere identificación de especie).
- Positivo para otras micobacterias diferentes a M. tuberculosis (requiere identificación de especie) (32).

4. Ensayos de detección de Ácidos Nucleicos

Principio

Las pruebas de detección de ácidos nucleicos, "NucleicAcidAmplification Test" (NAAT´s, por sus siglas en inglés), han revolucionado las pruebas diagnósticas para la mayoría de patógenos. Esta tecnología implica el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual consiste en amplificar específicamente una sección del ADN genómico o ARN celular de un patógeno (26).

Con respecto al diagnóstico de TB, los métodos de detección de ácidos nucleicos en el mercado actual desarrollan dos funciones: indicar la presencia del complejo M. tuberculosis y detectar mutaciones en genes que confiera resistencia a fármacos. Debido a su alta sensibilidad y su corto tiempo de respuesta son una herramienta esencial para el diagnóstico certero y oportuno de TB(9).

4a. Xpert MTB/RIF®

Esta es una técnica de detección de ácidos nucleicos que se basa en el uso de un PCR automatizado utilizando la plataforma GeneXpert (Cepheid, USA). Esta prueba permite detectar la presencia del complejo M. tuberculosis, así como su resistencia a la rifampicina en un período de 2 horas desde el montaje de la prueba (33).

Nivel de bioseguridad

Como se ha mencionado con anterioridad, la prueba de Xpert MTB/RIF® es un método debajo riesgo en cuanto al nivel de bioseguridad, por lo que los requerimientos necesarios son equivalentes a los mencionados en la sección de baciloscopía (capitulo 2), sin embargo, esto último aplica solamente si el procedimiento se hace a partir de una muestra directa, en caso que el laboratorio lo trabaje a partir del sedimento producto de una descontaminación del proceso de cultivo, el nivel de bioseguridad requerido será el de nivel intermedio (17).

Ventajas y desventajas

Dentro de las ventajas de este método encontramos:

- Resultados de detección de M. tuberculosis y resistencia a rifampicina en menos de dos horas.
- Manipulación y procesamiento de muestra no requieren de personal altamente especializado en métodos de detección ácidos nucleicos.
- La sensibilidad y especificidad es mayor que la baciloscopía y similar al cultivo; sensibilidad analítica de 131 UFC/ml de esputo(33).Sin embargo, dentro de las limitantes encontramos:
- Requiere una unidad de suministro de energía estable (UPS).
- Ambientes con temperatura controlada.
- No se recomienda para el seguimiento de pacientes en tratamiento.
- No está recomendado en muestras de orina, heces y sangre(33).

Manejo de la muestra

En casos de sospecha de TB pulmonar y/o resistencia en adultos y niños, las muestras de elección serán el esputo y en caso de los niños puede utilizarse lavado gástrico o lavado bronquial. (Ver tabla 15. Condiciones para el manejo de muestras para cultivo en capítulo 3) (33).

En caso de sospecha de TBEP en adultos y niños, las muestras como LCR, nódulos linfáticos y otros tejidos mostraron tener un buen desempeño; sin embargo, al momento de la redacción del presente manual, no existía un consenso con respecto a su uso en fluido pericárdico, líquido ascítico, orina, sangre y heces para el diagnóstico de Xpert MTB/RIF®(34).

Procedimiento:

Figura No.15
Procedimiento para realizar prueba Xpert MTB/RIF®.

MétodoXpert MTB/RIF®	
	Añadir el reactivo de muestra (samplereagent) a la muestra en proporción 2:1 (ej: 3 ml de muestra agregue 6 ml de reactivo de muestra)
	Agitar la mezcla y esperar por 10 minutos; una vez concluido los 10 minutos, vuelva a agitar y esperar 5 minutos (15 minutos total)
	Utilizando la pipeta provista en el kit, llenar hasta la marca (2ml), evitando la formación de burbujas
	Destape la parte superior del cartucho, y agregue los 2 ml en el cartucho. (debe ser cuidadoso de no tocar la parte del frente donde se encuentra el código de barras y la pestaña en la parte de atrás)

Fuente: Xpert MTB/RIF implementation manual World Health Organization, 2014.

Nota: Para realizar este proceso se deben utilizar guantes libres de talco.

Debido a que muchas de las muestras extrapulmonares llegan a ser únicas y de difícil acceso, se recomienda que en caso se pretenda referir una de estas, se coordine directamente con el sitio que la procesará.

4b. Xpert MTB/RIF® Ultra

La prueba Xpert MTB/RIF® Ultra es una mejora operativa de la prueba Xpert MTB/RIF®, que supera las limitaciones de sensibilidad en algunos pacientes como los casos BK negativos y TB VIH, ya que tiene una sensibilidad analítica de 16 UFC/ml, lo que permite que exista una nueva categoría de resultados "trazas"; (esto indica que se encontró una pequeña cantidad de ADN de M. tuberculosis, sin ser posible determinar la resistencia de la rifampicina) al momento de la redacción del presente manual, este método aún no se había establecido por completo en el país, sin embargo es la mejora operativa que eventualmente se implementará en todos los laboratorios que ya cuentan con la prueba de Xpert MTB/RIF® (35,36).

Interpretación

Este ensayo brinda resultados semi-cuantitativos respecto a la presencia de *M. tuberculosis* y cualitativos respecto a la resistencia a rifampicina (33). En la tabla 18 se muestra una descripción de la interpretación de los resultados.

Tabla No.19
Interpretación de los resultados Xpert MTB/RIF® yXpert MTB/RIF® Ultra *

Reporte del equipo	Interpretación
MTB Detected (High, Medium, Low, Very Low); Rif ResistanceDetected *MTB Detectado (Alto, Medio, Bajo, Muy Bajo); Resistencia a Rifampicina detectada*	Se detectó ADN delcomplejo *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra; la bacteria tiene una mutación en el gen *rpoB*que le confiere resistencia a la Rifampicina.
MTB Detected (High, Medium, Low, Very Low); Rif ResistanceNot detected *MTB Detectado (Alto, Medio, Bajo, Muy Bajo); Resistencia a Rifampicina no detectada*	Se detectó ADN de complejo *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra; la bacteria es sensible a la rifampicina.
MTB Detected, Rif Resistance Indeterminate *MTB Detectado; Resistencia a Rifampicina indeterminada*	Se detectó ADN de complejo *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra; el equipo no puede determinar si existe una resistencia a la rifampicina (se recomienda tomar nueva muestra).
MTB Not Detected *MTB No Detectado*	No se detectó ADN de complejo *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra.
Invalid/Error/No Result *Inválido/Error/Sin Resultado*	Se procesó, sin embargo, existió un problema con la muestra, equipo o cartucho que no permitió la emisión del resultado (repetir el procedimiento con la misma muestra, si persiste el problema, solicitar una nueva muestra).
MTB Detected trace; Rif Resistance Unknow* *MTB Detectado en trazas; Resistencia a Rifampicina Indeterminada**	Se detectó una pequeña cantidad de ADN de Mycobacterium tuberculosis, el equipo no puede determinar si existe una resistencia a la rifampicina.En caso de ser paciente VIH, pediátrico o muestra extrapulmonar considerar este resultado junto con la clínica del paciente para iniciar tratamiento y repetir con una nueva muestra.

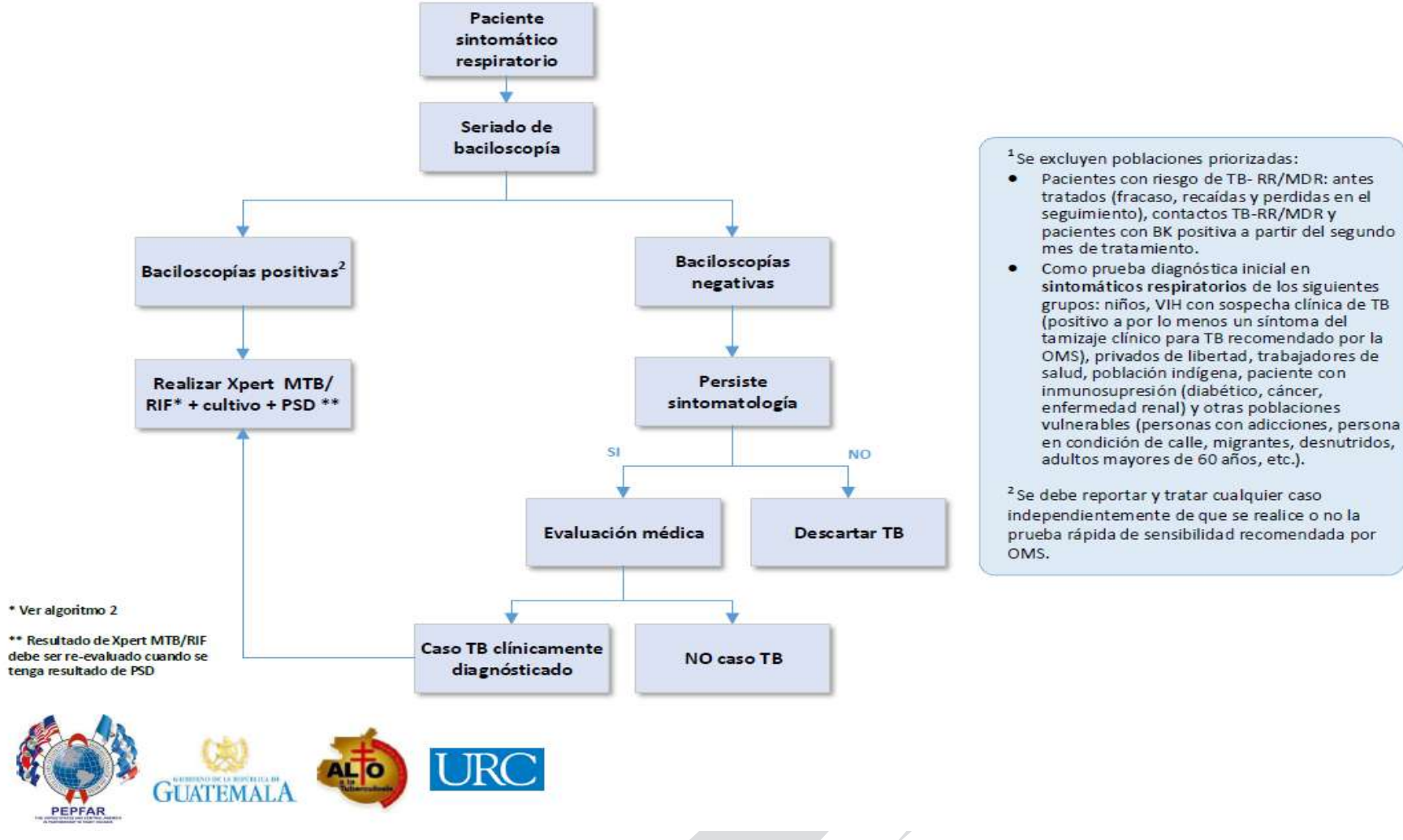
Fuente:Xpert MTB/RIF implementation manual World Health Organization, 2014.

5. Algoritmos diagnósticos recomendados

El diagnóstico de TB en el país está basado en la situación epidemiológica local, los recursos con los que cuenta el sistema de salud, los nuevos métodos de diagnóstico y las recomendaciones internacionales; a continuación, se presentan los algoritmos actualmente recomendados.

Figura No.16

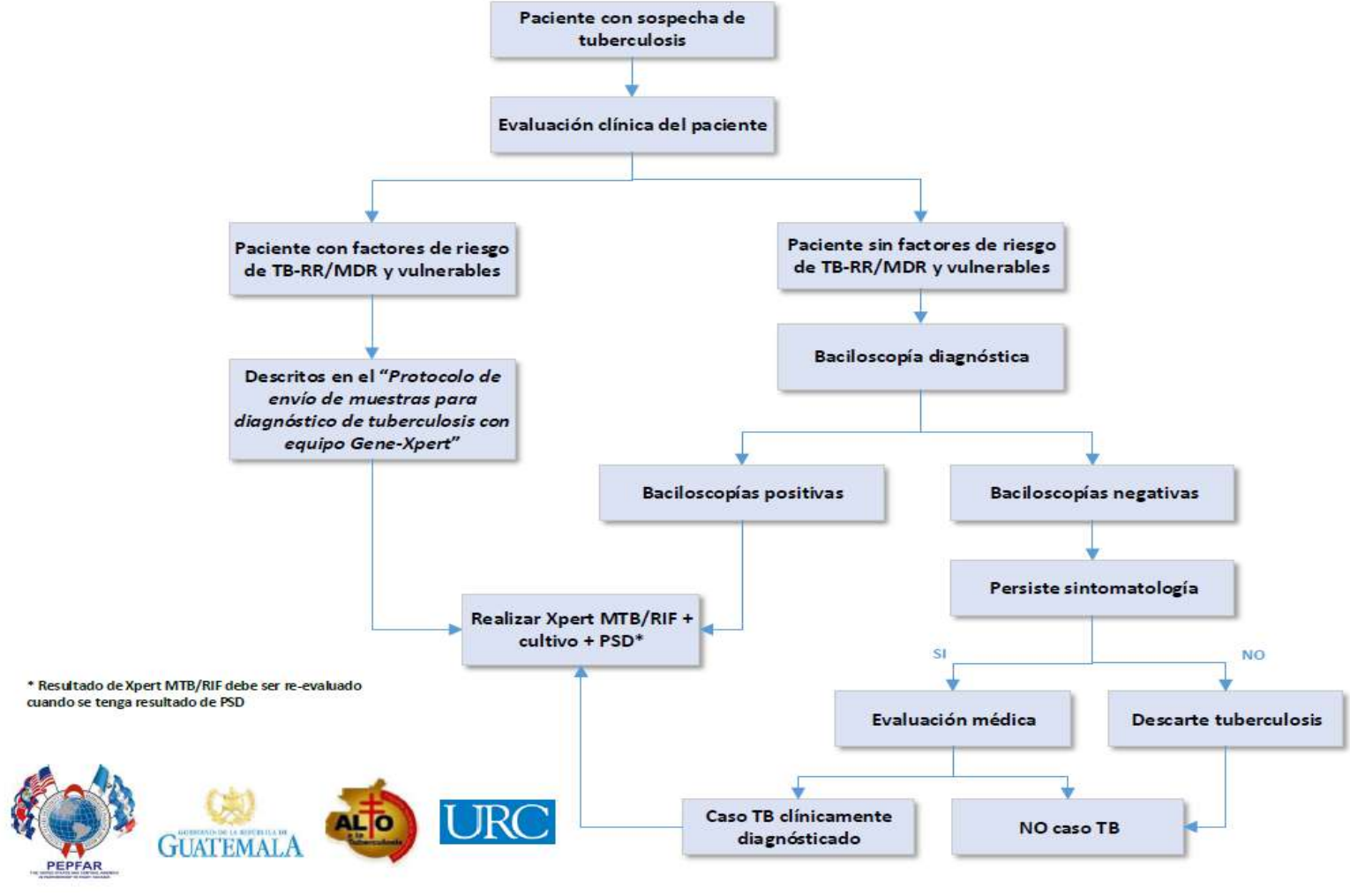
Algoritmo 1: Pacientes con sospecha de TB



Fuente: MSPAS, Componente de Laboratorio PTB, Guatemala, 2018.

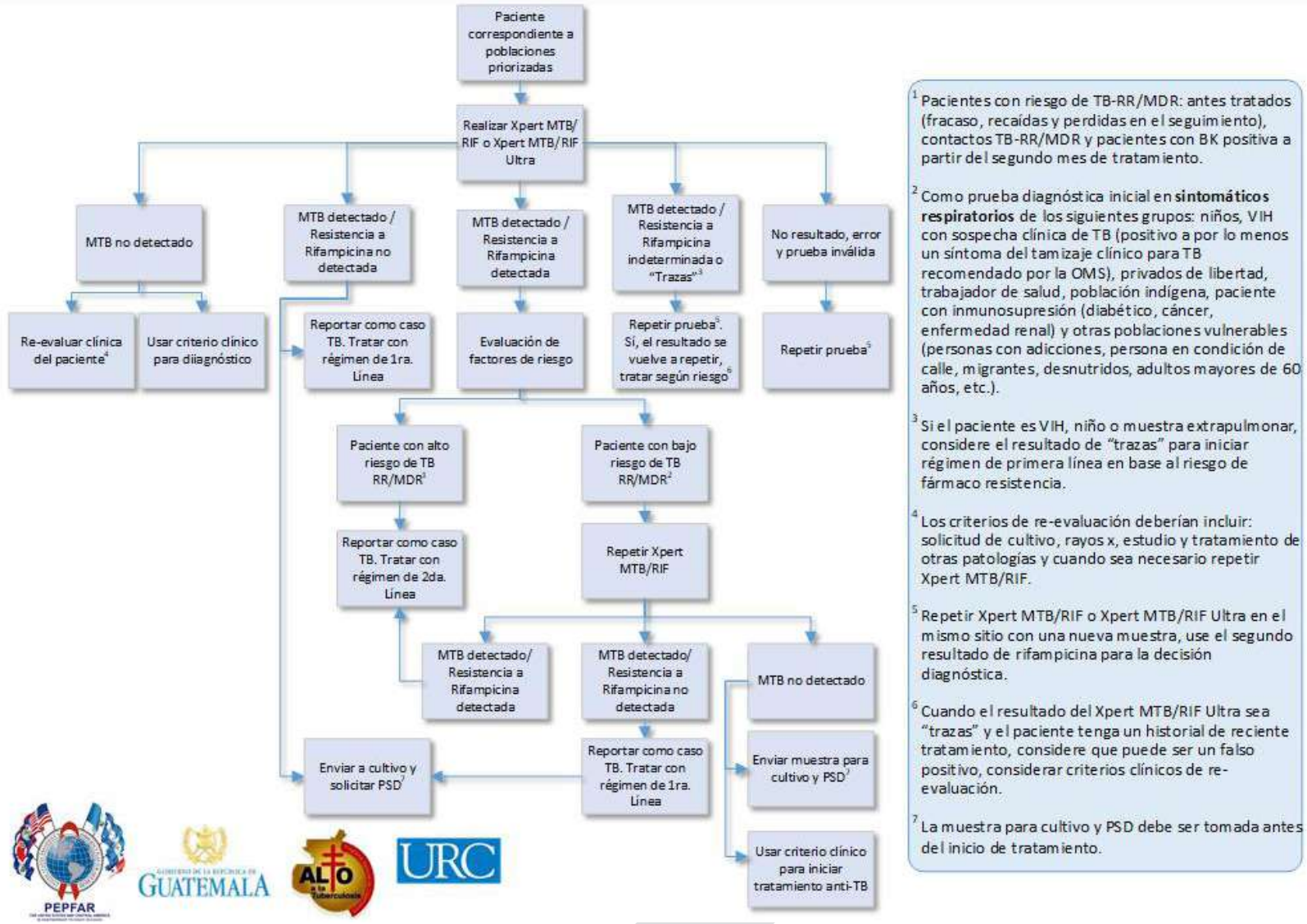
Figura No.17

Algoritmo Resumido para sospecha de TB a nivel local



Fuente: MSPAS, Componente de Laboratorio PTB, Guatemala, 2018.

Figura No.18
Algoritmo 2: Pacientes con sospecha de TB de poblaciones con riesgo de TB-RR/MDR y vulnerables [1,2]



[1] Pacientes con riesgo de TB-RR/MDR: antes tratados (fracaso, recaídas y perdidas en el seguimiento), contactos TB-RR/MDR y pacientes con BK positiva a partir del segundo mes de tratamiento.

[2] Como prueba diagnóstica inicial en **sintomáticos respiratorios** de los siguientes grupos: niños, VIH con sospecha clínica de TB (positivo a por lo menos un síntoma del tamizaje clínico para TB recomendado por la OMS), privados de libertad, trabajador de salud, población indígena, paciente con inmunosupresión (diabético, cáncer, enfermedad renal) y otras poblaciones vulnerables (personas con adicciones, persona en condición de calle, migrantes, desnutridos, adultos mayores de 60 años, etc.).

[3] Si el paciente es VIH, niño o muestra extrapulmonar, considere el resultado de "trazas" para iniciar régimen de primera línea en base al riesgo de fármaco resistencia.

[4] Los criterios de re-evaluación deberían incluir: solicitud de cultivo, rayos x, estudio y tratamiento de otras patologías y cuando sea necesario repetir Xpert MTB/RIF.

[5] Repetir Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/RIF Ultra en el mismo sitio con una nueva muestra, use el segundo resultado de rifampicina para la decisión diagnóstica.

[6] Cuando el resultado del Xpert MTB/RIF Ultra sea "trazas" y el paciente tenga un historial de reciente tratamiento, considere que puede ser un falso positivo, considerar criterios clínicos de re-evaluación.

[7] La muestra para cultivo y PSD debe ser tomada antes del inicio de tratamiento.

Fuente: MSPAS, Componente de Laboratorio PTB, Guatemala, 2018.

CAPITULO

5

MÉTODOS PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Generalidades de la resistencia a drogas antituberculosas.

Como se explicó en el capítulo 1, la TB resistente a drogas antituberculosas (TB-DR) es un problema de salud pública muy importante. Debido a esto, la realización de pruebas de sensibilidad a drogas antituberculosas (PSD) juega un papel vital en el control y prevención de la TB a nivel mundial (10).

Las drogas antituberculosas se pueden clasificar en drogas de primera y segunda línea, siendo las drogas de primera línea, mucho más efectivas y con menos efectos secundarios que las de segunda línea (9). En la tabla 19, se muestra un resumen de las principales diferencias entre los esquemas de primera y segunda línea.

Tabla No.20
Diferencias entre esquemas de TB de primera y segunda línea

Características	Esquema de primera línea	Esquema de segunda línea
Principales drogas utilizadas (9)	Isoniacida (H) Rifampicina (R) Etambutol (E) Pirazinamida (Z)	Fármacos inyectables –DISL – (kanamicina, amikacina, capreomicina) Fluoroquinolonas – FQ – (Levofloxacina, Moxifloxacina, Gatifloxacina) Drogas bacteriostáticas (Etionamida, Cicloserina, Protionamida)
Efectividad del tratamiento (10,37)	>95%	50 – 70%
Duración del tratamiento	6 – 9 meses	12 – 18 meses
Patrones de resistencia implicados	Monoresistente (RR y HR) * Poliresistente Multidrogoresistente (MDR)*	Extensamente resistente (XDR)*

Fuente: Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis World Health Organization, 2014.

* En paréntesis los patrones de resistencia más importantes: RR= resistencia a la rifampicina; HR = resistencia a la isoniacida; MDR= resistencia al rifampicina e isoniacida simultáneamente; XDR = MDR + resistencia a una fluroquinolona y alguna droga inyectable de segunda línea.

Idealmente, todos los casos con diagnóstico de TB confirmado bacteriológicamente deben tener acceso a la PSD, al menos para los fármacos que son claves para el éxito del tratamiento (H y R). En el proceso que lleva a alcanzar este objetivo, se deberá priorizar la realización de la PSD para los casos con las siguientes características que elevan el riesgo de resistencia a los fármacos:

- Fracaso al tratamiento
- Antecedentes de tratamiento previo, irregularidad en el cumplimiento de un tratamiento o prescripción de un esquema incompleto o inadecuado
- Exposición a infección por TB resistente a los fármacos, especialmente en hacinamiento (38).

Los métodos utilizados para el diagnóstico de resistencia se basan en dos principios:

1. Determinar el crecimiento de la cepa en medios que contienen la droga a evaluar (métodos fenotípicos).

2. Determinar la presencia de mutaciones puntuales en genes específicos que confieren resistencia a drogas (métodos genotípicos. (38).

Ambos pueden ser trabajados a partir de muestras o de aislamientos puros (sin contaminación). Si se trabaja a partir de aislamientos (métodos indirectos), se debe tomar en cuenta los siguientes aspectos:

1. Preferir los primeros cultivos (cepas aisladas de una muestra) a las resiembras (cepas tomadas de un aislamiento), ya que en las segundas existe el riesgo de perder un clon resistente.
2. Enviar el asilamiento al laboratorio que realizará la PSD en cuanto se observa crecimiento (3 – 5 semanas), para evitar demoras en el diagnóstico (38).

Si se trabaja a partir de muestras (método directo) hay que tomar en cuenta que la mayoría de los métodos requieren que la misma sea BK+, razón por la cual es más común que se utilice para muestras de esputo. Si la muestra no es BK+, el laboratorio que realice la PSD tendrá que hacer primero el cultivo, por lo que al tiempo de respuesta de la PSD hay que sumarle el tiempo que demorará el aislamiento de la cepa a probar(38).

Tabla No. 21
Métodos avalados por la OMS, PTB y LNS para la detección de resistencia de TB en Guatemala

Prueba	Método	Tiempo de respuesta	Comentarios
PSD a drogas de 1ra línea por métodos fenotípicos usando medios sólidos	**Löwenstein Jensen** Middlebrook 7H10 o 7H11	3 – 4 semanas (tomar en cuenta el tiempo del cultivo)	Se requiere al menos capacidad para hacer PSD a R y H Reservado para laboratorios de alto riesgo Mayor reproducibilidad para H y R, seguidos de E. No disponible para Z Medios con droga a una concentración estandarizada (concentración crítica) Diferencias entre medios sólidos y líquidos, igual que las descritas para cultivo
PSD a drogas de 1ra línea por métodos fenotípicos usando medios líquidos	Métodos comerciales y no comerciales disponibles. MGIT es el método más usado	1 – 3 semanas (tomar en cuenta el tiempo del cultivo)	
PSD a drogas de 2da línea por métodos fenotípicos usando medios sólidos	**Löwenstein Jensen** Middlebrook 7H10 o 7H11	3 – 4 semanas (tomar en cuenta el tiempo del cultivo)	▯ Se requiere al menos capacidad para hacer PSD a DISL y FQ ▯ Reservado para laboratorios de alto riesgo ▯ Medios con droga a una concentración estandarizada (concentración crítica) ▯ Diferencias entre medios sólidos y líquidos, igual que las descritas para cultivo
PSD a drogas de 2da línea por métodos fenotípicos usando medios líquidos	Métodos comerciales y no comerciales disponibles. **MGIT es el método más usado**	1 – 3 semanas (tomar en cuenta el tiempo del cultivo)	
Pruebas Moleculares	**Sistema GeneXpert con cartucho Xpert MTB/RIF®**	2 horas (tiempo por 1 prueba)	▯ Diseñado para ser usado en todos los niveles de laboratorios (ver tabla 2, capitulo 1). ▯ Requiere de fuente de energía ininterrumpida y ambientes con temperatura controlada. ▯ Nivel de errores aceptable< 3% ▯ Detecta presencia de TB y resistencia a la Rifampicina en el mismo ensayo ▯ Se recomienda hacer como primera prueba en pacientes en riesgo de TBMDR y TB/VIH (ver Figura 16)
	Ensayos de hibridación en línea (LPA). Diferentes métodos comerciales disponibles. **GenotypeMTBDRplus® y GenotypeMTBDRsl®** los más utilizados	1 – 2 días. Si se procesan muestras por lote, se puede incrementar el tiempo de respuesta	▯ Se puede hacer a partir de muestras BK+ o aislamientos ▯ MTBDRplus® detecta resistencia a R (rpoB) e H, de alto nivel (katG) y de bajo nivel (inhA) (39) ▯ MTBDRsl® detecta resistencia a FQ (gyrA y gyrB) y a DISL (rrs y eis) (40)

Fuente: Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis World Health Organization, 2014.

2. Prueba de sensibilidad a drogas por métodos fenotípicos

Este método se basa en el crecimiento de la bacteria en un medio de cultivo con concentraciones críticas de antibióticos, lo cual permite definir el perfil de resistencia a los fármacos independientemente de su mecanismo o base molecular y también son conocidos como PSD fenotípicas; en el presente documento los métodos fenotípicos se dividiránde acuerdo con el medio de crecimiento, líquido o sólido (38).

Nivel de bioseguridad

Los laboratorios que realicen pruebas de sensibilidad fenotípicas, al igual que los procedimientos de caracterización y pruebas genotípicas a partir de un cultivo primario, son laboratorios considerados de alto riesgo, esta clasificación se debe principalmente a la alta carga bacilar de las muestras que se manipulan y que los procedimientos tienen un mayor riesgo de generar aerosoles (17).

2a. Método fenotípico en medio sólido

Principio

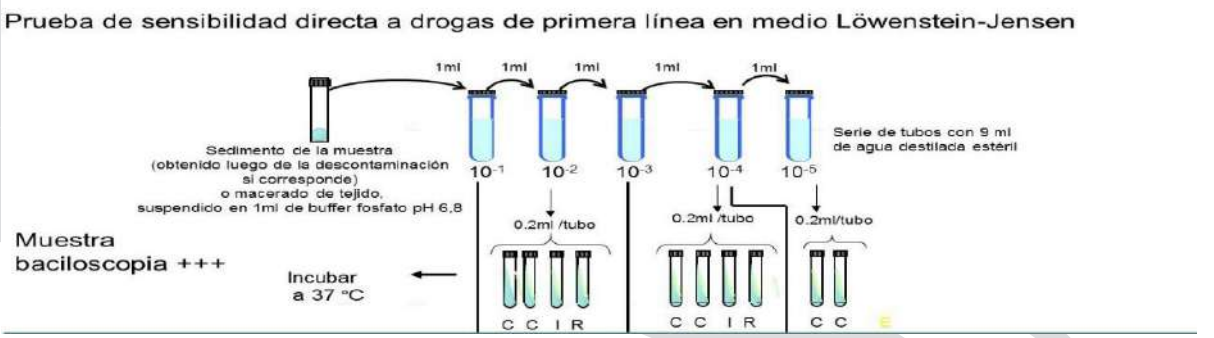
Es el método actualmente utilizado por el Laboratorio Nacional de Salud, el cual se basa en la metodología de las proporciones, descrito por Canetti, Rist y Grosset. El método de las proporciones permite comparar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) que crecen sobre un medio con concentraciones de antibióticos, siendo el medio Löwenstein-Jensen el más utilizado, pero como se verá más adelante también puede ser utilizado un medio líquido(38).

La resistencia a los fármacos se determina comparando el crecimiento de la cepa a probar en medios LJ con droga y sin droga. Si el crecimiento se da en ambos medios, la bacteria se clasifica como resistente, por el contrario, si el crecimiento se da únicamente en el medio sin droga, la bacteria se clasifica como sensible. Para determinar que la cepa es resistente tanto a isoniacida como a rifampicina, el crecimiento en el medio con droga deberá ser mayor al 1% al compararlo al medio sin droga, razón por la cual, en el medio control debe haber al menos 100 colonias (38).

Drogas de primera línea

El tratamiento de primera línea tiene alta probabilidad de fracasar cuando el paciente tiene cepas mutantes que son resistencia a rifampicina y esta probabilidad es mayor sí esos mutantes son simultáneamente resistentes a isoniacida, es decir MDR. El método de proporciones tiene una alta eficiencia tanto para la isoniacida como para la rifampicina, a diferencia del resto de drogas de primera línea, razón por la cual la OMS recomienda la priorización de PSD a estas dos drogas (38).

Figura No.19
Procedimiento de método de proporciones para drogas de primera línea



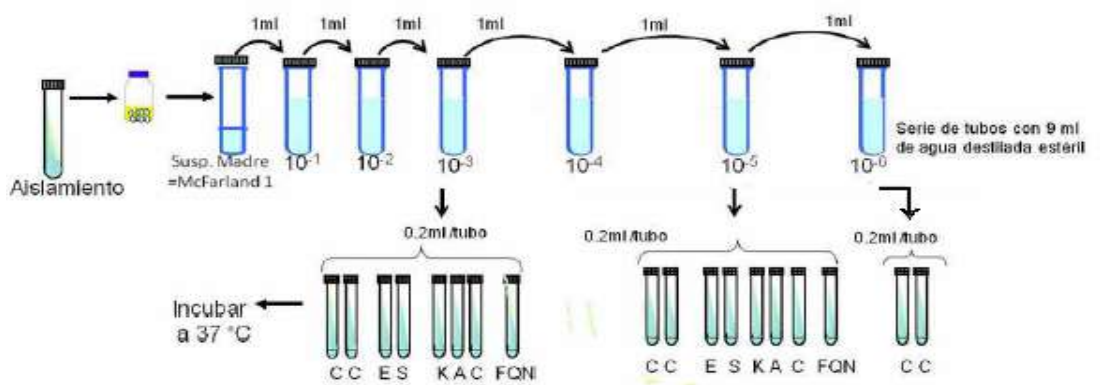
Fuente: Guía técnica para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 3 pruebas de sensibilidad. 2018.

Drogas de segunda línea

Actualmente el Laboratorio Nacional de Salud cuenta con la PSD en medios sólidos para drogas de segunda línea, incluyendo la ofloxacina, amikacina y kanamicina. Esta prueba se deberá solicitar y derivar la muestra en caso de:

- Paciente MDR sin mejora clínica con cultivos de seguimiento clínico positivos.
- Paciente contacto de algún caso resistente a alguna droga de segunda línea (31).

Figura No.20
Procedimiento de método de proporciones para drogas de segunda línea



Fuente: Guía técnica para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis UNANUE, 2018.

Ventajas y desventajas del método fenotípico en medio sólido

Dentro de las ventajas del método:

- Económico y muy preciso.
- Continúa siendo considerado el método de referencia para esclarecer inconsistencias, indefiniciones o dudas que surgen con los resultados obtenidos con otras pruebas (38).

Dentro de las desventajas encontramos:

- Requiere de personal con alta capacitación para estandarizar el método.
- Para su procesamiento es necesario contar con una cepa pura (sin contaminación) y que se observe un crecimiento adecuado.
- El promedio de resultado puede demorar alrededor de 3 a 4 semanas, sin incluir el tiempo de crecimiento que demora el cultivo.
- Requiere infraestructura sofisticada que cumpla con los estándares de un laboratorio de alto riesgo (38).

2b. Método fenotípico en medio líquido, MGIT

Para el método de las proporciones en medio líquido, se agrega la concentración crítica de cada droga a ensayar en un tubo de MGIT. Al igual que en la prueba utilizando LJ, se agrega un tubo MGIT sin antibiótico, para comparar el crecimiento. Los resultados son interpretados de la misma forma que el método de las proporciones en medios sólidos (38).

Debido a que en los medios líquidos no es posible contar colonias, entonces, basándose en el mismo principio del método de las proporciones en medio sólido, el inóculo es 100 veces más diluido en el medio control con respecto a los medios con antibiótico. De esta forma, si se detecta señal de fluorescencia igual o mayor en el medio con antibiótico que en el control, se interpreta como un crecimiento mayor del 1% de bacterias y por lo tanto resistente (38).

Ventajas y desventajas

Entre las ventajas de este método se encuentra:

- Lecturas de 3-14 días a partir de la inoculación del medio.
- Lectura de la fluorescencia se puede hacer manual o automatizado.
- El uso de software para la lectura permite comparar patrones de resistencia poco comunes (38).

Dentro de las principales desventajas:

- Propenso a la contaminación.
- En concentraciones cercanas al límite (1%), la lectura automatizada puede verse interrumpida automáticamente por el equipo (MGIT 960/320), por lo cual se deberá tener esto en consideración al momento de la lectura.
- Presenta mayor riesgo de generar aerosoles (38).

Envío de muestras

Los principios básicos que tomar en cuenta cuando se envía una muestra para cultivo y PSD son los siguientes:

- Evitar contaminación de la muestra (restos alimenticios, entre otros)
- Disminuir riesgos relacionados a bioseguridad
- Evitar la degradación del material biológico (38).

Para cumplir con estos tres principios, es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos:

1. Procedimiento de toma de muestra
2. Recipiente a utilizar
3. Condiciones de temperatura en almacenamiento y transporte
4. Tiempo desde la toma hasta el procesamiento de esta (38).

Tabla número 11. Condiciones para el manejo de muestras para cultivo (capitulo 3), se presenta un resumen de estos aspectos según el tipo de muestra.

Envío de cepas

Los cultivos positivos tienen mayor probabilidad de generación de aerosoles en el transporte. Siempre que se envíe un cultivo positivo para realización de PSD, se debe utilizar un sistema de triple embalaje de la siguiente forma(38):

- Asegurar el rótulo y el cierre hermético de la tapa del tubo que contiene el aislamiento (cultivo positivo), colocarparafilm alrededor de la tapa. Es el primer envase.
- Envolver cada tubo con material que amortigüe y pueda absorber todo el contenido del tubo en caso de accidente en tránsito, puede ser una capa de algodón de 2 cm de espesor.
- Colocar el tubo así protegido dentro de un segundo envase. Debe ser rígido, impermeable, con cierre hermético y resistente a golpes y presión de gran intensidad. Puede colocarse más de un tubo dentro del segundo envase asegurando que no haya contacto entre ellos.
- Colocar los formularios de solicitud de prueba de identificación/ sensibilidad dentro de una bolsa plástica.

- Ubicar el segundo envase conteniendo el/los tubos y las solicitudes dentro de un tercer envase. Puede ser de plástico, fibra corrugada, cartón duro, madera u otro material de alta resistencia.
- La tercera caja debe estar identificada con una etiqueta visible y clara que tenga:
    - Rótulo **"Riesgo Biológico"**
    - Una flecha que indique el sentido en el que debe mantenerse la posición de la caja para que los tubos queden en posición vertical con la boca hacia arriba
    - Nombre de la institución y del responsable que realiza el envío, dirección, número de teléfono/fax
    - Nombre del profesional al que se envía el material, dirección, número de teléfono/fax del laboratorio de referencia.
- Entregar el material a personal entrenado para transportarlo y para actuar en caso de accidente.
- Anunciar por teléfono al laboratorio de referencia el envío y comprobar que arribe según lo esperado (30).

Los laboratorios regionales enviaran la cepa de TB aislada o la muestra (en caso de no contar con posibilidad de cultivar) al Laboratorio Nacional de Salud, para la realización de pruebas de sensibilidad a drogas de primera y segunda línea cuando la prueba de Xpert MTB/RIF® sea resistente a rifampicina(31).

En caso de contar con la necesidad de enviar cultivos positivos fuera del país, hay que tomar en cuenta que las normas internacionales requieren que este material resista una presión de 95 kPa (aproximadamente 1 kg cada cm2). Para este propósito, se recomienda revisar la Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas 2017-2018, publicado por la OMS (41).

3. PSD por métodos moleculares

Como se mencionó anteriormente, los métodos moleculares para realizar PSD buscan identificar las mutaciones que han sido asociadas a la resistencia a los fármacos. Para esto, no es necesario que el bacilo esté multiplicándose o viable, por lo que las condiciones del cultivo o de la muestra a partir de la que se trabaja no son críticas como con las PSD por métodos fenotípicos (38).

Para determinar si la cepa en cuestión tiene alguna de esas mutaciones, es necesario amplificar y secuenciar el segmento del gen donde se producen. Se utilizan varios juegos de primers que permiten amplificaralgún segmento específico de M. tuberculosis para identificar la bacteria, así como un segmento del gen o genes donde se concentran las mutaciones (38). En la tabla 22 se muestra un resumen de los genes más importantes asociados a resistencia a fármacos antituberculosos.

Tabla No.22
Genes asociados a resistencia a drogas de primera y segunda línea[1]

Gen donde la mutación causa resistencia	Droga o drogas implicadas	Implicación conocida
katG	Isoniacida	Alto nivel de resistencia a H. Más frecuente en cepas MDR.
inhA	Isoniacida Etionamida Protionamida	Bajo nivel de resistencia a H. Más frecuentemente asociada a monoresistencia a H.
ethA	Etionamida Protionamida Tioacetazona	No existe prueba comercial para la identificación de mutaciones
grpoB	Rifampicina	Más prevalente (>95%). Se han identificado varias mutaciones que pueden causar distintos niveles de resistencia a R
gyrA	Fluoroquinolonas	Alto nivel de resistencia a todas las FQ
gyrB	Fluoroquinolonas	
Rrs	Estreptomicina Kanamicina Amikacina Capreomicina	Alto nivel de resistencia a amikacina y kanamicina
embB	Etambutol	Bajo y moderado nivel de resistencia
pncA	Pirazinamida	*M. bovis* y BCG son resistentes naturales

Fuente: Guía técnica para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis UNANUE, 2018.
[1] se describen los genes en donde hay evidencia de mutaciones que causan resistencia a las principales drogas. Para un estudio más detallado de otras drogas, se recomienda leer la guía técnica para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 3, PSD, publicado por el Organismo Andino de Salud.

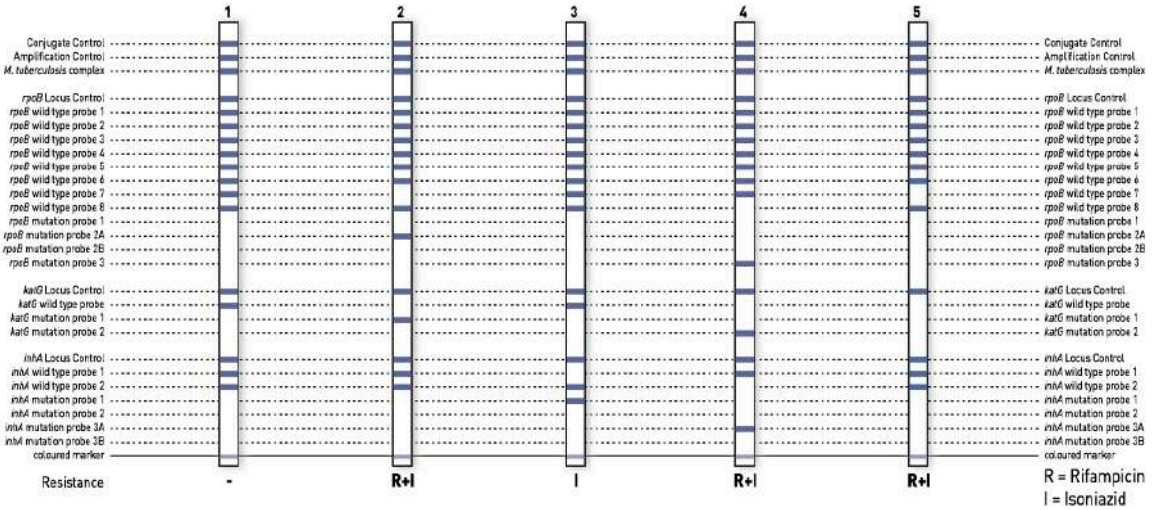
3a. Ensayos de hibridación en línea (LPA)

Principio

Estos son ensayos de amplificación de ácidos nucleicos en los cuales la detección de mutaciones se observa a través de la ausencia de bandas en las sondas silvestres y/o presenciade bandas en las sondas mutantes en una tira de nitrocelulosa.

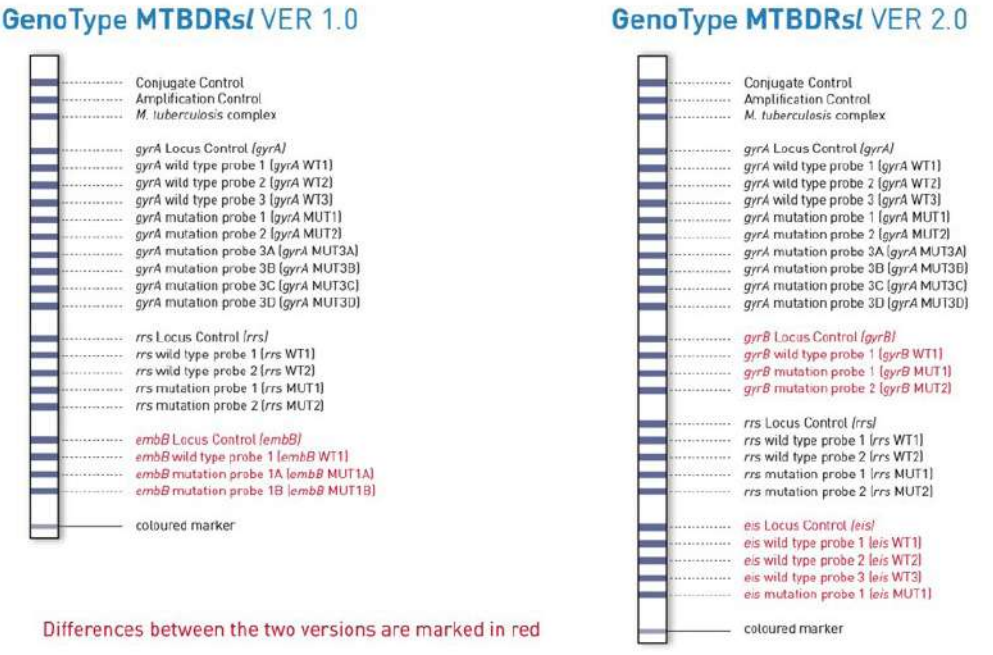
Los métodos comerciales más ampliamente distribuidos son Genotype MTBDRplus®, que identifica resistencia a R e H (de alto y bajo nivel), así como Gentoype MTBDRsl® que identifica resistencia a FQ y DISL (39).

Figura No. 21
GenotypeMTBDRplus® ver 2.0



Fuente: Hain-Lifescience. Geno Type MTBDR plus ver 2.0 [Internet], Ifu-298-16. Germany; 2011. p. 1–8. Available from: www.hain-lifescience.de.

Figura No.22
Genotype MTBDRsl® ver 1.0 y ver 2.0



Fuente: Hain-Lifescience. Geno TypeMTBDRsl ver 2.0 [Internet], Ifu-298-16. Germany; 2011. p. 1–8. Availablefrom: www.hain-lifescience.de.

En ambas metodologías, se utilizan primers específicos para amplificar las regiones de los genes que confieren resistencia a drogas específicas (ver tabla número 20), tanto para las secuencias sin mutaciones (cepas silvestres o "wild type") como las secuencias con las mutaciones más frecuentes(39,40).

En el caso de que la cepa investigada no presente mutaciones, se observaran bandas en todas las regiones de las cepas silvestres. Por el contrario, en el caso de que la cepa investigada presente mutaciones, se observaran bandas en las regiones con mutaciones y ausencia de bandas en la secuencia silvestre. La resistencia a una droga también podrá ser visualizada como la ausencia de bandas en una región de la cepa silvestre y ausencia de bandas en las regiones de mutaciones, significando esto último, que existe una mutación que el ensayo no pudo identificar (resistencia inferida)(39,40).

Por último, ambos ensayos identifican regiones específicas de M. tuberculosis, sirviendo como control de identificación de la especie, sin embargo debido al costo se recomienda realizar una identificación por detección de Ag MPT64 (ver siguiente capítulo) antes de realizar el ensayo por el método indirecto (39,40).

Manejo de muestras usadas

Actualmente la OMS recomienda el uso de estas pruebas en muestras de esputo que sean baciloscopía positivo y en cepas de M. tuberculosis provenientes de cultivos positivos. Es importante mencionar que el desempeño de estas pruebas en muestras de esputo BK negativo (esto incluye muestras de esputo y muestras extrapulmonares) no es adecuado, por lo que no se recomienda el uso de las mismas en este tipo de muestras (39,40).

Nivel de bioseguridad recomendado

El uso de estos métodos ésta reservado para laboratorios de moderado riesgo (método directo de muestras BK positivo) y laboratorios de alto riesgo (métodos indirectos, a partir de cepas provenientes de cultivo) (17).

Ventajas y desventajas

Entre las principales ventajas de este método se encuentran:

- Tiempo de respuesta reducido
- Permite detectar resistencia a varias drogas
- Debido a que identifica los genes que presentan mutación, se puede identificar patrones de resistencia con significancia clínica
    - Mutaciones que confieren resistencia de alto nivel (katG) y de bajo nivel (inhA) a Isoniacida
    - Mutaciones que confieren resistencia cruzada (mutaciones en inhA confieren resistencia a isoniacida, etionamida y protionamida, mientras que mutaciones en katG, solo a isoniacida)(38)

Entre las principales desventajas de estos métodos están:

- Necesidad de equipo e infraestructura.
- Necesidad de personal con experiencia en métodos moleculares.
- Mayor riesgo de infección por parte del personal (38).

Interpretación de resultados

La ausencia de mutaciones indica que la cepa analizada es sensible a la droga específica. La presencia de mutaciones, tanto las identificadas por el ensayo como las no identificadas se interpretarán como que la cepa analizada es resistente a la droga específica (38).

3b. Xpert MTB/RIF®

Este ensayo es la prueba recomendada para el diagnóstico de TB en aquellos pacientes con riesgo de resistencia. Es importante hacer mención que los diferentes grupos presentan diferente riesgo debido a su historial de tratamiento o factores epidemiológicos(9). A continuación, se enumeran los principales grupos de riesgo para

TB-MDR de mayor a menor riesgo.

1. Fracasos a retratamientos de primera línea. Aquellos pacientes que ya fueron tratados anteriormente con esquemas de primera línea y que al final del esquema actual de primera línea, presentan baciloscopías positivas.
2. Pacientes expuestos a casos de TB-MDR: personas que conviven en el hogar, trabajo u otro tipo de actividades cotidianas con personas diagnosticadas con TB-MDR. A mayor tiempo de exposición, mayor riesgo de infección.
3. Fracasos a esquemas de primera línea en pacientes nuevos. Pacientes que nunca han sido tratados con esquemas de primera línea y que en el esquema actual de primera línea presentan baciloscopía positiva después del 5to mes de tratamiento.
4. Fracasos en pacientes que han sido tratados en el sector privado.
5. Recaídas y pacientes que regresan después de la pérdida en el seguimiento (9).

La sensibilidad y la especificidad de este método, al ser comparado con el cultivo en medios líquidos (actual ensayo considerado como estándar de oro por la OMS), se muestra en la tabla número 23(42)

Tabla No.23
Sensibilidad y especificidad agrupada del Xpert MTB/RIF® para la detección de TB pulmonar y resistencia a rifampicina

Uso de la prueba	Sensibilidad % (IC95%)	Especificidad (IC95%)
Prueba inicial para el diagnóstico de TBP	88 (84 – 92)	*99 (98 – 99)*
Detección de resistencia a rifampicina como prueba inicial	95 (90- 97)	*98 (97 – 99)*

Fuente: Using the Xpert MTB/RIF assay to detect pulmonary and extra pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults and children TB World Health Organization, 2013.

CAPITULO

6

OTROS MÉTODOS DE LABORATORIO

1. Métodos para identificación de especies

Una vez se ha obtenido un cultivo positivo, ya sea en medios sólidos o líquidos, es muy importante identificar la especie exacta de micobacteria aislada. Como se mencionó en el capítulo I, todas las micobacterias tienen la característica de ser bacilo alcohol ácido resistente, por lo que lo primero que deberá realizarse antes de cualquier otro método de identificación será una baciloscopía(30). Una vez asegurado que el aislamiento es un bacilo alcohol ácido resistente, hay diversos métodos que se puede utilizar para identificar la especie exacta de micobacteria.

Tabla No.24
Clasificación de métodos usados para identificación de micobacterias

Métodos	Especies identificadas	Comentarios
Métodos fenotípicos	Todas las micobacterias de importancia clínica	Se basa en características como velocidad de crecimiento, producción de colonias pigmentadas y baterías bioquímicas. Debido al tiempo de respuesta y a la necesidad de personal altamente capacitado, estos métodos están actualmente en desuso.
Diferenciación de ácidos micólicos	Todas las micobacterias de importancia clínica	Se utiliza la técnica de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) para diferenciar los diferentes ácidos micólicos presentes en la pared. Reservado únicamente para investigación y su uso en salud pública es casi nulo
Métodos cromatográficos (Detección de antígenos)	*M. tuberculosis*	Permite la identificación de *M. tuberculosis* de manera rápida y con pocos requerimientos de equipo. Es el método actualmente más utilizado para asegurar que la cepa aislada es *M. tuberculosis*. No permite identificar el resto de micobacterias.
Métodos genotípicos (moleculares)	Todas las micobacterias de importancia clínica	Los métodos más comunes son los que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa y evalúan diferencias en el ADN ribosomal 16S. Existen varios métodos disponibles comercialmente utilizados por los laboratorios de referencia.

Fuente: Diagnosis, Treatment and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases Griffith et al., 2007.

1a. Detecciónde antígenos

Principio

Las pruebas disponibles actualmente en el mercado son ensayos de inmunocromatografía lateral, que detectan el Ag MPT64 o el Ag MPB64, ambos presentes únicamente en los miembros del complejo M. tuberculosis (32).

El formato es el mismo al utilizado por otras pruebas rápidas, como las pruebas de VIH, en el que se agrega la muestra a una tira de nitrocelulosa y se observa el resultado mediante la aparición de bandas de color. Esta es una prueba cualitativa que permite diferenciar el complejoM. tuberculosis (no diferencia entre especies del complejo) del resto de micobacterias (32).

En Guatemala, la prueba comercial más utilizada es la SD TB Ag MPT64 Rapid. Diversos estudios han demostrado que estas pruebas cuentan con una sensibilidad y especificidad > 95% (32).

Manejo de muestras

Esta prueba está diseñada para ser utilizada a partir de cepas aisladas de cultivo (método indirecto) (27).

Nivel de bioseguridad recomendado

Debido a que esta prueba se realiza a partir de cultivos positivos, la misma está reservada únicamente para laboratorios de riesgo moderado. Todo laboratorio que realiza identificación de micobacterias deberá cumplir los criterios descritos en la tablanúmero3 para este tipo de laboratorios (17).

Ventajas y desventajas

- Entre sus principales ventajas se encuentra la simplicidad de la técnica, no necesita equipo sofisticado y el precio.
- Su principal desventaja es que no permite identificar otras micobacterias diferentes al complejo M. tuberculosis (32).

Figura No.23
Interpretación para la prueba MPT64



Fuente: DiagnosticsTechnologyLandscapeUnitaid, 2017.

Recomendaciones sobre su uso

Se recomienda su utilización en toda muestra de cultivo positivo (cultivo puro) y al que la baciloscopíarealizada a partir de la cepa, evidencie la presencia de BAAR(31).

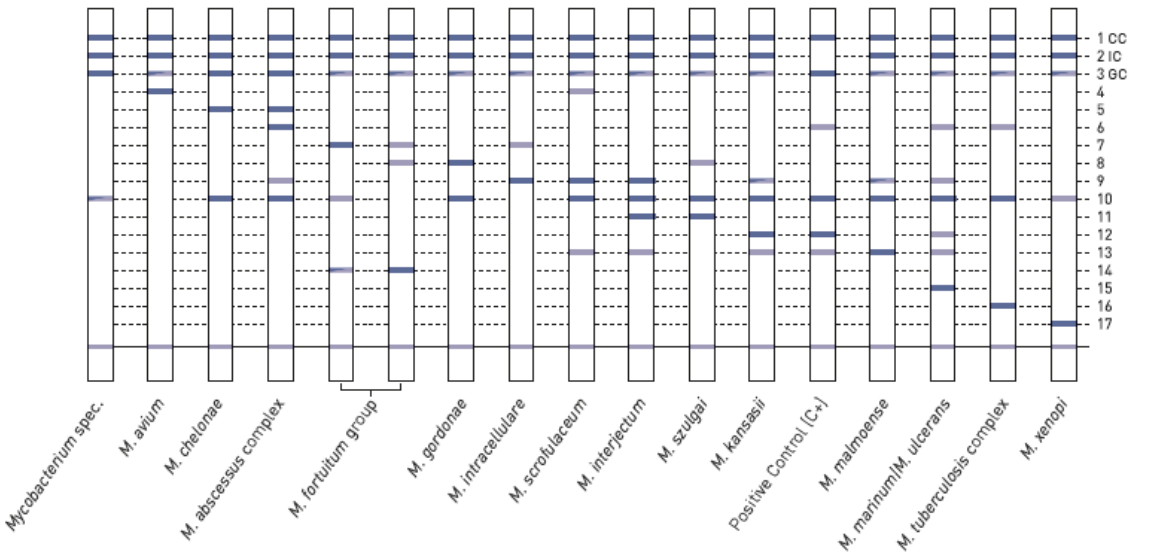
1b. Métodos moleculares.

Actualmente, existen diversos métodos comerciales disponibles para este fin, sin embargo, los distribuidos en la región son los producidos por la casa comercial Hain, por lo que en este manual únicamente serán descritos estos.

Genotype Mycobacterium CM/AS®

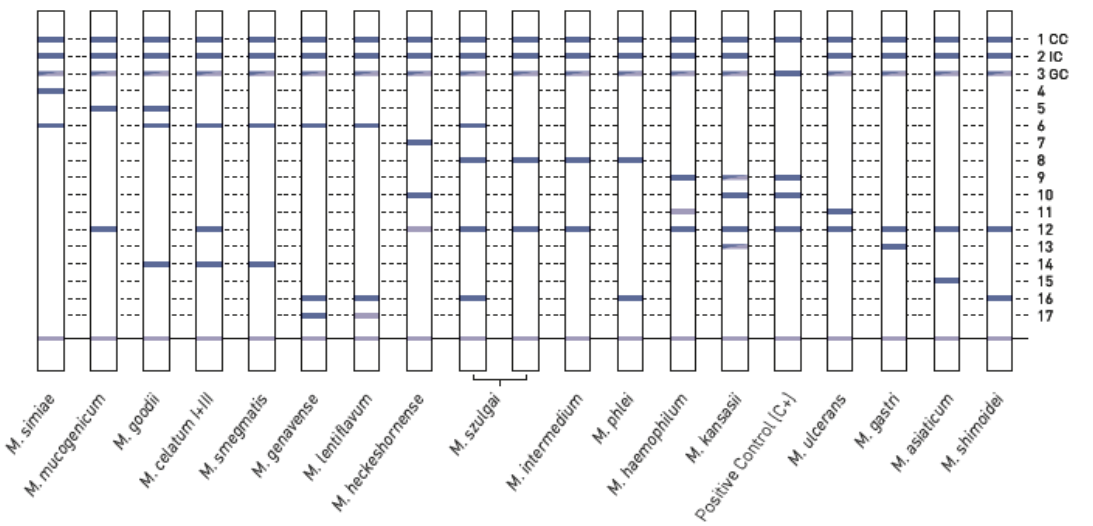
Estos métodos al igual que el descrito en el capítulo IVsobre pruebas de sensibilidad, son ensayos de hibridación en línea. Se basan en diferencias en el ADN que codifica para el ARN Ribosomal 16S y permiten la identificación de más de 30 especies de micobacterias de importancia clínica, a partir de aislamientos en cultivo. Consta de dos estuches comerciales, GenotypeMycobacterium CM 2.0 y GenotypeMycobacterium AS 1.0 (43).

Figura No.24
Esquema y especies detectadas por GenotypeMycobacterium CM 2.0



Fuente: Genotype Mycobacterium CM/AS ver 1.0 Hain-Lifescience, 2011.

Figura No. 25
Esquema y especies detectadas por GenotypeMycobacterium AS 1.0



Fuente: Genotype Mycobacterium CM/AS ver 1.0Hain-Lifescience, 2011.

Actualmente, estos métodos se realizan únicamente en los laboratorios de referencia nacional.

Manejo de muestras usadas

Estos métodos se realizan únicamente a partir de cepas aisladas en cultivo que sean BAAR y presenten una muestra de Ag MPT64 negativa, es decir, se tenga confirmado que es una micobacteria diferente a M. tuberculosis(31).

Nivel de bioseguridad recomendado

El uso de estos métodos ésta reservado para laboratorios de alto riesgo (17).

Ventajas y Desventajas

La principal ventaja de estos métodos es la amplia gama de especies que puede diferenciar en poco tiempo, sin embargo, son métodos altamente complejos que están reservados únicamente para laboratorios con personal altamente capacitado, siendo esta última su principal desventaja(43).

2. TB-LAM

Principio

La prueba de TB-LAM se basa en la detección del polisacárido lipoarabinomanano (LAM), el cual es un componente básico de la pared celular de la micobacteria. Este es liberado tanto en la replicación celular como en la degradación de la pared de la bacteria. Es importante destacar que esta molécula no es un componente específico de la pared deM. tuberculosis y está presente en todas las micobacterias ambientales (44).

El LAM es liberado a la sangre para su posterior excreción vía urinaria, por lo tanto, la muestra necesaria para la realización de la prueba es orina. La detección de LAM puede ser indicativo tanto de TB pulmonar como TB extrapulmonar. La principal aplicación de esta prueba es la detección de TB en pacientes VIH con severa inmunosupresión, ya que la sensibilidad de esta se ve afectada por los niveles de CD4. La OMS recomienda el uso de esta prueba como apoyo al diagnóstico en pacientes VIH con signos y síntomas de TB (pulmonar y extrapulmonar) que tengan recuentos de CD4 menor o igual a 100 cel./mm 3 (44).

Manejo de muestras usadas

Este tipo de ensayos utiliza muestras de orina sin procesar. La toma de muestra debe ser realizada siguiendo técnicas asépticas(44).

Bioseguridad

Debido a que la prueba se realiza a partir de orina, la probabilidad de generación de aerosoles es baja, por lo cual los niveles de bioseguridad es de un nivel bajo (44).

Ventajas y Desventajas

Entre sus principales ventajas destacan:

- Debido a que es una prueba rápida, el personal requiere una capacitación menor que en otras técnicas.
- Los requerimientos de equipo e infraestructura son menores.
- El tipo de muestra es poco invasiva y fácil de recolectar (44).

Dentro las desventajas podemos mencionar:

- La prueba por sí sola no es un método diagnóstico, debe ir acompañada de criterios clínicos de signos o síntomas.
- Un incremento de los CD4 reduce la sensibilidad de la prueba(44).

3. TB-LAMP

Principio

Es un método molecular, que a diferencia de los métodos en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), realiza la amplificación de ácidos nucleicos sin necesidad del uso de diferentes temperaturas (amplificación isotérmica). El método necesita infraestructura mínima y está diseñado para ser utilizado como una prueba en el punto de atención en laboratorios de nivel local, como una alternativa a la baciloscopía. Es importante tomar en cuenta que únicamente permite la detección de TBP en muestras de esputo, por lo que no puede ser usado en muestras extrapulmonares ni permite la detección de resistencia a ninguna droga, por lo que se debe evaluar su implementación considerando las ventajas que tienen otros métodos como el Xpert MTB/RIF® (45).

Manejo de muestras usadas

Utiliza muestras de esputo, siguiendo las mismas especificaciones que las muestras que se utilizan para baciloscopía (45).

4. Pruebas de detección de Interferón Gamma (IGRAS)

Principio

Estas técnicas miden la liberación de Interferón Gamma por parte de los linfocitos T al ser expuestos a antígenos específicos de M. tuberculosis (ESAT – 6, CFP-10 y TB7.7) mediante un inmunoensayo (EIA) en suero. El propósito de esta prueba es detectar tuberculosis latente, por lo que un resultado positivo, no es indicativo de tuberculosis activa (46).

Bioseguridad

Debido a que la prueba se realiza a partir de suero, la probabilidad de generación de aerosoleses baja. Se debe seguir las precauciones universales empleadas para el manejo de líquidos corporales (18,47).

Manejo de muestras usadas

Se utiliza sangre venosa recogida mediante técnicas asépticas. La mayoría de los ensayos comerciales requiere la recolección de muestras en tubos especiales provistos por el fabricante(47).

Ventajas

Entre sus principales ventajas destacan:

- No necesita de una segunda visita por parte del paciente, en comparación con la prueba de PPD.
- Más específica, ya que no tiene reacción cruzada con la BCG (46).

Desventajas

Dentro de las desventajas podemos mencionar:

- Se necesita equipo e infraestructura adecuada.
- Alto costo, motivo por el cual, la OMS no recomienda el reemplazo de PPD por IGRAS en países con recursos limitados (46).

CAPITULO

7

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE TB

1. Componentes de un sistema de gestión de calidad

El producto principal de todo laboratorio independientemente de su tipoes la información. Para asegurar el rendimiento apropiado de los laboratorios es importante implementar un sistema de gestión de calidad que permita mantener altos niveles de exactitud en los procedimientos realizados (27).

Diversas organizaciones internacionales tales como la OMS, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) y el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), recomiendan el uso de sistemas de gestión de calidad basados en 12 componentes interconectados, siendo estos (48).

Figura No.26
Elementos de un sistema de gestión de calidad



Fuente: Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio, Organización Mundial de la Salud, Clinical and Laboratory Standards Institute, & CDC, 2016.

2. Elementos esenciales de un sistema de gestión de calidad en los laboratorios de TB

Las actividades para el aseguramiento de la calidad deben verse como una parte integral de la rutina de trabajo y no como actividades separadas. Todas estas actividades deben documentarse y evidenciarse. Existen diversos componentes de los sistemas de gestión de calidad para laboratorios, sin embargo, existen actividades esenciales que todo laboratorio de TB debe cumplir, siendo estas:

1. Capacitación, entrenamiento y evaluación de competencia
2. Manejo de muestras
3. Documentación y registros
4. Mantenimiento de equipos
5. Control de calidadinterno
6. Evaluación externa de la calidad
7. Implementación de indicadores de calidad
8. Mejora continua de la calidad(27).

3. Entrenamiento y evaluación de competencias

La evaluación de la competencia se define como cualquier sistema para medir y documentar la competencia del personal. En el laboratorio de tuberculosis, la evaluación de la competencia busca identificar los problemas de rendimiento y corregir estos inconvenientes antes de que afecten los resultados de algún paciente (48).

Tabla No.25
Componentes básicos de una evaluación de la competencia

Elemento	Características
Fundamento teórico	Es necesario que las DAS con sus QB se organicen para reforzar al personal de laboratorios sobre el fundamento teórico de los procedimientos; se puede utilizar presentaciones magistrales o lecturas de manuales y documentos actualizados para alcanzar este conocimiento
Observación directa por su Químico Biólogo supervisor	Este permite identificar y evitar cualquier problema de rendimiento. • La técnica del personal se observa durante el proceso, lo que permite al supervisor verificar el seguimiento del procedimiento operativo estándar (POE). • Para evitar la subjetividad durante la evaluación de la competencia, se debe utilizar un listado de cumplimiento. La observación es la forma que más tiempo requiere para evaluar la competencia del empleado, pero este método está recomendado cuando se evalúan zonas que podrían tener una gran influencia en la asistencia al paciente.
Seguimiento de los registros	Además de los procedimientos teóricos, se debe verificar que el personal registre correctamente toda la documentación necesaria para el reporte y registro de los resultados y procesos de laboratorio.
Ensayos de aptitudanalítica	Idealmente se debe de complementar la prueba de aptitud mediante el uso de una prueba analítica, para esto se pueden utilizar los resultados de los paneles de competencia proporcionados por el Laboratorio Nacional de Salud.
Retroalimentación	Toda evaluación de competencia debe contar con una retroalimentación donde la persona evaluada conozca cuales son los aspectos a mejorar, una vez establecido esto último de manera clara se debe concertar una capacitación o en caso las correcciones verbales y eventualmente dar un seguimiento a estos puntos (48).

Fuente: Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio, Organización Mundial de la Salud, Clinical and Laboratory Standards Institute, & CDC, 2016.

4. Documentación y registros.

Todo laboratorio debe llevar un sistema eficiente de documentos y registros que permita dar trazabilidad a pacientes, muestras y resultados. La diferencia entre documentos y registros es que los primeros son utilizados para trasmitir información al personal de salud, mientras que los segundos son utilizados para dejar evidencia del trabajo realizado en el laboratorio(48).Entre los documentos mínimos recomendados para asegurar el buen desempeño del laboratorio en TB se encuentran:

1. Manual de bioseguridad, que incluya salud y seguridad ocupacional y control de infecciones.
2. Manual de Normas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis.
3. Manual de atención para el manejo del paciente con tuberculosis.
4. Manual de normas y procedimientos para la toma de muestras y su envío al Laboratorio Nacional de Salud.
5. Manual de Procedimientos Operativos Estandar, adecuado a las técnicas que realiza el laboratorio.
6. Manuales de equiposutilizados(48).

Por otro lado, se recomienda que los laboratorios mantengan como mínimo los siguientes registros:

1. Libro de registro de laboratorio de TB: Todo resultado positivo debe registrarse usando lapicero rojo. Las muestras con resultado negativo pueden anotarse con lapicero azul o negro (no ambos).
2. Formato de registro deXpert MTB/RIF®, cultivo y PSD (según el nivel de laboratorio y las técnicas utilizadas. (Anexos 2 y 3)
3. Bitácora de uso de equipos.
4. Formato de registro de accidentes laborales.
5. Archivo de personal que incluya.
    a. Copia de certificaciones que avalen la competencia.
    b. Curriculum Vitae
    c. Registros de saludocupacional
6. Solicitud de análisis de laboratorio, incluyendo
    a. Baciloscopía
    b. Xpert MTB/RIF®.
    c. Cultivo.
    d. PSD.
7. Registro de inventario de equipos
8. Registro de existencia de consumibles y reactivos
9. Formato de registro de temperaturas para regrigeradoras e incubadoras
10. Formato de reporte de resultados para las pruebas utilizadas.
11. Formato de rechazo de muestras.
12. Formato de envío y transporte de muestras.
13. Formato de estadísticasmensuales(31,48).

5. Mantenimiento de equipo

Cada laboratorio deberá crear un cronograma de mantenimiento preventivo y calibración (cuando aplique) para cada uno de los equipos utilizados. Los mantenimientos, tanto preventivos como correctivos, deberán ser llevados a cabo por personal calificado que presente las credenciales necesarias para cada equipo específico (32).

Todo equipo deberá contar con un archivo donde se lleve el registro de al menos, los siguientes parámetros:

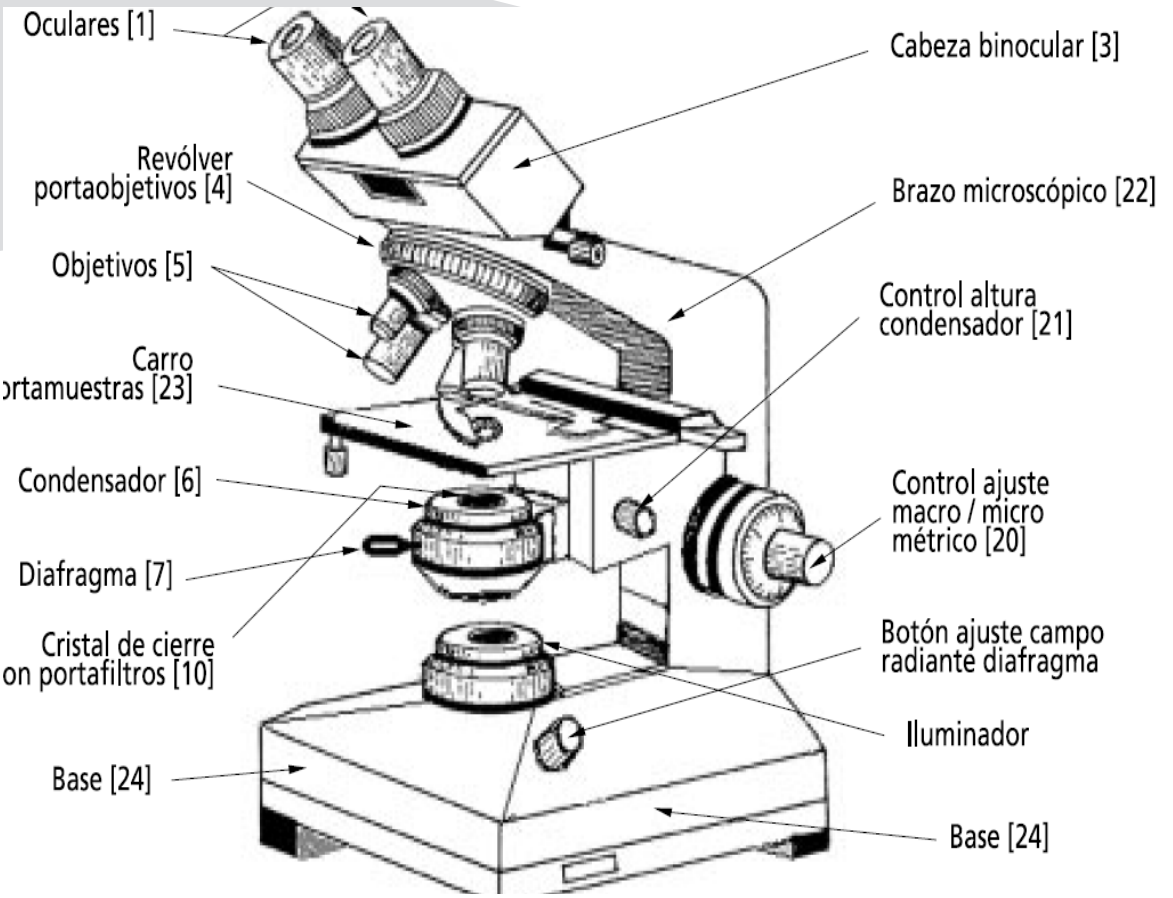
- Fecha de adquisición y número de inventario
- Manual del fabricante
- Historial de mantenimientos(48).

Además de los mantenimientos preventivos programados, es indispensable dar un uso adecuado a los equipos, incluyendo almacenamiento correcto y limpieza del mismo por el usuario(27). Los diferentes equipos tienen requerimientos específicos. A continuación, se hace una breve descripción del mantenimiento de microscopios, cabinas de bioseguridad, autoclaves, centrífugas y equipos para crear ambientes a temperaturas controladas, tales como incubadoras, refrigeradores y congeladores.

Microscopio

El microscopio es un instrumento de precisión conformado por subsistemas ópticos (lentes, filtros, prismas, condensadores); mecánicos (elementos para controlar la posición de la muestra en el espacio tridimensional X, Y, Z); eléctricos (transformadores y sistemas de iluminación) y electrónicos, que interactúan entre sí para amplificar y controlar la formación de imágenes de objetos de tamaño reducido, cuyas características no alcanzan a ser detectadas por el ojo humano.Existen diversos tipos de microscopio, sin embargo, como se mencionó en el capítulo III, en TB se utiliza el microscopio óptico de campo claro y el microscopio de fluorescencia (convencional o LED)(49).

Figura No.27
Esquema del microscopio óptico y sus principales componentes



Fuente: Maintenance Manual for Laboratory Equipment.World Health Organization, 2008.

Se recomienda realizarle una revisión general, limpieza y lubricación del sistema mecánico por un proveedor certificado, al menos dos veces al año (32), el cual como mínimo, deberá:

1. Verificar el ajuste de la plataforma mecánica. La misma debe desplazarse suavemente, en todas las direcciones (X-Y) y debe mantener la posición que selecciona o define el microscopista.
2. Comprobar el ajuste del mecanismo de enfoque. El enfoque que selecciona el microscopista debe mantenerse, no debe variar la altura asignada por el técnico de laboratorio.
3. Verificar el funcionamiento del diafragma.
4. Limpiar todos los componentes mecánicos.
5. Lubricar el microscopio de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
6. Confirmar el ajuste de la pinza.
7. Verificar el alineamientoóptico (49).

A continuación, se presentan recomendaciones generales para el mantenimiento óptimo de los microscopios.

1. El microscopio debe estar ubicado siempre en un ambiente seco (el moho puede crecer sobre las lentes), libre de polvo y sobre una superficie sin vibraciones.
2. No retirar las láminas sin levantar antes el revólver con el objetivo, para no rayar las lentes.
3. Si no está en uso, guardarlo en una caja con gel de sílice; cuando el gel cambie su color de celeste a rosa se ha humedecido, debe restaurar el gel de sílice calentándolo en estufa con atmósfera seca.
4. Limpiar con papel para lentes o pañuelos de papel suaves la óptica del microscopio. No utilizar solventes (alcohol, xileno, benceno, acetona) para limpiar los objetivos a menos que la suciedad sea resistente a la limpieza con papel. Estos solventes pueden disolver los pegamentos de las lentes y permitir que el aceite de inmersión penetre en ellas.
5. Al terminar las lecturas del día, cubrir el microscopio con su funda.
6. El mantenimiento debe ser realizado por personal técnico especializado. El mantenimiento preventivo debe ser programado para interferir lo mínimo posible con el trabajo de rutina, debe ser periódico, al menos anual. El correctivo (reparaciones y reemplazo de piezas dañadas del microscopio) es eventual (24,49) . Ver anexo número 11.

Cabinas de Bioseguridad (CBS)

Es un equipo diseñado para controlar los aerosoles y micropartículas asociados al manejo de material biológico potencialmente tóxico o infeccioso, que se generan en los laboratorios como resultado de actividades como la agitación, centrifugación, el uso y manejo de pipetas y la apertura de recipientes con presiones internas diferentes a la atmosférica. Las cabinas se han diseñado para proteger al usuario, al ambiente y la muestra con la que se trabaja (49).

Hay tres clases de CBS: I, II y III. Las CBS de la clase II pueden ser de diversos tipos, conocidos como A1, A2, B1, B2, dependiendo de las especificaciones técnicas de estas. Debido a sus características de funcionamiento y a las especificaciones de instalación y mantenimiento, en laboratorios de TB donde se requiera una CBS, se recomienda las CBS tipo II A2 (17).

Ubicación

En condiciones ideales, las CSB deben situarse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante en un lugar alejado del tránsito y de posibles corrientes de aire. Siempre que sea posible, debe dejarse un espacio de 30 cm por detrás y a cada lado de esta para permitir el acceso en caso de mantenimiento. Puede necesitarse un espacio de 30-35 cm por encima de la CSB para medir con exactitud la velocidad del aire a través del filtro de salida y para cambiar los filtros de salida (17).

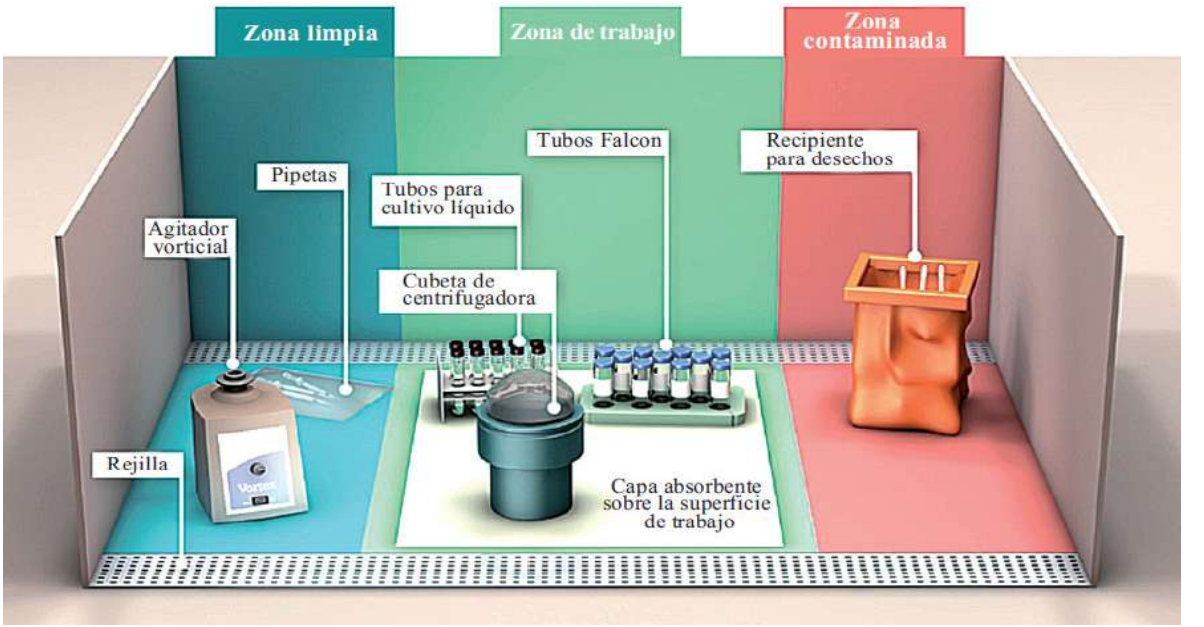
Operarios

Los operarios deben mantener la integridad del aire que circula a través de la abertura frontal cuando introducen y sacan los brazos en las cámaras. Deben mover los brazos lentamente yasegurarse de que los tienen situados perpendicularmente a la aberturacentral. Esperarán unos dos minutos después de introducir las manos y los brazos en la cámara antes de comenzar a manipular los materiales para permitir que el flujo de aire se estabilice. Todos los artículos necesarios deben colocarse dentro de la CSB antes de iniciar las manipulaciones (17).

Colocación del material

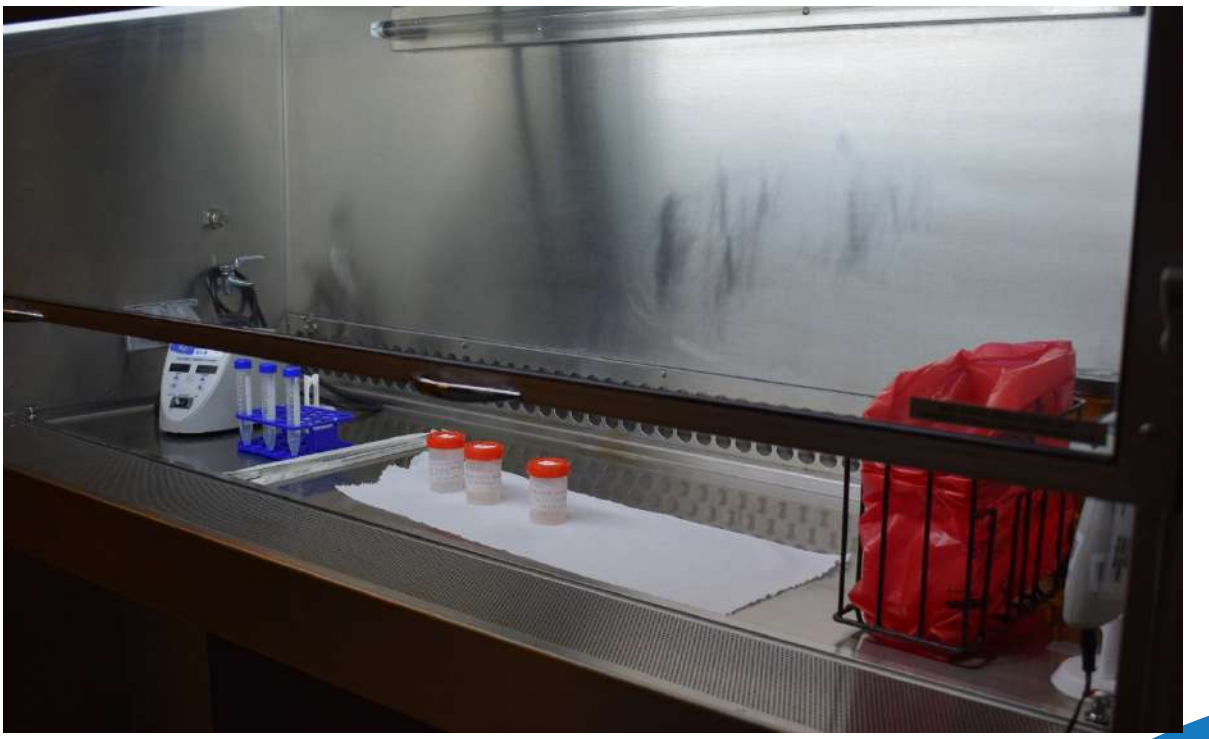
Todos los materiales deben colocarse lo más dentro posible, es decir, hacia el borde posterior de la superficie de trabajo, sin bloquear la rejilla posterior. El material que pueda generar aerosoles (como agitadores vórtex y centrifugadoras) debe situarse hacia el fondo de la cámara. Los artículos voluminosos, como las bolsas específicas para peligros biológicos y los recipientes de desecho, deben colocarse a un lado del interior. El trabajo debe proceder desde las zonas limpias hacia las zonas contaminadas sobre la superficie del trabajo. Nuncadebenintroducirse documentos dentro de la CBS, ni sobrecargarse la misma, ya que esta puede influir en la eficiencia del flujo de aire.

Figura No.28
Manejo de materiales dentro de la CBS



Fuente: Manual de bioseguridad en el laboratorio de Tuberculosis.Organización Mundial de la Salud, 2013.

Figura No.29
Colocación de material dentro de la CBS



Fuente: MSPAS,Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

No se recomienda el uso de luz ultravioleta debido a los altos requerimientos de mantenimiento de esta y al poco valor agregado que brinda. No se debe de utilizar mecheros u otro tipo de llamas dentro de la CBS ya que afectan la integridad del flujo de aire (17).

Limpieza y desinfección de zonas de trabajo

Una vez terminado el trabajo, todos los materialesque se encuentren dentro de la CBS, incluido elequipo, deben ser objeto de una limpieza desuperficies y extraerse de la cámara.Las superficies interiores de las CSB deben descontaminarse antes y después de cadauso. Las superficies de trabajo y las paredesinteriores se limpiarán con un desinfectanteque inactive los microorganismos que pudieranencontrarse en el interior.

La descontaminación final de superficies de la jornada serealizará pasando un paño con desinfectantepor la superficie de trabajo y por los laterales, laparte trasera y el interior del cristal. Habrá querealizar una segunda limpieza con agua estérilcuando se emplee un desinfectante corrosivo como cloro.Antes de apagarla, la CSB debe dejarse enfuncionamiento durante 15 minutos despuésde terminar el trabajo con el fin de purgar laatmósfera de su interior (17).

Certificación

El funcionamiento y la integridad de cada CBS deben estar certificados en consonancia con las normas de funcionamiento nacionales o internacionales en el momento de la instalación, después de cada cambio de ubicación en el laboratorio y después de forma periódica (al menos una vez al año) por técnicos cualificados y de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La evaluación de la eficacia de contención de la CBS debe incluir: pruebas de la integridad de la cámara; pruebas de la integridad de los filtros HEPA; evaluaciones del perfil de velocidad del flujo de aire descendente, la velocidad del aire en la apertura de la cámara, la presión negativa y la tasa de ventilación, las características del flujo de aire y las alarmas e interruptores de interbloqueo. Se recomienda consultar la norma NSF/ANSI 49 -2008 para más detalle sobre los criterios a cumplir para la certificación de CBS(50).

Autoclaves

En general, lo más eficiente para esterilizar instrumentos, material de vidrio y soluciones de medios en los laboratorios de tuberculosis que realizan pruebas de diagnóstico es una autoclaveque utiliza vapor saturado a presión. También se utiliza para descontaminar material biológico(como cultivos de micobacterias). Para que unaautoclave funcione de manera óptima hay dosfactores esenciales: 1) todo el aire en la cámaradebe ser sustituido por vapor, y 2) la temperaturadebe ser de 121 ˚C.Las autoclaves deben situarse lejos de la zonaprincipal del trabajo del laboratorio porque puedenser ruidosas y emitir calor y vapor. Es obligatorio contar conuna autoclave en todos los laboratorios dondese realicen cultivos de M. tuberculosis y situarlapreferiblemente en el laboratorio de contención detuberculosis.En todo momento se seguirán las instruccionesdel fabricante en cuanto al manejo y la limpiezade la autoclave (17).

Se recomienda que un técnico especializado en estos equipos le de mantenimiento preventivo 2 veces al año (32).

Centrífugas

En el proceso de centrifugado pueden producirse aerosoles, de modo que las medidas de seguridad deben seguirse estrictamente cuando se maneja la centrifugadora.Durante el funcionamiento, la tapa de lacentrifuga debe estar completamentecerrada, el uso de un sello no poroso amplioasegurará que la tapa queda herméticamentecerrada, la tapa no se abrirá hasta que el rotorse haya detenido por completo. Los rotoresapropiados tienen cierres de seguridad paracada compartimento. Las tapas de cada cubeta ycada tubo deben cerrarse debidamente antes deponer en marcha la centrifugadora. Para contenerlos aerosoles, cada cubeta de centrifugadora sellada debe cargarse y descargarse en una CBD. Para el tratamiento de cultivos de M.tuberculosis, se recomiendan las centrifugadoras refrigeradas con cubetas oscilantes. Cuando se utiliza una microcentrífuga para la extracción de ADN, se necesita un rotor de seguridad con una tapadera sellada; la microcentrífuga debe cargarse y descargarse en el interior de una CBS (17).El mantenimiento preventivo ofrecido por técnicos especialistas debe realizarse al menos 2 veces al año y se deberá realizar calibración de velocidad, cronómetro, hermeticidad y temperatura (32).

Incubadoras, refrigeradoras y congeladores

El uso de estos equipos requiere el monitoreo de la temperatura preestablecida al menos 2 veces al día, preferentemente al iniciar y finalizar la jornada laboral (32). A nivel del usuario, los principales cuidados que deben brindarse a estos equipos son asegurar un suministro continuo de energía eléctrica de buena calidad, así como velar por la limpieza del mismo y en el caso de refrigeradores, evitar la formación de escarcha (49). Se recomienda realizar mantenimiento preventivo por técnico especialista en estos equipos al menos 2 veces al año (32).

6. Control de calidad interno

El objetivo de la implementación de controles de calidad internos esdetectar, evaluar y corregir errores debido a fallas en cada una de las fases del procesamiento de pruebas; ya sea debido al operador, al medio ambiente o al equipo, antes de liberar los resultados del paciente (27).

6a. Control de Calidad de Baciloscopías

Todo laboratorio que realice baciloscopías deberá realizar controles internos en forma regular y sistemática yanotar los mismos en el libro de laboratorio de TB. Idealmente se realizará controles negativos, positivos bajos (bacilos contables a 1+) y positivos altos (2+ó 3+), una vez al mes o cada vez que se inicie un nuevo set de colorantes (lo que se dé primero) (29). Con el objetivo de implementar un programa de controles internos, se deben seguir los siguientes pasos:

- De la rutina de trabajo seleccionar muestras positivas y negativas y tratarlas con 10 gotas de fenol al 5% durante media hora. Preparar con ellas tantos extendidos como sean necesarios para que puedan ser utilizados durante 6 meses. Si no se reciben suficientes muestras positivas solicitar los extendidos al laboratorio de referenciaya sea laboratorio de área o al LNS, guardarlos en cajas con separaciones diseñadas para guardar extendidos o dentro de una caja envuelta en papel, en un lugar seco y libre de polvo.
- Controlar la calidad de cada nuevo lote de colorantes tiñendo una lámina negativa y otra positiva. Registrar el resultado de este control en el libro rojo de laboratorio.
- Comprobar que los BAAR se vean completa e intensamente coloreados con fucsina o auramina y que la coloración de fondo sea uniforme, del color esperado y que ofrezca buen contraste.
- Si en los extendidos positivos no se detectan BAAR o los BAAR están mal teñidos, puede ser que la fucsina o la auraminaestén defectuosaso que hubo errores en la técnica de coloración (tiempo insuficiente de fuscsina, calentamiento inadecuado, etc.).
- Si se observa una coloración de fondo violácea con la tinción de ZiehlNeelsen, el decolorante o el colorante de fondo pueden estar defectuosos o se pueden haber dejado menos tiempo del indicado.
- Si se observan aparentes BAAR en el extendido negativo, puede ser que el Verificar si la cuantificación de bacilos coincide con la inicialmente asignada a la muestra con la que se prepararon los extendidos positivos.
- Registrar los resultados de estos controles de calidad en el libro de laboratorio de TB.
- Si se detectan defectos, repetir el control con otros extendidos para descartar un posible error en la técnica de tinción. Si persiste el defecto, trasladar los reactivos defectuosos o contaminados al proveedor para que realice las evaluaciones respectivas y tramite el cambio si aplica e informar por escrito al LNS y dirección de área de salud.
- Si se realizan menos de 10 baciloscopías por día se deben incluir los frotis positivo y negativo como control interno por lo menos 2 veces por semana (24).

6b. Control de calidad de cultivos

Se debe realizar controles a los medios de cultivopreparados por el laboratorio, adquiridos comercialmente y cuando sonproporcionados por un laboratorio de referencia(30).

Se deben controlar las siguientes características:

- Color: tubos de un mismo lote que presentan distinta intensidad de verde 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. En el caso de los caldos, verificar la ausencia de cualquier tipo de turbidez.
- 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.
- Homogeneidad: si se evitó la formación de burbujas al dispensar y aparecen luego de coagular, es posible que el medio haya estado sometido a temperatura excesiva y por lo tanto haya perdido calidad. Si se formangrumoses indicador de mala homogenización.
- Esterilidad:incubar 2 o 3 tubos del lote nuevo a 37°C por 48 horas yno debe evidenciarse ningún crecimiento después de este tiempo.
- Sensibilidad: preparar una solución con cepa de M. tuberculosis con una turbidez igual al estándar deMcFarland 1.0. Realizar diluciones seriadas de orden 10, hasta obtener diluciones iguales a 1/10,000 (-4) y 1/100,000 (-5). Inocular 0.2 ml de ambas diluciones en 5 tubos LJ, incubar por 5 semanas. Se debe observar un crecimiento homogéneo al comparar ambas diluciones en escala logarítmica. Ej. Si la dilución -5 presentó 15 colonias (log base 10 = 2), el tubo -4 debe presentar un crecimiento cercano a 150 colonias (log base 10 = 3). Tomar en cuenta que números entre 100 y 999 se encuentran en el log base 10 = 3. Esta técnica debe emplearse en los laboratorios que cuentan con cabinas certificadas o validadas, cepas validadas y personal competente para realizar la técnica; si el medio de cultivo evidencia algún problema (contaminación, no presenta crecimiento, etc.) puede solicitar una evaluación extraordinaria al laboratorio de referencia (30).

También se debe controlar el procedimiento de descontaminación, homogenización e inoculación de medios. Se recomienda sembrar sistemáticamente una muestra de la que se haya obtenido baciloscopía positiva de un paciente nuevo, aunque no haya necesidad clínica del cultivo. Con esto se podrá evidenciar si se está recuperando los bacilos de buena forma durante la descontaminación e inoculación. Se recomienda hacer este procedimiento al menos una vez al mes (30).

6c. Control de calidad de pruebas de sensibilidad

Cada lote de medio sólido que se prepare o que se adquiera comercialmente debe ser controlado mediante la realización de PSD con una cepa de M. tuberculosis. Es posible emplear cepas que sean resistentes a más de un antibiótico para simplificar el procedimiento, pero para disminuir el riesgo biológico, no deben emplearse aislamientos de M. tuberculosis MDR o XDR. Idealmente, las cepas para realizar estos controles deberán ser las provenientes de las evaluaciones externas de la calidad de evaluaciones previas (ver más adelante), ya que son cepas caracterizadas por laboratorios supranacionales(38). Para una descripción más detallada del control de calidad interno para PSD, consultar la GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. Parte 3 Pruebas de Sensibilidad, publicada por el Organismo Andino de Salud y la OPS.

7. Evaluación externa de la calidad

La evaluación es un aspecto primordial de la gestión de la calidad en el laboratorio y se puede llevar a cabo de varias formas. Uno de los métodos de evaluación que se utilizan frecuentemente es el de la evaluación externa de la calidad (EEC). El término EEC se utiliza para describir un método que permite comparar los análisis de un laboratorio con una fuente externa al laboratorio. Esta comparación puede realizarse con respecto al rendimiento de un grupo de laboratorios externos o al rendimiento de un laboratorio central (48).

Algunos métodos o procesos de la EEC son de uso habitual. Entre ellos se encuentran:

- Ensayos de aptitud analítica: un proveedor externo envía muestras desconocidas para su análisis a un grupo de laboratorios y los resultados se analizan, comparan y notifican a los laboratorios participantes.
- Relectura o segunda comprobación: un laboratorio externo comprueba los resultados del laboratorio evaluado, lo que permite una comparación inter-laboratorio.
- Supervisión por parte de personal experto en el tema: normalmente se realiza cuando es difícil llevar a cabo un ensayo de aptitud analítica tradicional o utilizar el método de segunda comprobación/segundo análisis (48).

Evaluación externa de la calidad para Baciloscopía

La evaluación externa de la calidad para baciloscopía puede efectuarse mediante dos metodologías: relectura o paneles de competencia.

a. Relectura o método indirecto

Lectura de las láminas de rutina enviadas desde el laboratorio de las unidades de salud al laboratorio supervisor; este método permite evaluar la calidad de la lectura cualitativa y cuantitativa, la calidad de la muestra, extendido y coloración de las láminas efectuadas en los laboratorios en su trabajo de rutina (24).

Almacenamiento

- Todas las láminas deben ser conservadas mensualmente en dos cajas especiales una para las positivas y otras para las negativas, las cuales se envían a supervisión indirecta cuando el laboratorio supervisor las solicite. Se mandarán todas las láminas positivas y negativas realizadas durante el messolicitado, si un mes no supera las 20 láminas deberán enviarse dos o más meses. El control se repetirá tres veces al año, según solicitud del laboratorio supervisor y sin aviso previo.
- Para conservar las láminas, remover suavemente el exceso de aceite de inmersión colocando las láminas sobre papel absorbente sin frotarlas, envolver separadas una de otra cuidando que se mantenga la identificación.
- Preparar el listado de láminas positivas a enviar junto con su respectivo resultado y las observaciones que quiera especificar, recordar que las láminas negativas no se listan en el formato(Anexo 8. Informe de láminas enviadas para supervisión indirecta. Control de Calidad).
- Las láminas se conservan hasta un año; si durante ese tiempo no han sido solicitadas por el laboratorio supervisor se procede a eliminar las positivas como material infeccioso punzocortante y las negativas pueden lavarse para usarse en otra área, descarte las láminas que se encuentren rayadas (22).

Revisión

- El laboratorio supervisor revisará el 100% de las positivas y el 10% de las negativas, se debe revisar como mínimo 20 láminas por control.
- Se evaluará la concordancia diagnóstica cualitativa (falsos positivos o negativos) y cuantitativa (número de cruces), la calidad del extendido y la coloración de las mismas (22).

Tabla No.26
Resultados EEC para Baciloscopía

Resultado del laboratorio evaluado	Resultado del laboratorio supervisor				
	Negativo	1 a 9 BAAR	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+++)
Negativo	Concordancia	FN	FN	FN	FN
1 a 9 BAAR	FP	Concordancia	Concordancia	DC	DC
Positivo (+)	FP	Concordancia	Concordancia	Concordancia	DC
Positivo (++)	FP	DC	Concordancia	Concordancia	Concordancia
Positivo (+++)	FP	DC	DC	Concordancia	Concordancia

Fuente: Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis, MSPAS, Guatemala, 2008.

FP (falso positivo), FN (falso negativo)

DC (discordancia cuantitativa): diferencia del recuento de al menos dos niveles de cruces

El laboratorio supervisor enviará el informe al laboratorio supervisado lo antes posible; se calificaráa los laboratorios de la siguiente manera:

- **Laboratorio con excelencia diagnóstica:** laboratorio que ha participado en los 3 controles de calidad y que tiene ≥95% de concordancia diagnóstica.
- **Laboratorio aceptable:** laboratorio que ha participado por lo menos en un control de calidad y que tiene ≥90% de concordancia diagnóstica
- **Laboratorio no aceptable:** laboratorio que no ha participado en el control de calidad o que tiene menos del 90% de concordancia diagnóstica.

b. Relectura por Método de Lotes

Además del método de elegir el 100% de las positivas y el 10% de las negativas, existe el muestreo por lotes denominado LQAS (de las siglas en ingles Lot Quality Assurance Sampling), el cual consiste en elegir un número determinado de láminas en secuencia (sin separar si son positivas o negativas), la elección del número de láminas se realiza en base al porcentaje de láminas positivas que maneje el laboratorio de la unidad de salud.

En Guatemala se tiene planificado implementar esta metodología a partir del año 2021, iniciando con los laboratorios revisores locales que refieren sus láminas a nivel central (51).

c. Envío de láminas preparadas o panel de pro eficiencia

Esta técnica consiste en la lectura de láminas previamente preparadas desde el laboratorio supervisor a través de suspensiones bacilares de concentraciones predeterminadas. Esta técnica evalúa la capacidad de lectura del microscopista con las láminas coloreadas y la técnica de la coloración con los extendidos sin colorear(52).

El laboratorio supervisor prepara y envía el panel de laminillas a los laboratorios supervisados. El panel consiste en 10 láminas, de la cuales 5 están teñidas y 5 se envían sin teñir, con diferente grado de positividad y algunas negativas. De acuerdo con el reporte que realicen los laboratorios supervisados, enviaran sus resultados al LNS y se definirá el estatus de cada uno de los participantes. Se calificará como laboratorio aceptable al que mantiene una concordancia diagnóstica arriba del 90% y lo califica por dos años (52).

Este método es útil para tener datos de la calidad de la lectura, suplementar el control de calidad externo, evaluar técnicos después de un entrenamiento y mantener la habilidad de reconocer bacilos en aquellos laboratorios que manejan pocas muestras(51).

Evaluación Externa de la Calidad para medios de Cultivo

La evaluación de la calidad del cultivo recae en dos metodologías, el monitoreo de un conjunto de indicadores internos asociados al procedimiento del cultivo y la evaluación externa de la calidad del medio de cultivo, realizados ambos por el LNS(30,31).

Indicadores internos

Los siguientes son los indicadores de desempeño recomendados que deben complementar la evaluación de la calidad del cultivo:

- Aporte del cultivo para el diagnóstico de TB
- Porcentaje de tuboscontaminados(30)

Calidad del medio de cultivo

La evaluación de la calidad de los medios de cultivo sólido es necesaria tanto cuando se prepara el medio en el propio laboratorio como cuando es adquirido a una firma comercial. Mediante esta metodología se evalúan el aspecto (color, consistencia, textura), la sensibilidad y la esterilidad del medio de cultivo elaborado/adquirido. Esta evaluación la realizará el LNS a todos los laboratorios de la red que realicen cultivos(31).

Evaluación externa de la calidad para el Xpert MTB/RIF®

Consiste en la preparación de paneles a partir de cepas tipificadas, las cuales se toman en alícuotas y se sirven en crioviales con una codificación, cada panel está conformado por cinco crioviales, los cuales se entregan a cada laboratorio con las instrucciones para el procesado y registro del panel (31).

Reporte

Para el informe de los resultados, al laboratorio supervisado se le solicita que reporte el resultado general que emite el equipo y la cantidad de ADN de acuerdo con los ciclos de detección del equipo(31).

Tabla No. 27
Reporte de los resultados de panel de competencia para Xpert MTB/RIF®

Resultado del equipo	Cantidad de ADN
T: MTB Detected Rif Resistance Not Detected	Alta: positivo en menos de 16 ciclos
RR: MTB Detected Rif Resistance Detected	Media: positivo en los 16 a 22 ciclos
TI: MTB Detected Rif Resistance Indeterminate	Baja: positivo entre los 23 a 28 ciclos
I: Invalid	Muy baja: positivo después de 28 ciclos

Fuente: GLI Practical Guide to TB Laboratory Strengthening World Health Organization, 2017.

Se calificará como laboratorio aceptable al que mantiene una concordancia diagnóstica arriba del 80%(31).

Evaluación externa de la calidad para Prueba de Sensibilidad

Consiste en el envío anual de un panel de cepas caracterizadas fenotípica y genéticamente, las cuales son resiembras de cepas provenientes del panel que la OMS aplica anualmente a los laboratorios Supra Nacionales, con diferentes patrones de sensibilidad y resistencia; en ocasiones dentro del panel se reciben patrones duplicados. Los resultados para cada antibiótico se calculan la sensibilidad, especificidad, eficiencia y reproducibilidad(53).

Para drogas de primera línea, los criterios para considerar que un laboratorio tiene calidad aceptable es obtener una eficiencia > 95% para rifampicina y >89% para isoniacida(53).

8. Indicadores de calidad

El monitoreo sistemático de indicadores de calidad permite asegurar el desempeño correcto de todas las técnicas empleadas (27). Se recomienda monitorear y analizar como mínimo los siguientes indicadores y enviarlos trimestralmente a los supervisores de la red de laboratorios del PTB y al LNS (31).

Tabla No.28
Indicadores de calidad recomendados para los laboratorios de TB

Tipo de indicador	Indicador	Resultado aceptable*	Temporalidad recomendada de medición
General	Número de pruebas realizadas, por tipo de prueba.	No aplica	Mensual
General	Interrupción de servicios por cada prueba debido a desabastecimiento.	Sin interrupciones en último trimestre.	Trimestral
General	Interrupción de servicios por cada prueba debido a fallas en equipo.	Sin interrupciones en último trimestre.	Trimestral
General	Tiempo de respuesta.	BK y Xpert MTB/RIF® = 24-48 hrs. Cultivo LJ positivo: 3-5 semanas, Cultivo LJ negativo 8 semanas	Semestral
General	Resultados de Evaluación externa.	Resultado de última EEC (panel o relectura) satisfactorio	Anual
General	Resultados de Controlesinternos.	> 90% de controles internos con resultados esperados	Mensual
General	Rechazo de muestras	< 1%	Mensual
Baciloscopía	% de muestras de diagnóstico inadecuadas	< 25%	Mensual
Baciloscopía	% de BK(+) para muestras de diagnóstico	Aproximadamente 10%	Trimestral

Tipo de indicador	Indicador	Resultado aceptable*	Temporalidad recomendada de medición
Baciloscopía	Proporción de BK(+) de baja positividad (contables y 1+)	30 – 50 %	Trimestral
Cultivo	Número y % de Cultivos positivos(*M. tuberculosis* y otras micobacterias)	15 – 20%	Semestral
Cultivo	Número y % de cultivos positivos para *M. tuberculosis*	10 – 15%	Semestral
Cultivo	Número y proporción de muestras de diagnóstico BK (+) que fueron cultivo positivo para *M. tuberculosis*	85 – 90% LJ. 95 – 98% MGIT.	Semestral
Cultivo	Número y proporción de muestras de diagnóstico BK negativo que fueron cultivo positivo para *M. tuberculosis*	20 – 30%	Semestral
Cultivo	Número y proporción de tubos contaminados	3 – 5% LJ. 8 – 10% MGIT	Semestral
Xpert MTB/ RIF®	Proporción de resultados MTB detectado, resistencia a rifampicina no detectado	No aplica	Mensual
Xpert MTB/ RIF®	Proporción de resultados MTB detectado, resistencia a rifampicina detectado	No aplica	Mensual
Xpert MTB/ RIF®	Proporción de resultados MTB detectado, resistencia a rifampicina indeterminado	No aplica	Mensual
Xpert MTB/ RIF®	Proporción de resultados MTB no detectado	No aplica	Mensual
Xpert MTB/ RIF®	Proporción de resultados con error	<1%	Mensual
Xpert MTB/ RIF®	Proporción de Resultados inválidos	<1%	Mensual
Xpert MTB/ RIF®	Proporción de pruebas sin resultado	<1%	Mensual
PSD	Número y proporción de pacientes con resistencia, desglosado por droga y combinaciones de droga	No Aplica	Semestral
PSD	Número y proporción de pacientes con pruebas contaminadas	<3%	Semestral
PSD	Número y proporción de pacientes con pruebas sin crecimiento	<3%	Semestral

Fuente: GLI Practical Guide to TB Laboratory Strengthening World Health Organization, 2017.

9. Mejora continua de la calidad

La mejora continua de procesos establece las bases para ayudar a garantizar la mejora continua de la calidad del laboratorio a lo largo del tiempo. Esta mejora continua de los procesos del laboratorio es esencial en un sistema de gestión de la calidad (27).

El ciclo de Deming: planificar, hacer, comprobar y actuar muestra cómo conseguir la mejora continua en cualquier proceso.

- Planificar: identifica los problemas y las posibles fuentes de debilidad o error, a partir de esto se deciden qué pasos se debe seguir para recoger información y elaborar un plan de mejora.
- Hacer: implica la ejecución del plan de mejora que haya elaborado e iniciarlo.
- Comprobar: se refiere al proceso de seguimiento, cuando se realiza una acción se debe evaluar la eficacia de esa implementación, para esto puede apoyarse en el uso de indicadores.
- Actuar: aplica cualquier acción correctiva necesaria y continuar comprobando paraasegurarse de que la solución ha funcionado (27).

GLOSARIO

AGREE: Es una herramienta que evalúa el rigor metodológico y la transparencia con la cual se elabora una guía.

BAAR (Baciloácido-alcohol resistente): propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared fucsina fenicada o auramina y retenerla aún con la acción de decolorantes.

Baciloscopía (BK): examen microscópico que permite la identificación de BAAR

a partir de una muestra biológica.

Bioseguridad: principios, técnicas y prácticas aplicadas con el fin de evitar la exposición no intencional a patógenos y toxinas o su liberación accidental.

BPM (Buenas Prácticas Microbiológicas): prácticas y procedimientos para disminuir el riesgo de infección por microorganismos dentro del laboratorio.

Brain Heart Infusion (BHI): es un medio de crecimiento para el crecimiento de microorganismos, rico en nutrientes y, por lo tanto, se puede utilizar para cultivar una variedad de organismos exigentes.

Campo útil: campo en el que se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células ciliadas).

Caso bacteriológicamente confirmado: persona con una muestra biológica positiva por baciloscopía, cultivo o ensayos de detección de ácidos nucleicos.

Caso clínicamente diagnosticado: caso que no cumple con los criterios para la confirmación bacteriológica, pero ha sido diagnosticado con TB activa por el proveedor de salud, quien ha decidido dar al paciente un ciclo completo de tratamiento de TB.

EPP (Equipo de Protección Personal): elementos de uso individual destinados a dar protección al trabajador frente a eventuales riesgos que puedan afectar su integridad durante el desarrollo de sus labores.

Fracaso al tratamiento: persona con TB cuya baciloscopía o cultivo de esputo es positivo en el quinto mes o posterior a este durante el tratamiento.

LPA: ensayo de hibridación en tira, test de detección de ácidos nucleicos para la detección rápida de mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos.

NIOSH: Instituto Nacional para la Salud y Seguridad Ocupacional, es la agencia federal estadunidense encargada de hacer investigaciones y recomendaciones para la prevención de enfermedades y lesiones relacionadas con el trabajo.

Paciente antes tratado: persona que ha recibido un mes o más de los fármacos anti-TB en el pasado. Se clasifican además por los resultados de su más reciente ciclo de tratamiento.

Paciente nuevo: Persona que nunca ha sido tratado por TB o que ha recibido tratamiento anti-TB por menos de un mes.

Paciente en pérdida en el seguimiento: paciente con TB que no inicio tratamiento o interrumpió el tratamiento durante un mes o más.

Prueba de ajuste: se realiza para asegurar que una persona que utiliza un respirador de partículas realmente está protegida contra la inhalación de micronúcleos de gotitas infecciosas.

Prueba de susceptibilidad a drogas (PSD): método capaz de determinar la inhibición in vitro de un microorganismo ante una determinada concentración de un agente antimicrobiano.

RAH (Recambios de aire por hora): proporción del volumen de aire que corre dentro de una sala, en un periodo de tiempo (tasa de flujo de aire) con respecto al volumen de dicho espacio (volumen total de la sala). Generalmente se expresa esta proporción como el número de recambios de aire por hora.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): técnica que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN específico.

Recaída: persona que ha sido previamente tratada por TB, fue declarada curada o tratamiento completo al final de su último ciclo de tratamiento y ahora es diagnosticada con un episodio recurrente de TB.

Sintomático respiratorio (SR): persona con tos y expectoración de más de 15 días.

Tuberculosis (TB): Enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial, causada por Mycobacterium tuberculosis.

Tuberculosis latente: paciente sin signos o síntomas que se ha demostrado estar infectado con Mycobacterium tuberculosis.

Tuberculosis Drogorresistente: cepa de Mycobacterium tuberculosis que ha desarrollado mutaciones en genes específicos que les confieren resistencia a drogas.

Tuberculosos Multidrogorresistente: cepa de Mycobacterium tuberculosis con resistencia simultánea al menos a Isoniacida (H) y Rifampicina (R).

Tuberculosis Resistente a Rifampicina: cepa de Mycobacterium tuberculosis con resistencia a rifampicina (R).

Tuberculosis Extensamente Resistente: cepa de Mycobacterium tuberculosis que además de ser resistente a H y R, cuenta con resistencia simultánea a una quinolona y un medicamento inyectable del régimen de segunda línea.

Virulencia: grado de patogenicidad de un organismo. Está relacionado con la gravedad de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Farga V, Caminero JA. Tuberculosis. 3ra Ed. Marín M, editor. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo Ltda.; 2011. 484 p.

2. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson M, Salfinger M, et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2018;31(2):1–66.

3. Varaine F, Rich ML. Tuberculosis. Practical guide for clinicians, nurses, laboratory technicians and medical auxiliaries. 2014 editi. Grouzard V, editor. Paris: Médecins Sans Frontière, Partners In Health; 2014. 305 p.

4. Griffith DE, Aksamit T, Brown-elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. American Thoracic Society Documents An Official ATS / IDSA Statement : Diagnosis , Treatment , and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175:364–416.

5. Agencia Española de Cooperación Internacional, Organización Panamericana de la Salud. Capacitación para la gestión de las redes de laboratorio en los programas nacionales de control de la tuberculosis. Washington, D.C.: OPS; 2007. p. 350.

6. Heemskerk D, Caws M, Marais B, Farrar J. Tuberculosis in Adults and Children. London: Springer, Cham; 2015. 71 p.

7. Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. First edit. Antwerp, Sao Paulo, Buenos Aires; 2007. 687 p.

8. Organización Panamericana de la Salud. Coinfección TB/VIH Guía Clínica Regional. Actualización 2017. 2da ed. Washington, D.C.: OPS; 2017. 122 p.

9. World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO Press; 2014. 462 p.

10. Union Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. Lineamientos para el Manejo Clínico y Operativo de la Tuberculosis Drogorresistente. Edith Alar. Caminero JA, editor. Paris: La Union; 2013. 278 p.

11. Organización Mundial de la Salud. Definiciones y marco de trabajo para la notificación de Tuberculosis – Revisión 2013 (actualizado en diciembre de 2014). Ginebra: Ediciones de la OMS; 2014. p. 47.

12. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva; 2017.

13. Ramírez L, Meléndez P, Samayoa M, Ayala N, Abdo J, Lorenzana R. Plan de Implementación Técnica de Fluorescencia con Microscopia. CD de Guatemala: MSPAS, PNT; 2017. p. 26.

14. World Health Organization. The End TB Strategy. Geneva; 2015.

15. World Health Organization. Implementing tuberculosis diagnostics: A policy framework [Internet]. World Health Organization. Geneva; 2015. Available from: www.who.int/tb%0Ahttp://www.who.int/tb/publications/implementing_TB_diagnostics/en/

16. John Snow Inc. Diagnóstico de la red y sitemas de laboratorio en Guatemala. Junio 2017. Guatemala; 2017.

17. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio de Tuberculosis. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2013. p. 65.

18. Public Health Agency of Canada. Canadian Biosafety Handbook. Ottawa: Government of Canada; 2016. p. 346.

19. Favi M, Jimenez M, Martinez C, Olivares B, Ramirez V, Scappaticcio A. Guia de bioseguridad para laboratorios clinicos [Internet]. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago de Chile: Ministerio de Salud; 2013. 46 p. Available from: http://www.ispch.cl/sites/default/files/Manual Bioseguridad ISPCH.pdf

20. Bykowski T, Stevenson B. Aseptic Technique. Curr Protoc Microbiol. 2008;11(1):1–11.

21. Ministerio de Salud del Perú. Control de Infecciones de Tuberculosis en Establecimientos de Salud. Módulos de capacitación. Lima: Partners TB Control; 2005. p. 159.

22. MSPAS. Manual de Tecnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis. Guatemala: 2008;

23. Ministerio de Salud del Perú, Partners TB Control. Manejo de la tuberculosis. Capacitación para el personal del establecimiento de salud. Modulo 2: Detección de Casos de TB. Lima; 2013, p. 264.

24. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I Baciloscopia. OPS. Washington, D.C.; 2008. p. 64.

25. Laboratorio Nacional de Salud. Manual de normas y procedimientos para la toma de muestras y su envío al Laboratorio Nacional de Salud. Guatemala: MSPAS; 2015. p. 165.

26. Unitaid. Diagnostics Technology Landscape 5th Edition, May 2017. Geneva: WHO Press; 2017. p. 90.

27. World Health Organization. GLI Practical Guide to TB Laboratory Strengthening. 2017;130. Available from: http://stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI_practical_guide.pdf

28. World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis Policy statement [Internet]. WHO press. Geneva; 2011. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501613_eng.pdf

29. Organización Mundial de la Salud. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy [Internet]. World Health Organization. 2013. 88 p. Available from: http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/TB MICROSCOPY HANDBOOK_FINAL.pdf

30. Organización Panamericana de la Salud. Manual Para El Diagnóstico Bacteriológico De La Tuberculosis. Parte II Cultivo [Internet]. Washington, D.C.: OPS; 2008. p. 50–4. Available from: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf

31. MSPAS, Laboratorio Nacional de Salud. Procedimientos Area de Micobacteriología, LNS. 2018.

32. Global Laboratory Initiative. Mycobacteriology Laboratory Manual. Geneva; 2014.

33. World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual:Technical and operational 'how-to': practical considerations. Vol. 2, WHO. Geneva: WHO Press; 2014. p. 1–2.

34. World Health Organization. Using the Xpert MTB/RIF assay to detect pulmonary and extra pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults and children TB. Expert group meeting report. 2013;(WHO/HTM/TB/2013.14).

35. World Health Organization. Frequently asked questions about the WHO Technical Expert Consultation findings on Xpert ® MTB / RIF Ultra. 2017. p. 1–4.

36. World Health Organization. WHO Meeting Report of a Technical Expert Consultation: Non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. World Health Organization. Geneva: WHO Press; 2017. p. 11.

37. World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis : 2016 update. [Internet]. WHO press. Geneva; 2016. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250125/1/9789241549639-eng.pdf?ua=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/handle/10665/250125

38. UNANUE OA de S-CH. Guía Técnica Para El Diagnóstico Bacteriológico De La Tuberculosis. Parte 3 Pruebas de Sensibilidad [Internet]. San Salvador: ORAS - CONHU; 2018. p. 182. Available from: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf

39. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifamicin. Policy Update. Geneva; 2016.

40. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second line anti tuberculosis drugs. Policy Guidance. Geneva; 2016.

41. Organización Mundial de la Salud. Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas 2017-2018. Ginebra: OMS; 2017. p. 40.

42. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extra pulmonary TB in adults and children. Policy Update. Geneva: WHO Press; 2013. p. 98.

43. Hain-Lifescience. Geno Type Mycobacterium CM/AS ver 1.0 [Internet]. Vol. 1, Ifu-298-16. Germany; 2011. p. 1–8. Available from: www.hain-lifescience.de

44. World Health Organization. The use of lateral flow urine lipoarabinomannan assay (LF-LAM) for the diagnosis and screening of active tuberculosis in people living with HIV: policy guidance [Internet]. Geneva; 2015. Available from: http://apps.who.int/iris/handle/10665/193633

45. World Health Organization. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. WHO press. Geneva; 2016.

46. World Health Organization. Use of tuberculosis release assays (IGRAs) in low and middle-income countries. WHO press. Geneva; 2011.

47. Cellestis. QuantiFERON -TB Gold®. Australia; 2012

48. Organización Mundial de la Salud, Clinical and laboratory standards insitute, CDC. Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio: LQMS [Internet]. Vol. 1, World Health Organization. Lyon: Editoriales de OMS; 2016. p. 250. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252631/1/9789243548272-spa.pdf

49. World Health Organization. Maintenance Manual for Laboratory Equipment. 2nd ed. Vercauteren G, editor. Geneva: WHO Press; 2008. 172 p.

50. NSF International Standard, American National Standard. NSF/ANSI 49 - 2008 Biosafety/Biosafety Cabinetry: Design, Construction, Performance, and Field Certification [Internet]. NSF/ANSI International Standard for Biosafety Cabinetry. Ann Arbor, Michigan: NSF International; 2008. p. 1–29. Available from: http://www.nsf.org

51. World Health Organization. Quality Assurance of Sputum Microscopy in DOTS Programmes. Regional Guidelines for countries in the Western Pacific. Philippines: WHO Press; 2003. p. 45.

52. United States Centers for Disease Control and Prevention, Association of Public Heatlh Laboratories. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. Atlanta: IUATLD; 2002. p. 104.

53. InDRE-Secretaría de Salud M. Lineamientos Para la vigilancia por Laboratorio de la Tuberculosis. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2016. p. 121.

54. 3M. Guide to using the 3M Qualitative Fit Test Kits.

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Libro rojo de laboratorio de TB

Anexo 2. Registro de procesamiento de Xpert MTB/RIF®

Anexo 3. Registro de lectura de cultivo.

Anexo 4. Formato de solicitud de baciloscopía.

Anexo 5. Formato de solicitud de cultivo, Xpert MTB/RIF® y PSD.

Anexo 6. Informe mensual de laboratorio, baciloscopía

Anexo 7. Informe Mensual de laboratorio, Xpert MTB/RIF®

Anexo 8. Informe de láminas enviadas para supervisión indirecta. Control de Calidad

Anexo 9. Supervisión indirecta de baciloscopías, hoja de relectura para el revisor

Anexo 10. Informe de Control de calidad de Baciloscopía

Anexo 11. Informe trimestral de supervisión indirecta

Anexo 12. Procedimiento para Prueba de ajuste de respiradores N95 (Fit test 3M)

Anexo 13. Procedimiento para limpieza del microscopio óptico

Anexo 14: Declaración de Intereses

Anexo 1. Libro rojo de laboratorio de TB

Formulario	Código
LIBRO LABORATORIO	FOR-DGRVCS-DRPAP-PNT-002
	Versión: 2.0
	Vigente a partir de: 12/10/2016

Área de Salud: | Distrito de Salud: | Municipio: | Servicio de Salud:

Responsable de la información: | Mes: | Año:

Fecha de recepcion de la muestra	No. de sintomatico del laboratorio	DPI del paciente TB	Nombres y Apellidos	Sexo/Edad		Fecha de nacimiento	Establecimiento que refiere la muestra	BK de Diagnostico								BK de Control				Otras pruebas				Observaciones
								1a muestra				2a muestra												
				F	M			1/ Calidad muestra	Fecha de proceso	#Lámina	Resultado	1/ Calidad muestra	Fecha de proceso	#Lámina	Resultado	Fecha de proceso	#Lámina	No.	Resultado	Fecha muestra	2/ Tipo de prueba	Resultado	Fecha de resultado	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	
/ /						/ /														/ /			/ /	

(1) Calidad de Muestra:
1. MU. Mucupurulenta,
2. SN. Sanguinolenta,
3. SA. Saliva

(2) Tipo de Prueba:
1. CU. Cultivo,
2. BI. Biopsia,
3 GX.GeneXpert
4. OT. Otra

Fuente: MSPAS, DRPAP,elaboración propia del Programa de Tuberculosis, validado por LNS, SIGSA, Guatemala, 2020.

Anexo 2. Registro de procesamiento de Xpert MTB/RIF®

Muestras corridas con Gene Xpert

Año

Fecha	Codigo TB	Nombre Paciente	Tipo Muestra	Motivo de la Prueba	MTB	Rif.	Observaciones

E= Esputo
EP= Extra-pulmonar

D = detectado
ND = No detectado

DVL = Detectado Muy bajo
DL = Detectado bajo

DM = Detectado medio
DH = Detectado alto

NAC200215

Fuente: MSPAS, elaboración propia del Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

Anexo 3. Registro de lectura de cultivo.

LECTURA DE CULTIVO

AÑO

Fecha	N.Muest	Nombre / Categoría	Mx / resultado	Analista	Dias	M	# lote	48h	7d	15d	30d	60d	Resultado	Pbs realizadas	Observaciones
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									
						LJ								Bk PR Xpert GT	PS
						LJ									

R=rugosa **L**=lisa **P**= plana **C**=convexa **T**= transparente **O**=opaca **H**=húmeda **S**=seca **SR**=serosa

SECCION DE MICOBACTERIOLOGIA

Fuente: MSPAS, elaboración propia Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

Anexo 4. Formato de solicitud de baciloscopía



SOLICITUD DE BACILOSCOPIA

SIGSA
PNT-4
Valido a partir del 2016
Formulario-SIGSA-TB4-VP1.0/07-2016

Paciente

DPI del paciente TB: _____ Fecha de solicitud ___/___/___

Nombres y apellidos _____

Sexo: F ☐ M ☐ Fecha de nacimiento: ___/___/___ No. expediente clínico: _____

No. correlativo libro pesquisa _____ No. cama: _____

Tipo de muestra Esputo ☐ Otra: _____

Diagnóstico: Seriado No. ____ 1era. ☐ ___/___/___ 2da. ☐ ___/___/___ 3era. ☐ ___/___/___

Control: No. _____ ___/___/___

Clínica

Nombre de quien solicita: _____ Cargo: _____ Teléfono: _____

Servicio: _____ Distrito: _____ Área: _____ Código: _____

RESULTADO (A ser completado por el laboratorio) No. de ingreso del laboratorio: _____

Laboratorio

	Fecha de recepción	Fecha procesamiento	Calidad de la muestra	# Lamina	Resultado de la baciloscopia					
					Negativo	(1-9) BAAR	+	++	+++	Repetir muestra
1		/ /								
2		/ /								
3		/ /								

Examinado por: _____

Fecha de resultado: ___/___/___ Firma y sello: _____

Fuente: MSPAS, DRPAP, elaboración propiaPrograma de Tuberculosis, validado por LNS, SIGSA, Guatemala, 2016.

Anexo 5. Formato de solicitud de cultivo, Xpert MTB/RIF® y PSD

L. N. S.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DIRECCION GENERAL DE REGULACION, VIGILANCIA Y CONTROL DE LA SALUD
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD
UNIDAD CENTRAL DE REFERENCIA PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA
Kilómetro 22 Carretera al Pacífico Bárcena, Villa Nueva, Guatemala C.A.
PBX. 6644-0599 EXT. 213, Correo Electrónico: micobacteriologia@lns.gob.gt
ÁREA DE MICOBACTERIOLOGIA

UCRMF 011
Rev: 0
Pág 1 de 1

SOLICITUD CULTIVO / PRUEBAS DE SENSIBILIDAD FENOTIPICA Y GENOTIPICA PARA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Nombres y Apellidos del paciente:	DPI:

Edad (años):	Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa)	Sexo: femenino ☐	masculino ☐

¿Cuáles de estas pruebas le ha realizado al paciente? Anote una X en los resultados obtenidos

Baciloscopias: Neg ☐ 1 a 9 ☐ + ☐ ++ ☐ +++ ☐ **Genotype: MTBDRplus®** **Resistencia** R ☐ I ☐ **MTBDRsl®** **Resistencia** F ☐ A ☐

GeneXpert MTBRIF: ***M. tuberculosis*** Detectad ☐ No detectado ☐ **Resistencia a Rifampicina** Detectado ☐ No detectado ☐ Indeterminado ☐

Tipo de Muestra
Esputo: ☐ Otra: _____
Fecha de recolección: _____

Motivo de la prueba
Diagnóstico ☐
Seguimiento ☐

Tipo de caso
Caso nuevo: ☐
Antes tratado: ☐

Esquema de tratamiento
TB sensible ☐ TB-MDR acortado ☐
TB-MDR prolongado ☐ Individualizado ☐

Si es Control de tratamiento indique: Número de mes: ☐ Resultado de BK: Neg ☐ 1 a 9 ☐ + ☐ ++ ☐ +++ ☐

¿Qué prueba solicita?

GeneXpert MTB/RIF: ☐ **Cultivo:** ☐ **Genotype: MTBDRplus®** ☐ **Genotype: MTBDRsl®** ☐ **PSD Fenotípica:** ☐

Motivo para referir la prueba: Debe indicar al menos uno

SR con dos o más baciloscopías negativa, estudio y tratamiento de otras patologías sin mejoría. ☐
Paciente bacteriológicamente confirmado (BK+) prueba de sensibilidad inicial ☐
Población vulnerable (personas con adicciones, en condición de calle, migrantes, desnutridos, adultos mayores de 60 años) ☐
Caso BK (+) del 2do mes en adelante, indique mes _____

Población indígena ☐
Personal de salud ☐
Privados de libertad ☐
TB Extrapulmonar ☐

TB infantil (< 10 años) ☐
Persona con VIH ☐
Diabético ☐
Condición de egreso ☐
Sospecha de Micobacteriosis ☐

Control de tratamiento TB/DR, marque tipo de resistencia y el mes:
H ☐ P ☐ E ☐ Mes No. _____
RR ☐ Mes No. _____ MDR ☐ Mes No. _____
XDR ☐ Mes No. _____

Contacto de paciente con fármaco resistencia
Caso indice resistente a (marque):
R ☐ H ☐ E ☐ S ☐ P ☐ Kn ☐ Am ☐
Lfx ☐ Ofx ☐ Cs ☐ Eto ☐ Pto ☐ Otros _____

Otra información: _____

INFORMACIÓN DE QUIEN SOLICITA EL EXAMEN

Servicio: _____
Distrito: _____ Área de Salud: _____
Teléfono: _____ Correo electrónico: _____
Fecha de envío: _____ Firma y Sello: _____

R: Rifampicina **H:** Isoniacida E: Etambutol P: Pirazinamida S: Estreptomicina Kn: Kanamicina Am: Amikacina Lfx: Levofloxacina Ofx: Ofloxacina
Cs: Ciclocerina Eto: etionamida Pto: Protionamida RR: Resistente a Rifampicina MDR: multidrogo resistente XDR: extremadamente drogo resistente

Este documento pertenece al sitema de calidad del Laboratorio Nacional de Salud, la copia impresa se convierte en una versión no controlada

Fuente: MSPAS, DRPAR,elaboración propia Programa de Tuberculosis, validado por LNS, Guatemala, 2021.

Anexo 6. Informe mensual de laboratorio, baciloscopía

INFORME MENSUAL DE TUBERCULOSIS PARA LABORATORIO

LABORATORIO:_____ MES QUE INFORMA:_____
DISTRITO AREA DE SALUD

Baciloscopías/frotis	(+)	(-)	TOTAL
Bk diagnostico 1era muestra			
Bk diagnostico 2da muestra			
Bk diangostico 3ra muestra			
Bk control de tratamiento			
Frotis Dx. Extrapulmonar			
TOTAL			

CULTIVOS*	(+)	(-)	CONTAMINADOS
Cult. Pulmonares			
cultivos Extrapul			
TOTAL			

*Solo para Hospitales que realizan la técnica

No. De SR examinados	
Casos Positivos por BK	
Cultivos Referidos	

casos positivos por cultivo

Tubos referidos

Pruebas de HIV	(+)	(-)	TOTAL
Paciente con tuberculosis			
Otros pacientes			
TOTAL			

Porcentaje de muestras inadecuadas =
(muestras inadecuadas * 100)/total de muestras recibidas para diagnóstico

Fecha:

Nombre y Firma del Laboratorista

INSTRUCTIVO:
llene completamene el formato con el numero de actividades realizadas durante el mes de trabajo
Envie el informe durante la primera semana del mes siguiente, a su Direccion de Area y guarde una copia para su archivo.
El Area consolida los datos de los laboratorios de sus C/S, Hospitales y lo refieren al LNS

Fuente: MSPAS, elaboración propia Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2018.

Anexo 7. Informe mensual de laboratorio, Xpert MTB/RIF®

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DEPARTAMENTO DE REGULACIÓN DE LOS PROGRAMAS ATENCIÓN A LAS PERSONAS-DRPAP-
PROGRAMA DE TUBERCULOSIS

Servicio		Año	
Profesional Responsable:			
Módulos disponibles:			

PRODUCCIÓN DE LABORATORIO: GENEXPERT

	MTB (+) RIF(-)	MTB (+) RIF (+)	MTB (+) RIF Indet	MTB Trace	MTB no detectado	Error/Invalido/No resultado	Total	% Positividad	Días hábiles	Eficiencia	Cartuchos utilizados	
											MTB Rif	MTB Ultra
enero							0	0.00%		0.00%		
febrero							0	0.00%		0.00%		
marzo							0	0.00%		0.00%		
abril							0	0.00%		0.00%		
mayo							0	0.00%		0.00%		
junio							0	0.00%		0.00%		
julio							0	0.00%		0.00%		
agosto							0	0.00%		0.00%		
septiembre							0	0.00%		0.00%		
octubre							0	0.00%		0.00%		
noviembre							0	0.00%		0.00%		
diciembre							0	0.00%		0.00%		
Total	0	0	0	0	0	0	0	0.00%	0	0.00%	0	0

Corridas diarias por módulo	3

Fuente: MSPAS, DRPAP,elaboración propia Programa de Tuberculosis, LNS,, Guatemala, 2020.

Anexo 8. Informe de láminas enviadas para supervisión indirecta. Control de Calidad

LABORATORIO NACIONAL DE SALUD
UNIDAD CENTRAL DE REFERENCIA PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
Kilómetro 22 Carretera al Pacífico, Bárcena, Villa Nueva, Guatemala C.A.
PBX. 6644-0599 EXT. 213, Correo electrónico: micobacteriologia@lns.gob.gt
AREA DE MICOBACTERIOLOGIA

INFORME DE LÁMINAS ENVIADAS
A CONTROL DE CALIDAD DE BACILOSCOPÍAS

Nombre de la Institución: _____
Ejemplo: Centro de Salud de..., Hospital de..., etc.

Nombre del Área de Salud a la que Pertenece: _____

Nombre del Profesional o Técnico Responsable del Envío: _____

Fecha: _____

Mes Referido	
Correspondientes al año	
Total Baciloscopías Negativas	
Total Baciloscopías Positivas	
Total Baciloscopías Enviadas	

Instrucciones: Completar la información de las láminas positivas referidas para control de calidad.
Las baciloscopías negativas NO se registran en el siguiente cuadro:

	Número de Registro de la Baciloscopía	Iniciales del Paciente	Resultado Según Escala Semicuantitativa Ejemplo 5 BAAR, (+), (++), (+++)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Este documento pertenece al Sistema de Calidad del LNS, la copia impresa se convierte en una versión no controlada

Fuente: MSPAS, elaboración propia Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala,2021.

Anexo 9. Supervisión indirecta de baciloscopías, hoja de relectura para el revisor

LABORATORIO NACIONAL DE SALUD
Control de Calidad de Baciloscopía
Hoja de Relectura Para el Revisor

Laboratorio Supervisado:_____ **Mes Evaluado:**_____ **Control No:** _____

Nombre/Firma del Revisor:_____ **Fecha de Asignación:**_____ **Fecha de Entrega:**_____

Lámina No.	CALIDAD DEL EXTENDIDO				CALIDAD DE COLORACIÓN				Resultado Revisor	Resultado Referente	Observaciones
	Buena	Fino	Grueso	No homogéneo	Buena	Precipitada de Fuscina	Defectos coloración	Deficiente			

Anexo 10. Informe de Control de calidad de Baciloscopía

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD
UNIDAD CENTRAL DE REFERENCIA PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA
Kilómetro 22 Carretera al Pacífico, Bárcena, Villa Nueva, Guatemala C.A.
PBX. 6644-0599 EXT. 213. Correo electrónico: micobacteriologia@lns.gob.gt
ÁREA DE MICOBACTERIOLOGIA

UGCF046
Rev. 00
Pag 1 de 1

"Informe de Control de Calidad de Baciloscopías"

Institución Evaluada: **Correlativo Anual No:**

Nombre del Profesional o Técnico Responsable:

Período Evaluado: **Fecha de la Evaluación:**

	Positivas	Negativas	Total
Láminas enviadas a control:			
Láminas controladas:			

1. RESULTADOS:	Cantidad	Porcentaje
Falsos Positivos:		**%** (del total de láminas positivas controladas)
Falsos Negativos:		**%** (del total de láminas negativas controladas)
Láminas Concordantes:		**%** (del total de láminas controladas)
Láminas Discordantes:		**%** (del total de láminas controladas)
Diferencia Cuantitativa:		**%** (del total de positivas)

2. TÉCNICAS:	Cantidad	Porcentaje
Defectos en el Extendido:		**%** (del total de láminas controladas)
Defectos en la Coloración:		**%** (del total de láminas controladas)

3. LÁMINAS CON DISCORDANCIA CUALITATIVA o CUANTITATIVA

No. de lámina	Resultado Referente	Resultado Revisor	Deficiencia Técnica

4. RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES

Supervisora Área de Micobacteriología

Este documento pertenece al Sistema de Calidad del LNS, la copia impresa se convierte en una versión no controlada

Fuente. MSPAS, Elaboración propia Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2021.

Anexo 11. Informe trimestral de supervisión indirecta

INFORME TRIMESTRAL DE SUPERVISION INDIRECTA
CONTROL DE CALIDAD

Trimestre Año:

Laboratorio Supervisor: Area de Salud

Laboratorios supervisados	Mes supervisado	% Falsos Positivos	% Falsos Negativos	% Concordancia	Acciones correctivas

Instructivo:este consolidado de los controles realizados en el trimestre y resultados obtenidos, se debe mandar trimestralmente al Laboratorio Central de TB y a su JAS.

Fuente. MSPAS, Elaboración propia Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala, 2008.

Anexo 12. Procedimiento para Prueba de ajuste de respiradores N95 (Fittest 3M).

A continuación se describe el método para el uso de los kits de prueba de ajuste que al momento de la elaboración de la presente guía son los que se utilizan en el país, siendo estos "3M QualitativeFit Test Kit" (54).

Equipo y materiales

Asegúrese de contar con:

- Kit de prueba de ajuste 3M ™ FT10 (dulce) o FT30 (amargo)
- Conjunto de nebulizadores y soluciones alternativas FT11 y 12 (dulce) o FT31 y 31 (amargo)

La elección de amargo o dulce es una cuestión de preferencia individual. Le sugerimos que obtenga botellas de ambos para que tenga una alternativa en caso de que alguien no sea capaz de diferenciar uno de ellos.

Preparación y práctica.

Antes de iniciar usted debe leer las instrucciones del usuario contenidas en el kit de prueba de ajuste. La falta de conocimiento sobre cómo instalar un respirador y falta de cuidado durante el procedimiento de ajuste son dos de las razones más comunes por las que las personas no pasan una prueba de ajuste la primera vez

Preparación de la prueba.

Asegúrese de contar con:

- Kit de prueba de ajuste y soluciones de degustación alternativas.
- Reloj.
- Jarra de agua y vasos, preferiblemente de un dispensador para evitar que los aerosoles de la prueba de ajuste contaminen el agua o los vasos.
- El respirador para ser analizado (preferentemente el modelo que utiliza la persona a evaluar).
- Mesa (lo suficientemente grande para colocar el kit de prueba de ajuste)
- Habitación con buena ventilación para llevar a cabo la prueba de ajuste.

Consideraciones pre-prueba

Debe informar a la persona que se someterá a la evaluación que cada prueba toma de 20 a 40 minutos. No deben comer ni beber nada que no sea agua, dentro de los 30 minutos posteriores a su intervalo de tiempo asignado.

La prueba de sensibilidad

Cosas para recordar: (i) Esta prueba se realiza sin usar el respirador. (ii) El objetivo es averiguar si la persona es capaz de distinguir la solución y que se familiarice con el procedimiento.

La prueba de ajuste

Usted debe explicar que la prueba de ajuste está conformada por 7 ejercicios:

1. Respira normalmente.

2. Respira profundamente.

3. Cabeza de lado a lado.

4. Cabeza arriba y abajo.

5. Doblado en la cintura.

6. Hablando.

7. Respira normalmente.

Procedimiento.

Prueba de sensibilidad

- Se sentará a la persona y se colocará sobre su cabeza la escafandra (capucha); se ajustará esta y se preparará la solución junto con el atomizador.
- Se debe utilizar el atomizador con la solución correspondiente y colocarla en el orificio de la escafandra.
- Utilice la solución de sensibilidad y el atomizador correspondiente. Recuérdele a la persona que respire por la boca con la lengua al frente (jadeando)
- Recuerde que le debe decir a la persona que levante la mano inmediatamente cuando sea sensible a la solución.
- Se iniciará a apretar el atomizador
- 1-10 apretones, si no lo siente, repita 11-20 apretones, si no lo siente, repita 21-30 apretones.
- En caso no sienta la solución se recomienda que beba agua, espera 15 minutos y repita con la otra solución que no haya utilizado previamente.

  NOTA en que rango se detectó el sabor= 10, 20 o 30.

Prueba de ajuste

- Se sentará a la persona y éste se colocará de manera adecuada la mascarilla.
- Usted debe explicar que ejercicio debe realizar y nuevamente indicarle que

- levante la mano cuando sea sensible a la solución.
- Colocar sobre su cabeza la escafandra (capucha); se ajustará esta y se preparará la solución junto con el atomizador.
- Se debe utilizar el atomizador con la solución correspondiente y colocarla en el orificio de la escafandra.
- Prepare su reloj; usted debe apretar el atomizador la mitad de las veces (5, 10 o 15) del resultado anotado en la prueba de sensibilidad, esto debe tomar aproximadamente 30 segundos. Ej. Detectó el sabor a los 10 apretones en la prueba de sensibilización, usted debe apretarlo en la prueba de ajuste 5 veces.
- Repita los 7 ejercicios cada 30 segundos y anote los resultados.

NOTA se considerará exitosa la prueba si la persona no logra percibir en ningún momento la sensación de la solución a lo largo de los 7 ejercicios.

Figura No.30
Estuche 3M para la realización de prueba de ajuste cualitativa



Fuente:National Industrial Chemical Notification and Assessment Scheme (NICNAS), 3M, Australia, 2016.

Anexo 13. Procedimiento para limpieza del microscopio óptico.

La limpieza del microscopio es una de las rutinas más importantes y debe considerarse un procedimiento rutinario, para realizar la rutina de limpieza se requiere lo siguiente:

Materiales:

1. Una pieza de tela limpia, de textura similar a la de los pañuelos.
2. Una botella de líquido para limpieza de lentes. Se consigue en las ópticas. Normalmente no afecta los recubrimientos de los lentes y tampoco afecta los pegantes o cementos utilizados para el montaje de los mismos. Entre los líquidos de limpieza más utilizados se encuentran el etil éter, el xileno y la gasolina blanca.

   PRECAUCIÓN. Algunos fabricantes recomiendan no utilizar alcoholes o acetonas, debido a que pueden afectar o disolver los cementos o pegantes utilizados para fijar los lentes. Se recomienda consultar el manual del equipo antes de utilizar determinado producto de limpieza.
3. Papel para limpieza de lentes. Se consigue normalmente en las ópticas, si no es posible conseguir este material, se puede sustituir con papel absorbente suave o con algodón tipo medicinal. Tambiénpuedeutilizarse un trozo de seda suave.
4. Una pieza de gamuza muy fina. Se puede conseguir en peleterías.
5. Una pera de caucho para soplar aire. Se puede fabricar en el laboratorio un dispositivo con este propósito, acoplando una pipeta tipo Pasteur, con la pera de caucho.
6. Una cubierta plástica. Se utiliza para proteger el microscopio del ambiente externo cuando no está en uso. También podría utilizarse una bolsa de tela de textura similar a la de los pañuelos.
7. Un pincel suave de pelo de camello o un pincel fino para pintura. Lo importante es que el pelo del pincel sea natural, de longitud uniforme, textura muy suave, esté seco y libre de grasa, es posible conseguir este accesorio en los almacenes que distribuyen artículos de fotografía. También es posible encontrar un equivalente en tiendas especializadas en suministro de cosméticos.
8. Un paquete 250 g de material desecante (sílica gel). Este material se utiliza para mantener controlada la humedad en la caja de almacenamiento del microscopio si la misma es hermética. Este material cambia de color cuando se encuentra saturado de humedad, aspecto que permite detectar si requiere ser sustituido o renovado. Cuando está en buen estado, por lo general, es de color azul; cuando se encuentra saturado de humedad, es de color rosado(49).
9. Bombillos y fusibles de repuesto. De la clase instalada por el fabricante o un equivalente de las mismas características del original(49).

NOTA: todos los materiales requeridos para efectuar la limpieza deben mantenerse limpios y guardados en recipientes que los protejan del entorno externo.

Limpieza de los elementos ópticos

En un microscopio se encuentran dos tipos de elementos ópticos: los externos, que están en contacto con el ambiente que rodea el equipo, y los internos, que se encuentran dentro del cuerpo del microscopio –las partes internas de los objetivos, oculares, espejos, prismas, condensador, iluminador, etc.– y que no tienen un contacto directo con el ambiente que rodea el equipo. Los procedimientos de limpieza, aunque similares, difieren en cuanto al cuidado y precauciones que

1. Los elementos ópticos externos de los oculares, los objetivos, el condensador y el iluminador se limpian frotando suavemente la superficie de los mismos, con el pincel de pelo de camello. Esto remueve las partículas de polvo que hayan podido encontrarse depositadas sobre la superficie de estos. A continuación, se utiliza la pera para soplar chorros de aire sobre la superficie de los lentes y asegurar que los mismos quedan libres de polvo. Si el polvo se encuentra adherido a la superficie óptica, se utiliza la pieza de tela limpia y de forma muy suave se efectúa un pequeño movimiento circular, sin ejercer mayor presión sobre la su perficie del lente. Con la pera se sopla nuevamente la superficie del lente. Esto retira las partículas adheridas. Podría también utilizarse una pieza de gamuza fina. En este caso se instala la pieza de gamuza en la punta de un pequeño cilindro de diámetro ligeramente inferior al del lente y, sin ejercer mayor presión, se efectúa una rotación de ésta sobre la superficie del lente. Finalmente, con la pera, se sopla aire sobre la superficie del lente. Esto basta para limpiar las superficies externas. La pieza de gamuza puede humedecerse con agua destilada.
2. En condiciones adecuadas de instalación, las superficies interiores de los elementos ópticos no deben resultar afectadas por la presencia de polvo o partículas. Si por alguna circunstancia aparecen partículas sobre la superficie interior de los lentes, se necesita abrirlos para efectuar la limpieza. Nunca debe abrirse un ocular u objetivo, si no se cuenta con un ambiente limpio en el cual realizar el procedimiento de limpieza. Las superficies ópticas interiores se limpian con el pincel de pelo de camello y con la pera para soplar aire, siguiendo un procedimiento análogo al anteriormente explicado; se recomienda no desmontar por ningún motivo los elementos ópticos para no alterar las tolerancias de ensamble del fabricante (49). Si se desmontan, sería necesario alinear nuevamente los elementos y esto solo es factible siguiendo instrucciones precisas del fabricante. La limpieza de los objetivos se limitará a conservar limpios los lentes frontal y posterior.
3. Si se detectan residuos de aceite de inmersión en la superficie de los lentes, éste debe removerse utilizando papel especial para limpieza de lentes o algodón tipo medicinal. A continuación, la superficie del lente debe limpiarse con una solución compuesta de 80 % éter petroleum y 20 % 2-Propanol.

Limpieza del cuerpo del microscopio

1. El cuerpo del microscopio puede ser limpiado con una solución jabonosa que resulta útil para remover la suciedad externa. La solución jabonosa corta la grasa y el aceite. La misma puede aplicarse con un cepillo pequeño. Después de que la grasa y la suciedad hayan sido removidas, debe limpiarse el cuerpo del microscopio con una solución 50/50 de agua destilada y etanol al 95 %. No usarestasolución para los elementosópticos.

2. Las partes mecánicas, integradas por los mecanismos de ajuste macro/micrométrico –ajuste grueso y fino–, el mecanismo de ajuste del condensador y los mecanismos del carro portamuestras o plataforma, deben ser lubricadas de forma periódica con aceite fino de máquina, para permitir su desplazamiento suave(49).

Anexo 14. Declaración de Intereses

Declaración de Intereses

Nombre completo: _____

Profesión: _____

Institución donde labora: _____

Tiempo de laborar: _____

Correo electrónico: _____

Teléfono: _____

Cargo que desempeña: _____

Guía de Atención a elaborar: _____

Existe relación de consultorías o trabajo remunerado para la industria farmacéutica o empresas de tecnología de la salud.

Sí _____ No_____

En caso afirmativo, explique: _____

_____

_____

Número de DPI _____No. Colegiado: _____

_____

Firma y sello Profesional Lugar y fecha

Fuente: MSPAS/DRPAP, Manual para la elaboración de documentos de regulación de Atención Integral de Salud, Guatemala, 2019.

AGRADECIMIENTOS

El Programa de Tuberculosis agradece a las siguientes organizaciones que contribuyeron a la elaboración del “Manual de Técnicas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis”.

OPS (Organización Panamericana de la Salud)

URC(University Research Co., Guatemala)

InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos)

GOBIERNO de GUATEMALA
DR. ALEJANDRO GIAMMATTEI

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL