

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD

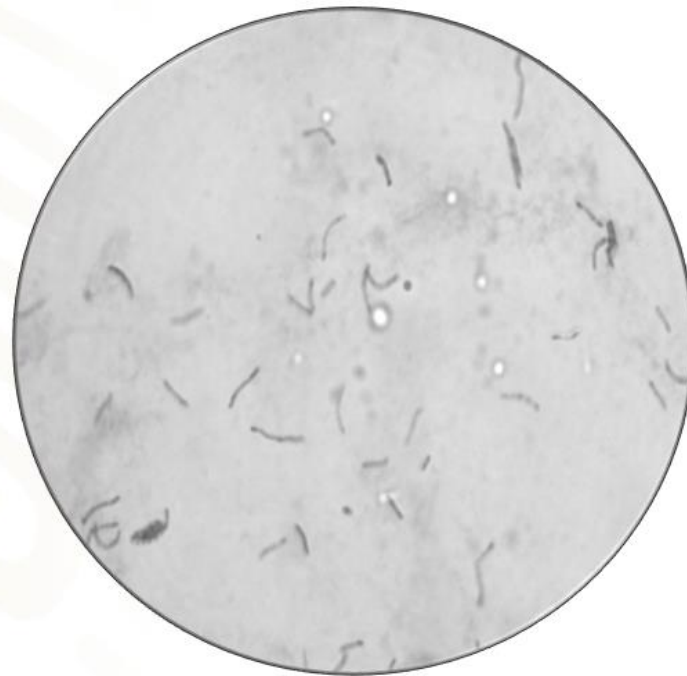


Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud

Dirección General de Epidemiología

Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio

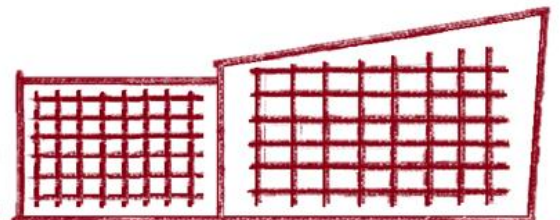
de la Tuberculosis



80

1939-2019
ISET-InDRE

InDRE



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA TUBERCULOSIS

**Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
“Dr. Manuel Martínez Báez”**

2019

PRIMERA EDICIÓN. 2019

INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CONAVE).

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: “INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”. LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA TUBERCULOSIS, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2019”

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

ISBN: EN PROCESO

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”

FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D.T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480, CIUDAD DE MÉXICO, www.gob.mx/salud

TEL. (55)50-62-16-00

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA

IMPRESO EN MÉXICO. PRINTED IN MEXICO

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO CON juan.roman@salud.gob.mx Y CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TUBERCULOSIS A TRAVÉS DEL CORREO: claudia.backer@salud.gob.mx CON EL ASUNTO: CONTENIDO DE LINEAMIENTOS.

SECRETARÍA DE SALUD

Dr. Jorge Alcocer Varela

SECRETARIO DE SALUD

Dra. Asa Cristina Laurell

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

Dr. José Luis Alomía Zegarra

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

Dr. José Alberto Díaz Quiñónez

DIRECTOR GENERAL ADJUNTO DEL INDRE

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS
“DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”
INDRE

Dr. José Alberto Díaz Quiñónez

DIRECTOR GENERAL ADJUNTO

Biól. Irma López Martínez

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

Mtra. Lucía Hernández Rivas

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

Lic. Adriana Castro Cabrera

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

Biól. Norma Angélica Montes Colima

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

Mtra. Dalia Viviana Vallejo Jauffred

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

Mtra. Judith Estévez Ramírez

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

Mtro. Hiram Olivera Díaz

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

Dra. Clara Gorodezky Lauferman

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

Dra. Gabriela Meneses Ruiz

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Mtra. Mónica Salas García

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

GRUPO DE TRABAJO

DRA. CLAUDIA BÄCKER

JEFE DEL LABORATORIO DE MICOBACTERIAS

COORDINADORA DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TUBERCULOSIS

BIÓL. SUSANA GRISELDA BALANDRANO CAMPOS

QBP. CANDELARIA BARRÓN RIVERO

QBP. GABRIELA ESPEJEL PRIETO

MTRA. CAROLINA FLORES MARROQUÍN

DR. JOSÉ ARMANDO MARTÍNEZ GUARNEROS

QBP. MARÍA DE LOURDES OLIVARES DELGADO

QFB. DAVID VÁZQUEZ GONZÁLEZ

MTRO. CARLOS ARTURO VÁZQUEZ CHACÓN

MTRO. ALBERTO ALFARO LÓPEZ

T.L. GONZALO LLIGÜIN LLIGÜIN

ADSCRITOS AL LABORATORIO DE MICOBACTERIAS

AGRADECIMIENTOS

M. EN C. ALBERTO ALFARO LÓPEZ

QFB. ALEJANDRO ZÁRATE RESÉNDIZ

QFB. AMALIA BARQUET FUENTES

P.QFB. BRENDA BERENICE GONZÁLEZ CASTILLO

QBP. CANDELARIA BARRÓN RIVERO

M. EN C. CARLOS ARTURO VÁZQUEZ CHACÓN

M. EN C. CAROLINA FLORES MARROQUÍN

DRA. CLAUDIA ELENA BÄCKER

QFB. DAVID VÁZQUEZ GONZÁLEZ

C. ELIZABETH GUADALUPE SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

BIÓL. FRANCISCO GABRIEL ZÚÑIGA SOLANA

QBP. GABRIELA ESPEJEL PRIETO

QFB JAVIER BELMONT RUIZ

DR. EN C. JOSÉ ARMANDO MARTÍNEZ GUARNEROS

IBQ. JUAN MANUEL NOGUEZ FLORES

LIC. JUAN NAVA NOGUEZ

C. MARCO GONZALO LLIGÜIN LLIGÜIN

QBP. MARÍA DE LOURDES OLIVARES DELGADO

TEC. EN ENF. MARICARMEN GUADALUPE MÉRIDA MARTÍNEZ

BIÓL. SUSANA GRISELDA BALANDRANO CAMPOS

C. TOMÁS MÉNDEZ MORENO

C. ZORAIDA GALVÁN HERNÁNDEZ

M EN C. RITA FLORES LEÓN

CONTENIDO

CONTENIDO	8
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES	11
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	11
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis.....	12
MARCO LEGAL	13
DEFINICIONES OPERATIVAS.....	14
OBJETIVOS.....	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TUBERCULOSIS.....	16
FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TUBERCULOSIS.....	18
Unidades de recolección de muestras	18
Laboratorios locales o periféricos	18
Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP)	19
Laboratorio Nacional de Referencia	19
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRAS	20
Toma.....	21
Conservación	22
Envío y transporte	22
Criterios de aceptación y rechazo de muestras	22
Criterios de aceptación de cepas	23
Criterios de rechazo	25
ALGORITMO DIAGNÓSTICO	26
ESTÁNDARES DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS.....	32

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO (PEED)	33
CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RNLSP 43	
BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL INDRE	45
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	50
ANEXO I. BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE TUBERCULOSIS	50
ANEXO II. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	54
ANEXO III. IMÁGENES	116

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública mundial que demanda atención constante con un diseño de estrategias innovadoras para su combate por parte de los sistemas de salud. De acuerdo a las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y de 5 a 10% de los infectados podrían desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida.

En México, de acuerdo a la información oficial registrada en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en la Plataforma Única de Información Módulo Tuberculosis el número de casos nuevos de tuberculosis pulmonar en los últimos años se ha incrementado: durante 2013: 16,080, 2014: 16,237, 2015: 16487 y 2016: 16 909 casos respectivamente. A diferencia de las defunciones que presentan una ligera disminución en los últimos años: 2012: 1,761, 2013: 1923, 2014: 1733 y 2015: 1665 defunciones respectivamente.

En relación a la tuberculosis farmacorresistente, para el periodo 2010-2016 se reportaron 1,718 casos. Durante 2016 se registraron como tuberculosis pulmonar asociada a diabetes 5,225 casos y asociada a VIH 1585 casos. Estas cifras demuestran que es una enfermedad que continua vigente y que actualmente está asociada a otros estados de morbilidad.

Estos lineamientos de vigilancia por laboratorio tienen la finalidad de ser una guía para el soporte técnico-científico que determine las características de la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis por laboratorio en nuestro país y poner de manifiesto el valor de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis (RNLSP), por lo que al trabajar a diferentes niveles de complejidad de servicio, sus integrantes están solidariamente vinculados para lograr los objetivos comunes en conjunto con el Programa Nacional de Tuberculosis y del Sistema Especial para la Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis.

La red de laboratorios está estructurada de tal forma, que es capaz de brindar apoyo mutuo entre los diferentes niveles de laboratorios y permitir que las muestras sean referidas a un laboratorio que asegure un diagnóstico oportuno y confiable, de acuerdo a las necesidades de cada uno de los pacientes.

La baciloscopía aún es la técnica fundamental en la investigación bacteriológica de la tuberculosis y es la herramienta básica para el control de esta enfermedad en la comunidad.

En casos particulares deben utilizarse otros métodos diagnósticos confirmatorios, de acuerdo a su disponibilidad y cuando se consideren necesarios, por ejemplo, el cultivo, identificación de especie y pruebas de farmacosenibilidad para los medicamentos antituberculosos de primera y segunda elección (fenotípicas o moleculares).

Para el diagnóstico de aquellos pacientes sospechosos de farmacoresistencia se debe usar como prueba inicial la prueba Xpert MTB/RIF, al igual que para la sospecha de tuberculosis extrapulmonar, principalmente tuberculosis meníngea y para la sospecha de tuberculosis asociada con VIH. En caso de disponer de cartuchos extras puede usarse como reemplazo de la baciloscopia.

La definición bacteriológica de un caso de tuberculosis conduce a la certidumbre diagnóstica. El laboratorio es responsable de la confirmación oportuna, confiable y accesible del diagnóstico.

ANTECEDENTES

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios de vigilancia epidemiológica con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica que genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación de diagnósticos mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal (intermedio) y local (periférico) o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR). Tiene fundamento legal en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica.

En la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública se cuenta con el diagnóstico de tuberculosis.

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis

En 1973 se creó una red de laboratorios que cubría las necesidades del país, realizando el diagnóstico de la tuberculosis por baciloscopía. Inicialmente esta red estaba conformada por aproximadamente 350 laboratorios coordinados por el Laboratorio Central de Tuberculosis, dependiente de la Secretaría de Salud (SS). La organización de esta red se basaba en los siguientes principios generales:

- Constitución de una red de servicios, integrada por laboratorios de diferentes niveles y de diversa complejidad técnica.
- Elaboración a nivel central de normas para unificar métodos, técnicas y procedimientos.
- Descentralización hasta el nivel local de los servicios, bajo la supervisión del nivel inmediato superior.
- Interrelación entre los diferentes niveles, con la finalidad de impulsar el desarrollo del nivel menos desarrollado y garantizar su acceso a técnicas más especializadas.

Con el paso de los años, esta red se fue ampliando y como resultado, se formaron laboratorios de diferentes grados de complejidad. En 1987, el Laboratorio Central de Tuberculosis se integró al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) cambiando su nombre a Departamento de Micobacterias y posteriormente a Laboratorio de Micobacterias. En la actualidad, coordina la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis en todo el país tomando la función de LNR.

Para alcanzar este propósito se debe contar con una red de laboratorios bien organizada que debe cumplir con dos tipos de funciones de acuerdo a su nivel de complejidad:

- Funciones técnicas: efectuar los exámenes que le han sido asignados de acuerdo con los medios de que dispone, según el tipo de laboratorio. Servir de referencia a los niveles de menor complejidad y participar en el programa de aseguramiento de la calidad para las diferentes técnicas/metodologías de análisis para el diagnóstico de la tuberculosis.
- Funciones programáticas: coordinar las actividades con los niveles superiores e inferiores, supervisar, brindar asesoramiento y capacitación, así como reunir y evaluar las actividades bacteriológicas de acuerdo a metas programadas.

La bacteriología de la tuberculosis constituye uno de los aspectos fundamentales del Programa Nacional de Micobacterias. El diagnóstico

bacteriológico es desarrollado de forma conjunta con epidemiología y clínica, intentando tener la máxima cobertura posible sobre la base de la integración de las actividades en los laboratorios de salud del país.

MARCO LEGAL

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/02/1917, Última Reforma D.O.F. 15/09/2017.

Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 11/05/2018.
- Ley Federal de Responsabilidades de los Servidores Públicos. D.O.F. 13/03/2012. Última reforma en D.O.F. 18/07/2016.
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; la Ley General de Responsabilidades Administrativas, y la Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F 18/07/2016.
- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 26/01/2017.

Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de enero de 2004. Última reforma en D.O.F. 07/02/2018
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis. DOF: 13/10/2013.

- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.
- NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud.

Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024.
- Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud 2019-2024.
- Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2019-2024. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, primera edición 2019.
- Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2019-2024. Prevención y control de la tuberculosis, primera edición 2019.

Lineamientos y Manuales

- Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Micobacteriosis: tuberculosis y lepra. DGAE. México: Secretaría de Salud; 2012.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2019.

DEFINICIONES OPERATIVAS

Para la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis se establecen las siguientes definiciones operacionales de caso

- **Caso probable de Tuberculosis Pulmonar (TBP):** Toda persona que presenta tos con expectoración o hemoptisis, de dos o más semanas de evolución. En menores de 15 años que presenten durante dos o más semanas tos con o sin expectoración y por lo menos uno de los siguientes: fiebre vespertina, diaforesis nocturna, detención del crecimiento o baja de peso sin causa aparente.
- **Caso de TBP confirmado por laboratorio:** Todo caso probable en quien se ha identificado por laboratorio el complejo *Mycobacterium tuberculosis*

en cualquier muestra proveniente del árbol bronquial, ya sea por cultivo, baciloscopia o por métodos moleculares reconocidos por el InDRE.

- **Caso de TBP confirmado por clínica:** Todo caso probable en quien la sintomatología, signos físicos, elementos auxiliares de diagnóstico o respuesta terapéutica, sugieren la evidencia de tuberculosis, pero la baciloscopia, cultivo o métodos moleculares fueron negativos.
- **Caso de TBP descartado:** todo caso probable de tuberculosis pulmonar en quien no se confirme el diagnóstico por clínica o métodos de laboratorio.
- **Contacto:** persona que convive o ha convivido con un enfermo de tuberculosis de manera intra o extradomiciliaria y que tiene la posibilidad de contraer la infección.
- **Defunción por tuberculosis:** a la defunción en la que se determine que la tuberculosis es la causa básica de defunción mediante criterios clínico-epidemiológicos, de gabinete o laboratorio.
- **Caso probable de Tuberculosis Meníngea (TBM):** a toda persona que presente cualquiera de los siguientes síndromes: infeccioso, meníngeo, cráneo hipertensivo y encefálico, de manera individual o combinada. En menores de 5 años de edad: los que presenten rechazo al alimento, somnolencia e irritabilidad, aunado a los síndromes arriba mencionados. Con o sin antecedente de contacto con algún caso de tuberculosis pulmonar, con sospecha por cualquier auxiliar de diagnóstico (por ejemplo, citoquímico de LCR, imagenología, entre otros).
- **Caso de TBM confirmado por laboratorio:** al caso probable de tuberculosis meníngea que cuenta con confirmación por laboratorio de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, en líquido cefalorraquídeo a través de baciloscopia, cultivo o métodos moleculares como Xpert, reconocidos por el InDRE.
- **Caso de TBM confirmado por clínica:** a la persona en quien la sintomatología, signos físicos, elementos auxiliares de diagnóstico o respuesta terapéutica, sugieren la evidencia de tuberculosis meníngea y la baciloscopia, cultivo o métodos moleculares fueron negativos.
- **Caso de Tuberculosis Extrapulmonar (TBE):** se refiere a cualquier caso confirmado por laboratorio o clínicamente diagnosticado de tuberculosis que involucra otros órganos que no sean los pulmones, por ejemplo, ganglios linfáticos, abdomen, tracto genitourinario, piel, articulaciones, huesos y meninges.

OBJETIVOS

Objetivo general

Dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis, de forma clara y definida, los procesos estandarizados de diagnóstico por laboratorio, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico oportuno y de calidad, que garantice la confiabilidad diagnóstica de la tuberculosis en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.

Objetivos específicos

- Garantizar el aseguramiento de la calidad del diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis.
- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis.

Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TUBERCULOSIS

La coordinación de la RNLSP como LNR es responsabilidad del Laboratorio de Micobacterias del InDRE a nivel federal, siendo el órgano rector de la Red para el diagnóstico, la referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica. El LNR interacciona con los LESP y éstos a su vez, son los enlaces funcionales entre los laboratorios del nivel local (periférico) y el nivel federal.

La figura 1 muestra las entidades que cuentan con laboratorios que conforman la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis.



Figura 1. Red Nacional de Laboratorios para la Vigilancia de la Tuberculosis integrada por el Laboratorio Nacional de Referencia, Laboratorios Estatales de Salud Pública y Laboratorios locales o periféricos

Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis

El diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis se apoya en los laboratorios de la RNLSP, los cuales cuentan con diferentes niveles administrativos y capacidades diagnósticas. La organización general se basa en los siguientes puntos:

- Las técnicas, procedimientos y métodos utilizados son uniformes en toda la red, siguiendo los "*Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Tuberculosis*" como el marco normativo que establece el LNR.
- A nivel estatal existe una descentralización ejecutiva, bajo la supervisión del InDRE.
- Existe una coordinación entre los laboratorios con diferente capacidad diagnóstica, de tal manera que aquellos que cuenten con una menor capacidad técnica, también tienen acceso a métodos de mayor complejidad.

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis está constituida por:

- El Laboratorio de Micobacterias como LNR, integrado al Departamento de Bacteriología del InDRE.
- Los 32 LESP.
- Los laboratorios locales (laboratorios periféricos) están constituidos por los laboratorios pertenecientes a establecimientos de atención primaria a la salud (centros de salud y algunos hospitales). Actualmente se cuenta con 737 unidades.

También existen laboratorios de otras instituciones del sector salud que participan como parte de esta red ofertando pruebas de diagnóstico en apoyo al Programa Nacional de Tuberculosis para la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad.

FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TUBERCULOSIS

Unidades de recolección de muestras

Las funciones de las unidades de recolección de muestras son las siguientes:

- Recolectar las muestras correspondientes a su área geográfica.
- Enviar en forma expedita (menos de cinco días) las muestras al laboratorio de nivel local, con el que se encuentren coordinadas.
- Realizar, sólo cuando sea necesario, los frotis (extendidos) para enviarlos a los laboratorios locales para su tinción y posterior lectura.

Laboratorios locales o periféricos

Las funciones de los laboratorios locales o periféricos son las siguientes:

- Realizar las baciloscopías solicitadas en sus ámbitos geográfico o administrativo y recibir y procesar las muestras enviadas por otras unidades que no cuentan con laboratorio y que sólo son recolectoras. Es importante que esta prueba diagnóstica esté al alcance del paciente sin que su realización esté fragmentada (en un laboratorio se haga el extendido, en otro la tinción y en otro la lectura), lo que ocasiona retraso en el diagnóstico.
- Referir a los laboratorios estatales las muestras que requieren técnicas de análisis más complejas.
- Participar en los programas de capacitación, supervisión y control de calidad de la red y enviar información sobre sus actividades al nivel estatal.

- Participar con el Programa Estatal de Tuberculosis para fortalecer la atención a los pacientes.

Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP)

Las funciones de los LESP son:

- Realizar la prueba Xpert MTB/RIF y los cultivos, incluida la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) y/o Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), de las muestras enviadas por los laboratorios que constituyen su red. Cuando tienen la capacidad, también realizar las pruebas de farmacosenibilidad a medicamentos de primera línea. Aplicando siempre los algoritmos de diagnóstico vigentes.
- Efectuar baciloscopías (en caso de que un centro de salud por diferentes motivos no pueda realizarlas o a su comunidad colindante).
- Capacitar al personal de su red de laboratorios en bioseguridad y en las técnicas de baciloscopía, cultivo y Xpert MTB/RIF, cuando éstas se puedan efectuar en el nivel local.
- Participar y llevar a cabo programas de supervisión y control de calidad.
- Evaluación del desempeño de la red local de microscopistas a través de:
 - la relectura de baciloscopías
 - evaluación del desempeño mediante paneles
 - y evaluación del estándar del servicio
- Recopilar, analizar y evaluar la información cuantitativa y cualitativa enviada por los laboratorios locales que conforman la red de su respectivo estado.
- Concentrar la información del nivel local y estatal para enviarla al InDRE.
- Asesorar a los laboratorios locales con respecto a los requerimientos de materiales e insumos.
- Participar en las actividades de investigación cuando así sea requerido.
- Participar con el Programa Estatal de Tuberculosis para fortalecer la atención a los pacientes.

Laboratorio Nacional de Referencia

El LNR tiene las siguientes funciones:

- Coordinar las actividades de la RNLSP.
- Efectuar las pruebas de farmacosenibilidad a medicamentos de primera y segunda línea.
- Realizar la prueba del Xpert MTB/RIF de acuerdo a los algoritmos de diagnóstico vigentes en la RNLSP.
- Efectuar baciloscopías y cultivos.

- Realizar las pruebas de identificación de las especies micobacterianas aisladas.
- Participar en el programa internacional de control de calidad externo de las pruebas de farmacosenibilidad (PFS) fenóticas o moleculares e identificación establecido por la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).
- Establecer la normatividad referente a los métodos y técnicas de diagnóstico de la tuberculosis en México.
- Efectuar los estudios correspondientes a las muestras o cepas recolectadas, que otros laboratorios del país no puedan realizar de manera permanente o transitoria.
- Capacitar al personal de la RNLSP en las técnicas de bacteriología que se requieran.
- Realizar el control de calidad a las técnicas y procedimientos que efectúan los laboratorios de la RNLSP, mediante el envío de paneles, láminas, medios de cultivo, etc. y la supervisión directa e indirecta de los servicios.
- Proporcionar las pautas a seguir por los laboratorios estatales para la supervisión de los laboratorios locales.
- Asesorar a los laboratorios estatales con respecto a los requerimientos de materiales e insumos.
- Recopilar, analizar y evaluar la información cuantitativa y cualitativa de las actividades realizadas por la red nacional de los laboratorios de tuberculosis, para generar información útil para la toma de decisiones.
- Evaluar el uso e implementación de nuevas tecnologías para la red de laboratorios.
- Realizar y coordinar investigaciones técnicas, operacionales y epidemiológicas relacionadas a la tuberculosis.
- Coordinar esfuerzos, así como recursos humanos y financieros con el Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis, para que la RNLSP trabaje en forma adecuada de acuerdo con las necesidades de diagnóstico.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRAS

El material biológico que se recibe en el laboratorio son muestras biológicas o cepas. Para tener una muestra útil es necesario cumplir con los siguientes

requisitos de calidad en la recolección, mantenimiento y envío de la misma con base en el Sistema Básico de Triple **Embalaje**¹.

Una muestra biológicamente adecuada se define como la muestra representativa del sitio de la lesión a investigar, en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado y limpio, identificada, conservada y transportada correctamente. Dado que la enfermedad puede presentarse en cualquier órgano, las muestras pueden ser muy variadas: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, biopsias, etc. Por ser la muestra más común y de mayor rendimiento en tuberculosis, se dará especial énfasis al esputo producto de la expectoración. (Tabla 1.)

Toma

La muestra debe recolectarse en un envase adecuado que tenga las siguientes características:

- Recipiente plástico, de pared lisa y transparente para visualizar la calidad de la muestra sin tener la necesidad de abrir el recipiente.
- Ser desechable para facilitar su eliminación adecuada.
- Capacidad de 50 a 60 ml aproximadamente para recolectar un volumen de muestra suficiente.
- Diámetro de apertura suficientemente ancho, entre 7 a 10 cm para facilitar la recolección de la muestra y que el analista pueda escoger la porción más representativa de la misma.
- Con tapa de rosca para disminuir el riesgo de que se derrame la muestra durante el transporte o de producir aerosoles al abrir el contenedor en el laboratorio.
- Etiquetado correctamente para identificar la muestra (cuerpo del frasco).

El procedimiento y momento para la toma de muestras se encuentra ampliamente descrito en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1 Baciloscopía. OMS/OPS 2008.

¹ El **sistema básico de triple embalaje** consiste en la utilización de un recipiente primario, en el cual está contenida la muestra biológica (exudado faríngeo, exudado nasofaríngeo, lavado bronquio alveolar, biopsia, suero, etc.) o el aislamiento (cepa). El recipiente primario (p. ej. criotubos, tubos o frascos con tapa de rosca) debe ser hermético para evitar que el material se derrame y tiene que estar perfectamente etiquetado con el nombre o número de muestra del paciente. El recipiente primario deberá rodearse de material absorbente como gasa o papel absorbente y colocarse en un recipiente secundario hermético a prueba de derrames y golpes. Si se colocan varios recipientes primarios dentro de un recipiente secundario se deberá usar una gradilla y material absorbente para evitar algún derrame. Es importante mencionar que dentro del recipiente secundario (hielera) tiene que haber suficientes refrigerantes para mantener una temperatura de 4 a 8 °C. El recipiente secundario deberá ir contenido en un paquete externo (recipiente terciario) de envío (caja de cartón) que proteja el contenido de elementos externos del ambiente y debe estar etiquetado con los datos del remitente, destinatario y señal de orientación. La documentación que se integre al triple embalaje deberá colocarse en la parte interior del paquete, pero no en contacto con la muestra.

Conservación

- Para la conservación de la muestra es importante considerar que, si ésta no es enviada de inmediato, se debe mantener en refrigeración de 4 a 8 °C de preferencia, o bien mantenerla en un lugar fresco, protegida de la luz y no por más de cinco días. No se debe de congelar.

Envío y transporte

- Para transportar el contenedor con la muestra y con las características previamente definidas, ésta debe de introducirse en una bolsa de plástico y cerrarla con una liga, para que en el caso de que se rompa el envase se evite el contacto de la muestra con otros envases de muestras que vengan en el mismo envío.
- Introducir la bolsa en una caja de unicel o cartón con un refrigerante. Rellenar los espacios vacíos con papel o algún material absorbente para mantener la muestra en posición vertical y evitar que se derrame al ser transportada.
- También debe acompañarse del formato correspondiente (historia clínica, oficio de solicitud e informe del resultado del examen bacteriológico o el formato único de envío de muestras con letra legible), el cual nunca debe estar en contacto con las muestras biológicas.
- La muestra nunca debe ser rechazada, a menos que esté derramada de manera importante y casi toda se encuentre en la bolsa y no en el recipiente, o no cumpla con los criterios de aceptación establecidos. Sin embargo, aunque la muestra no sea de buena calidad es conveniente examinarla de todas formas, porque siempre existe la posibilidad de que contenga bacilos.

Para aquellas situaciones en donde el material biológico esté representado por un aislamiento (cepa), se requiere que sea un primo aislamiento y nunca una resiembra, que el tiempo de desarrollo sea de 2 a 3 semanas (cepa joven y pura). Este envío debe cumplir con los requisitos de triple embalaje ya descritos. Asimismo, debe acompañarse de la forma correspondiente; solicitud e informe del resultado del examen bacteriológico o el formato para el envío de muestras, los cuales nunca deben estar en contacto con las muestras.

Criterios de aceptación y rechazo de muestras

Antes de manejar cualquier muestra, el personal técnico debe conocer las mínimas medidas de bioseguridad descritas en el Anexo I.

Los criterios de aceptación de muestras biológicas son:

- Estar colocada en el envase adecuado.
- Bien identificada en el cuerpo del envase.
- Acompañada con el formato de solicitud correspondiente.
- Traer una historia clínica con los siguientes datos:
 - Nombre del paciente
 - Edad
 - Sexo
 - Procedencia o Institución que solicita el examen
 - Médico que envía
 - Situación del paciente: control de tratamiento, referencia o diagnóstico

Cumplir con los siguientes requisitos de acuerdo al tipo de muestra (Tabla 1)

Tabla 1. Requisitos para la toma de muestras para diagnóstico de tuberculosis y criterios de aceptación.

TIPO DE MUESTRA	NUMERO DE MUESTRA	VOLUMEN DE LA MUESTRA	OBTENCIÓN	ENVASE	CONSERVACIÓN	ADITIVOS
Espuito	3	3 a 5 ml	Paciente con instrucciones	Desechable, tapa de rosca, cierre hermético transparente	Refrigeración, Protegida de la luz	No aplica
Lavado Gástrico	3	3 a 5 ml	Personal Médico En ayunas por la mañana	Desechable, tapa de rosca, cierre hermético transparente	Refrigeración, Protegida de la luz, procesar de inmediato, no más de 4 horas	Si pasan mas de 4 hrs., neutralizar con 1mg de bicarbonato de sodio por mL de muestra
Lavado Bronquial	1	1 a 3 ml	Personal Médico En ayunas por la mañana	Desechable, tapa de rosca, cierre hermético transparente	Procesar de inmediato o conservar en refrigeración, protegida de la luz	No aplica
Orina	3 a 6	50 ml	Paciente con instrucciones	Desechable, tapa de rosca, cierre hermético transparente	Refrigeración, Procesar de inmediato.	No aplica
Líquido Cefalorraquídeo	1	1 a 3 ml	Personal Médico	Estéril , desechable, tapa de rosca, cierre hermético, transparente	Procesar de inmediato o conservar en refrigeración por no más de 12 horas	No aplica
Biopsia	1	1 g	Personal Médico	Estéril , desechable, tapa de rosca, cierre hermético, transparente, 1-2 mL de solución fisiológica o agua destilada estéril	Refrigeración, protegida de la luz, procesar de inmediato. Sin formol	No aplica
Líquido pleural, Ascítico, Pericárdico	1	1 a 3 ml	Personal Médico	Estéril , desechable, tapa de rosca, cierre hermético, transparente	Procesar de inmediato o conservar en refrigeración por no más de 12 horas	Uso de anticoagulante. 3 gotas de citrato de sodio al 10% ó EDTA por cada 10 mL de muestra.

Criterios de aceptación de cepas

Cepa en medio sólido.

- Cepa pura con baciloscopía positiva, de preferencia con 28-30 días de siembra. Primo aislamiento cuando es para prueba de sensibilidad.
- De preferencia con más de 20 colonias para prueba de sensibilidad y con más de 50 colonias para prueba de tipificación. Si es necesario, incluir más de un tubo sembrado con la misma muestra.
- Perfectamente rotulada: nombre del paciente, tipo de muestra y fecha de siembra.
- Con los siguientes documentos:
 - a) Oficio de solicitud de estudio
 - b) Formato Único de Envío de Muestras Biológicas
 - c) Historia clínica.

Cepa en medio líquido

- Cepa pura con baciloscopía positiva
- No usar tubo de vidrio.
- Asegurar la tapa con parafilm.
- Bien identificada.
- Con los siguientes documentos:
 - a) Oficio de solicitud de estudio
 - b) Formato Único de Envío de Muestras Biológicas REMU-F-12
 - c) Historia clínica.

Criterios de aceptación de baciloscopías (frotis) para control de calidad:

- La fecha de envío debe hacerse en los primeros 15 días posteriores al mes siguiente del que se hizo la re-lectura, (Ej. Baciloscopías leídas en los laboratorios locales de la red en el mes de enero y releídas en febrero por el LESP, deben ser enviadas al InDRE en los primeros 15 días de marzo en el porcentaje establecido).
- El oficio que acompaña a las baciloscopías de relectura debe estar etiquetado como “Control de calidad de baciloscopías de tuberculosis”.
- El formato “Relación de re-lectura de frotis” debe de estar correctamente llenado, evitando ocupar los espacios asignados a los resultados del InDRE.
- Las baciloscopías contenidas en el paquete deben coincidir con las que se encuentran descritas en el formato “Relación de re-lectura de frotis”.
- Los laboratorios que envían sus baciloscopías de diagnóstico deben de enviarlas con un oficio, y sus baciloscopías de relectura que realizan a su Red deben enviarlas con otro oficio.
- Baciloscopías adecuadamente empacadas (sin restos de aceite de inmersión, separadas una por una con papel tipo acordeón) y separadas las positivas de las negativas.

Criterios de aceptación de paneles

Paneles de láminas:

- Cada envío debe llegar con un oficio que describa el contenido del paquete.
- Cada panel debe venir acompañado con los resultados de la evaluación.

Criterios de aceptación de paneles de cepas:

- Cada envío debe llegar con un documento que describa el contenido del paquete.
- Cada panel debe llegar en buenas condiciones físicas.

Criterios de rechazo

Criterios de rechazo de muestras biológicas:

- Si no cumple con las características de aceptación mencionadas
- Si la muestra está totalmente derramada.
- Frasco sin identificación.
- Frasco vacío.
- Frasco roto.

Muestras de alto valor

Es aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación pero que por las características de evolución (alta, mejoría o defunción) del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico. Cuando el laboratorio opta por procesar (otorgar alguna concesión) la muestra de alto valor se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado. El proceso de estas muestras se especificará en el apartado de observaciones.

Criterios de rechazo de cepas:

Si no cumple con las características de aceptación mencionadas

- Con contaminación macroscópica.
- Tubo roto.
- Tubo sin identificación.

Concesión

Cuando existe falta, retraso o errores en la historia clínica, debido al estado clínico del paciente, la cepa se procesará y se solicitará al laboratorio emisor corregir el problema en un lapso máximo de una semana.

Cuando el número de colonias es menor al establecido en los criterios de aceptación, debido a que la cepa es clínicamente crítica o irremplazable, el laboratorio la procesará, sin embargo, en el informe de laboratorio final se debe indicar la naturaleza del problema y si procede, que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

Criterios de rechazo de baciloscopías para control de calidad

Si no cumple con las características de aceptación mencionadas.

Concesión

- Se aceptan las supervisiones para relectura de baciloscopías bajo las siguientes circunstancias:
Si el laboratorio emisor tiene pocas baciloscopías en cada mes que se le solicitó o sus envíos al InDRE están restringidos, se acepta que se acumulen las supervisiones y sean enviadas en el siguiente periodo.²
- Si existen errores de redacción de oficio de control de calidad, así como en la relación de relectura de frotis, se realizará la relectura, haciendo el laboratorio emisor las correcciones necesarias.²
- En caso de que falte alguno de los documentos que acompañen a las baciloscopías (Oficio de Control de Calidad y Relación de Relectura de Frotis), se solicitará al laboratorio emisor, para realizarse la relectura correspondiente.²
- Cuando las baciloscopías lleguen rotas, pero sea posible leer el frotis.²

Criterios de rechazo de paneles de láminas o cepas

Los paneles no se rechazan. Sólo se retrasa su procesamiento (si falta algún documento), o no se procesan si está comprometida la bioseguridad o si sus condiciones no lo permiten (material roto, derrame, etc.), en este caso se informa y se solicita su reposición.

ALGORITMO DIAGNÓSTICO

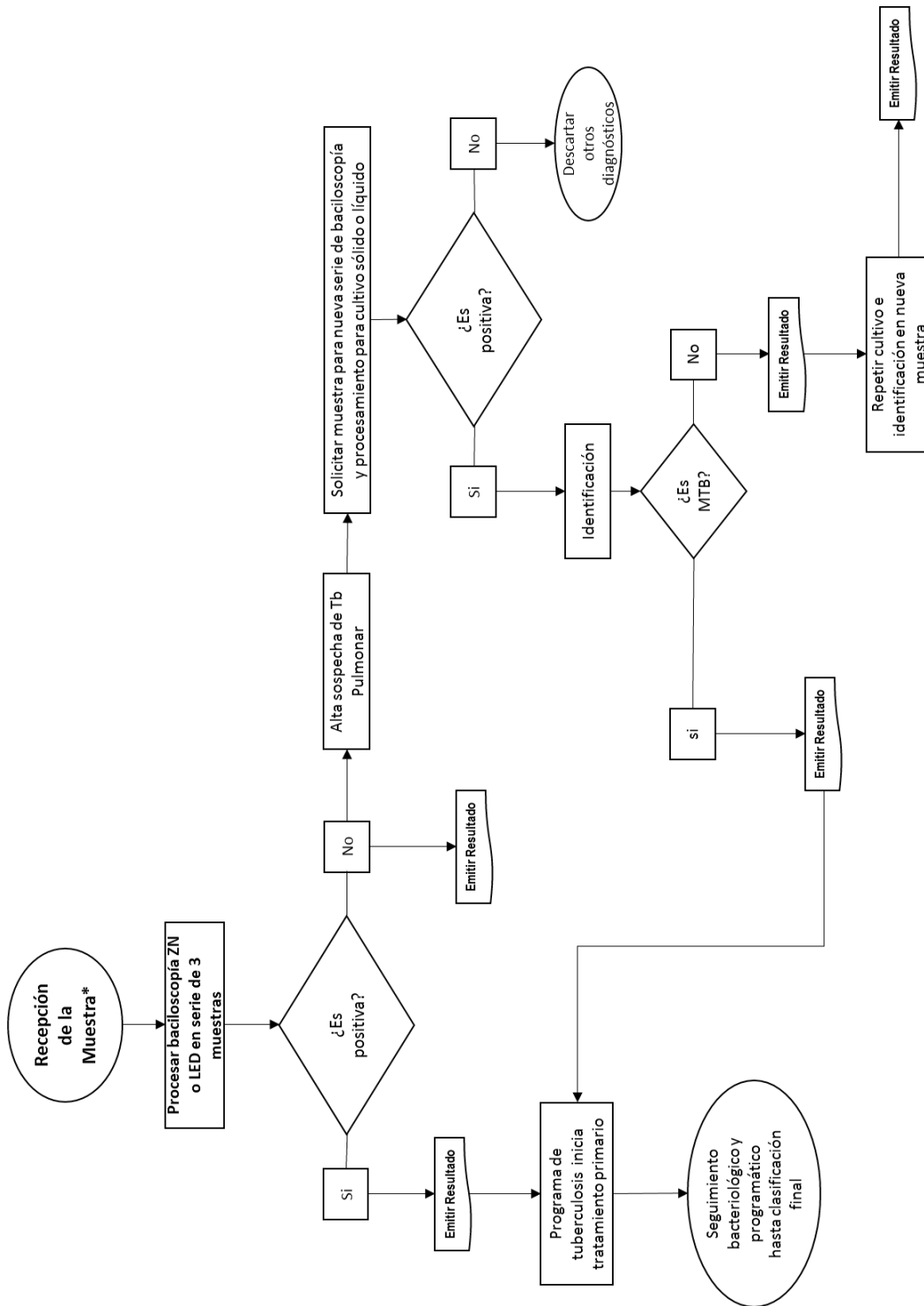
Para el diagnóstico por laboratorio se establecen:

- Algoritmo para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar (figura 2),

² En estos puntos se realizará la notificación al laboratorio vía telefónica, así como correo electrónico. El laboratorio en cuestión deberá dar respuesta en un lapso máximo de una semana, de no ser así se procederá al rechazo de la supervisión

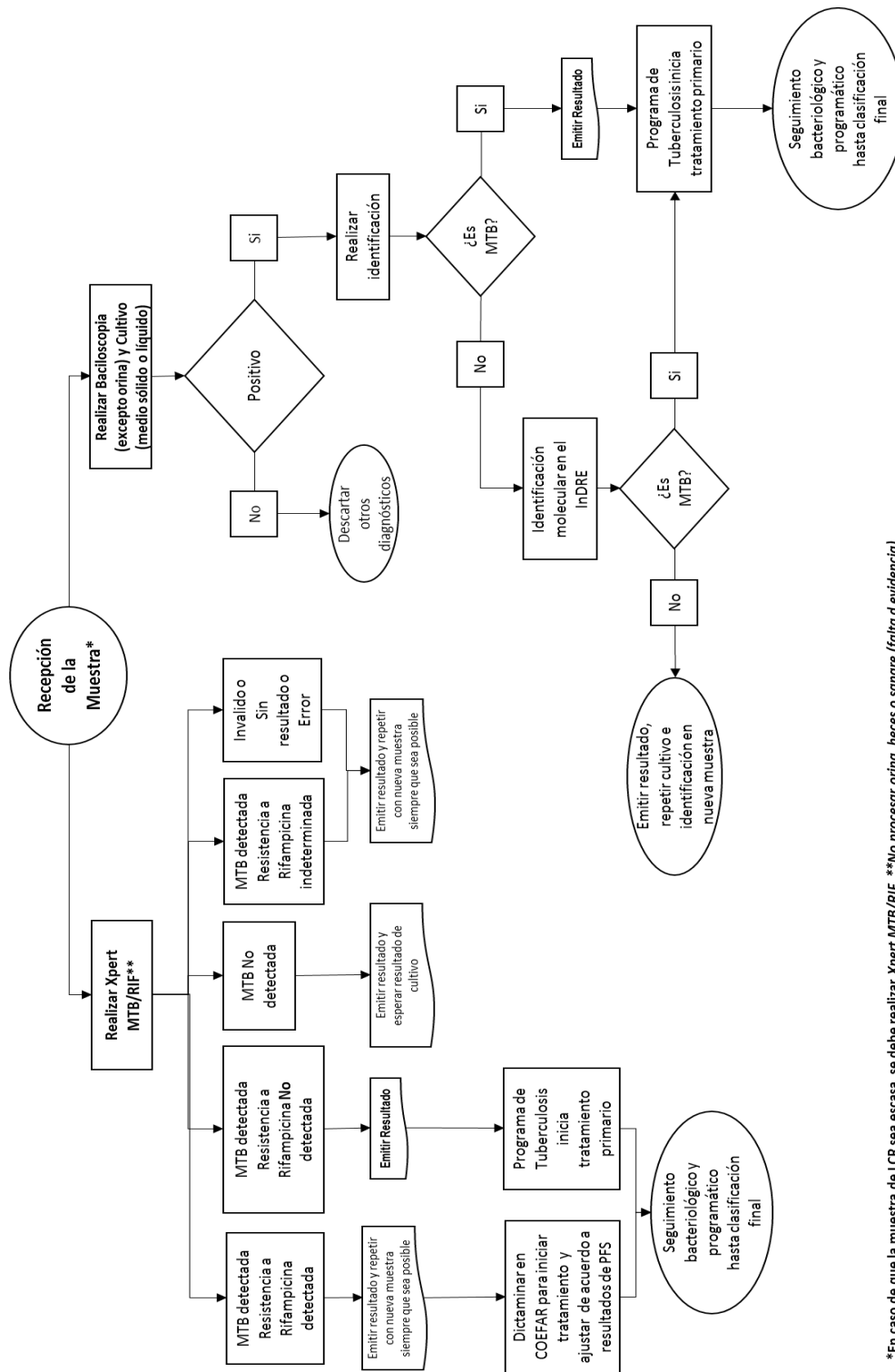
- Algoritmo diagnóstico para la tuberculosis extra pulmonar (adultos y niños) (figura 3),
- Algoritmo diagnóstico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en grupos de riesgo de farmacorresistencia (figura 4) y
- Algoritmo para pruebas de farmacosenibilidad para grupos de riesgo de tuberculosis farmacorresistente en la RNLSP (figura 5).

Quedando los mismos sujetos a actualizaciones cuando se realizan modificaciones al Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Micobacteriosis o cualquier otro documento normativo.



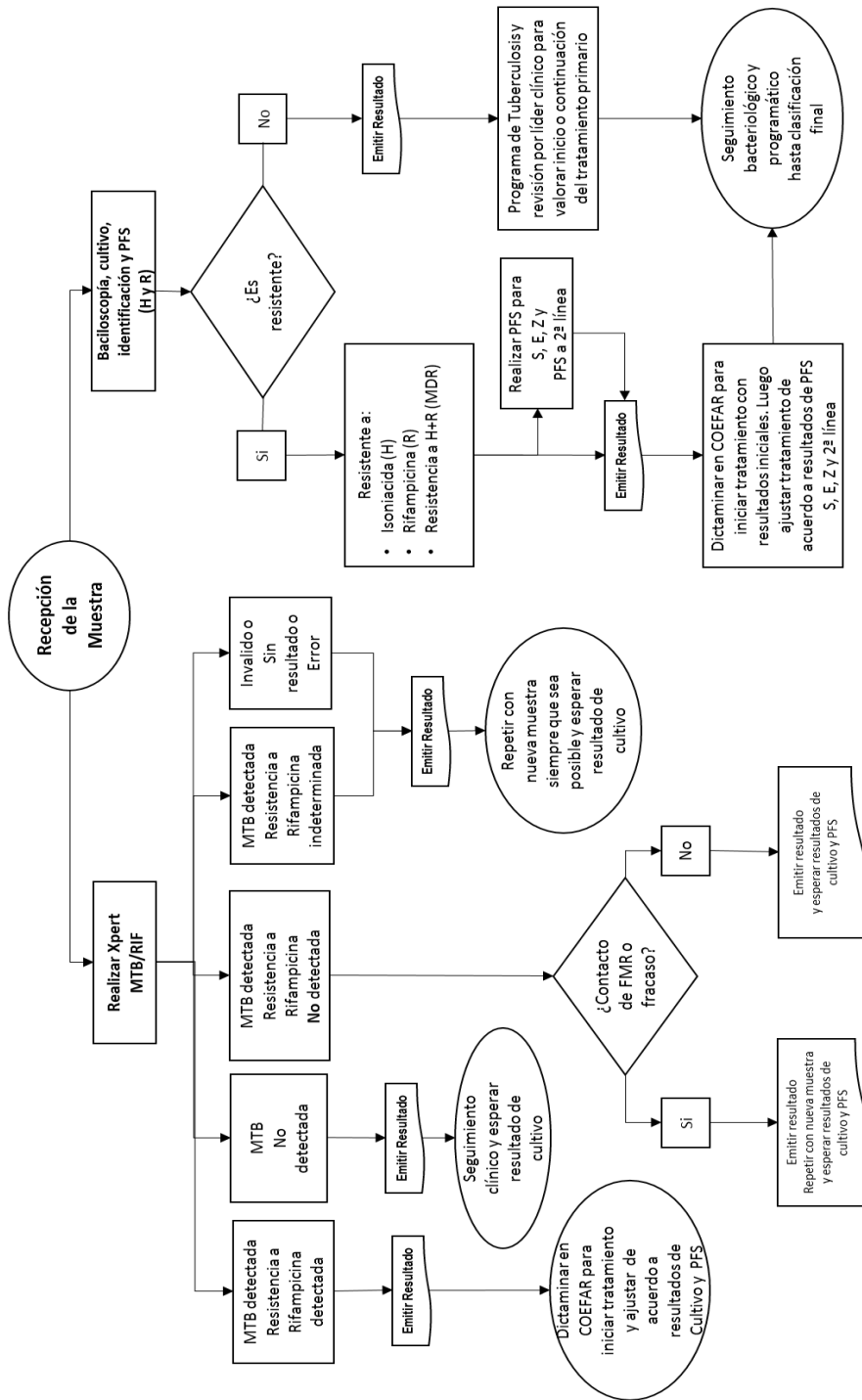
*Hacer Xpert MTB/RIF si se cuenta con suficientes insumos.

Figura 2. Algoritmo diagnóstico de tuberculosis pulmonar
Clave de tabulador: 1B6566008, 1B6566001, 1B6566002, 1B6566007, 1B6566011.



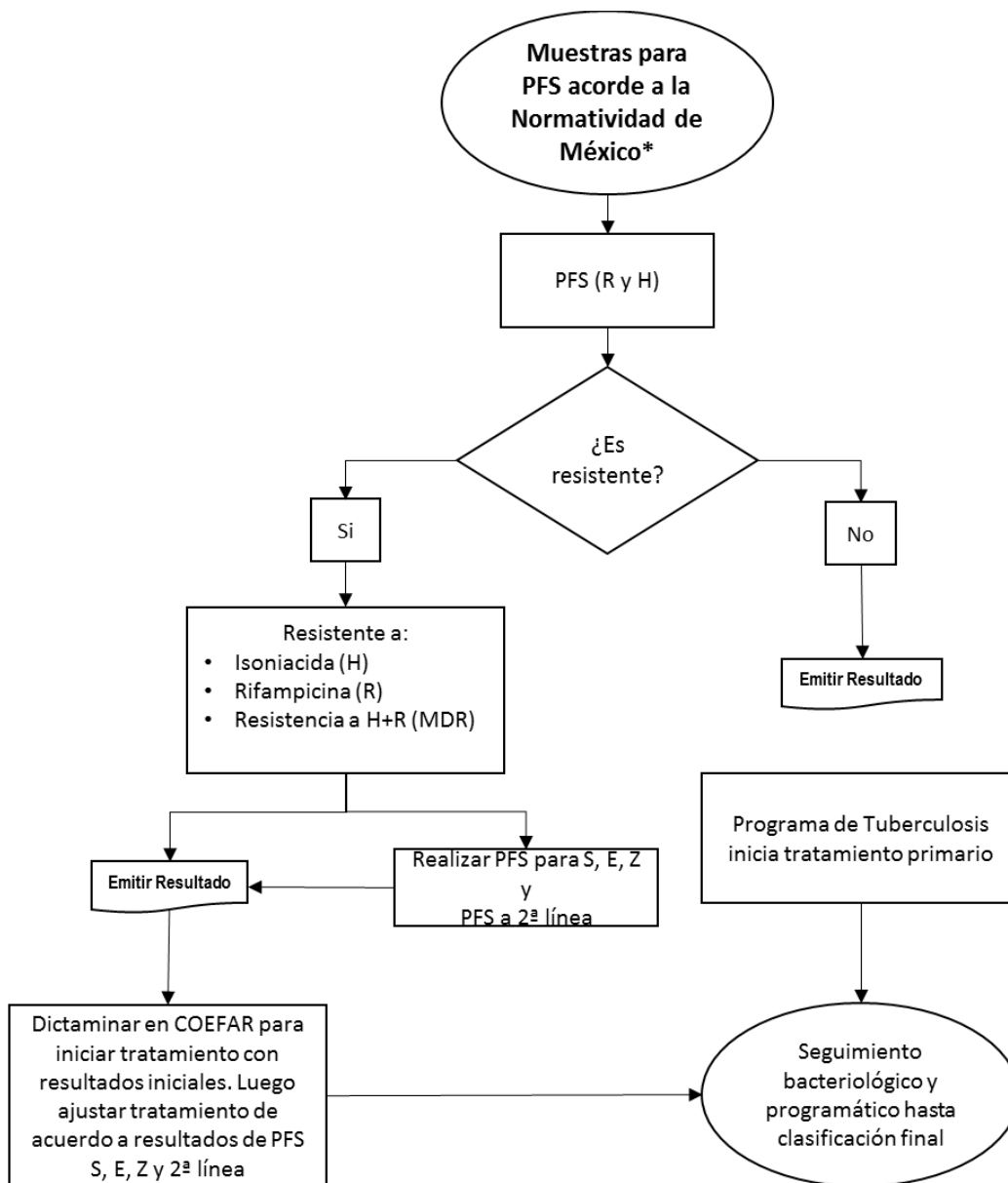
*En caso de que la muestra de LCR sea escasa, se debe realizar Xpert MTB/RIF, **No procesar orina, heces o sangre (falta de evidencia)

Figura 3. Algoritmo diagnóstico de tuberculosis extra-pulmonar (adultos y niños)Clave de tabulador: 1B6566008, 1B6566001, 1B6566002, 1B6566007, 1B6566011.



*Grupos de Riesgo para farmacoresistencia: Fracaso a retratamiento, Contacto de cas o FR, Fracaso a tratamiento primario, BK positiva al 2do mes del tratamiento, Recaída, Pérdida en el seguimiento (abandono), Comorbilidades (VIH/sida, DM descontrolada).
 Otros grupos de riesgo: Personal de salud, privados de la libertad, fracaso de tratamiento en sector privado, comorbilidades asociadas con mala absorción o diarrea.

Figura 4. Algoritmo diagnóstico de tuberculosis pulmonar y extra-pulmonar en grupos de riesgo de farmacoresistencia. Clave de tabulador: 1B6566008, 1B6566001, 1B6566002, 1B6566007, 1B6566011, 1B6566012 y 1B6566014.



*Grupos de Riesgo para farmacoresistencia: Fracaso a retratamiento, Contacto de caso FR, Fracaso a tratamiento primario, BK positiva al 2do mes del tratamiento, Recaída, Pérdida en el seguimiento (abandono), Comorbilidades (VIH/sida, DM descontrolada).

Otros grupos de riesgo: Personal de salud, privados de la libertad, fracaso de tratamiento en sector privado, comorbilidades asociadas con mala absorción o diarrea.

Figura 5. Algoritmo para pruebas de farmacosenibilidad para grupos de riesgo de tuberculosis farmacorresistente en la Red de Laboratorios de Salud Pública. Clave de tabulador: 1B6566008, 1B6566001, 1B6566002, 1B6566007, 1B6566011, 1B6566012 y 1B6566014.

ESTÁNDARES DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS

De acuerdo con la NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP es indispensable apegarse a los *Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, componente vigilancia epidemiológica*, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (International Organization for Standardization) 9001:2015 Sistemas de Gestión de la Calidad e ISO 15189:2015 Requisitos de la calidad y competencia y NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el Manual Caminando a la Excelencia, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP.

Como parte del estándar de calidad, se establece en la tabla 2 el estándar promedio del servicio en días naturales para la emisión de resultados de acuerdo al tipo de muestra y metodología. Los estándares incluyen los tiempos de la parte técnica y de la parte administrativa, procurando que la segunda sea el menor tiempo posible (máximo 2 días **hábiles**) para que no castigue la oportunidad diagnóstica.

Tabla 2. Estándares de servicio para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tuberculosis

Tipo de prueba diagnóstica	Características del tipo de prueba	Estándares de servicio (Días naturales)
Baciloscopía	Tinción de Ziehl Neelsen	1-2*
Cultivo e identificación	Cultivo en medio sólido (Löwenstein Jensen o Stonebrink) con desarrollo (positivo) e identificación por pruebas bioquímicas o AGMTB64 (inmunocromatografía).	21-28
	Cultivo en medio sólido (Löwenstein Jensen o Stonebrink) sin desarrollo (negativo).	58

	Cultivo en medio líquido (Middelbrook 7H9 modificado, BBL) con desarrollo (positivo) e identificación con AGMTB64 (inmunocromatografía).	8-15
	Cultivo en medio líquido (Middelbrook 7H9 modificado, BBL) sin desarrollo (negativo).	44
Prueba de Farmacosensibilidad de primera línea (PFS de 1L)	Gene Xpert MTB/RIF	1-2*
	PFS 1L en equipo MGIT 960 a partir de cepa para Isoniacida y Rifampicina	7-15
	PFS 1L en equipo MGIT 960 a partir de una cepa e incluyendo Pirazinamida.	7-23
	PFS 1L por el método de las proporciones de Canetti en medio sólido (Löwenstein Jensen).	45
Prueba de Farmacosensibilidad de segunda línea (PFS 2L)	PFS 2L por el método de las proporciones en medio Middelbrook.	45
Prueba de Farmacosensibilidad de segunda línea (PFS 2L)	PFS 2L por el método de MGIT 960	7-23

*En estos casos son días hábiles

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO (PEED)

Es responsabilidad de cada laboratorio participar en el PEED, que debe ser conducido por un LESP y/o por el LNR.

Objetivo: Evaluar el desempeño diagnóstico de los laboratorios de la red e identificar a aquellos con áreas de oportunidad por fallas técnicas u operativas para colaborar en su mejora continua.

Métodos: Los métodos empleados son directos e indirectos y se pueden ejercer sobre aspectos técnicos u operacionales. El programa de evaluación externa del desempeño se compone de los siguientes métodos:

Control de calidad externo directo o supervisión directa

Consiste en la visita a los laboratorios de la red, con el objetivo de evaluar *in situ* las condiciones del área de trabajo y equipos, los procedimientos técnicos y operacionales. Se recomienda la utilización de una cédula para la sistematización de la supervisión. También es recomendable que estas visitas se hagan en conjunto participando la Dirección General Adjunta de Epidemiología (DGAE), el Programa Nacional de Tuberculosis (PNT) y el InDRE; así como de forma sectorial cuando corresponda.

El responsable del laboratorio supervisor debe:

- Seleccionar los laboratorios de acuerdo a las prioridades establecidas y elaborar un cronograma y programa de visitas.
- Gestionar los recursos necesarios.
- Capacitar a los supervisores.
- Dar respuesta expedita a los problemas críticos encontrados y seguimiento a aquellos asuntos por resolver a mediano y largo plazo mediante, un informe detallado de los hallazgos identificados al nivel inmediato superior.

El control de calidad externo directo es una de las metodologías para la observación de las condiciones de trabajo de un laboratorio y de las prácticas que se realizan en él. El supervisor o grupo de supervisores deben tener conocimientos administrativos, técnicos, epidemiológicos y la habilidad de establecer buenas relaciones interpersonales, entre otras características. Este método directo ofrece la posibilidad de una capacitación *in situ*.

Se recomienda realizar al menos una visita anual cuando se han observado discordancias reiteradas en un laboratorio, detectadas por supervisión indirecta, especialmente cuando se implementa una técnica o se incorpora nuevo personal capacitado. Entre las limitaciones de este método se encuentran: disponibilidad de tiempo, de movilización, de recursos humanos y económicos.

Control de calidad externo indirecto o supervisión indirecta

Es aquel que se produce a distancia y consiste en la comparación objetiva entre el resultado de las pruebas de rutina emitido por el laboratorio evaluado y el resultado emitido por el laboratorio evaluador; así como la revisión y análisis de la información generada mensualmente por los laboratorios. También incluye la aplicación de paneles desde el LNR a los laboratorios de la Red.

Programa de Evaluación Externa del Desempeño para el método de Baciloscopía

Relectura de laminillas de rutina enviadas desde el laboratorio periférico al laboratorio del nivel inmediato superior (periferia-centro).

Es la comparación de resultados y la evaluación técnica indirecta de laminillas de baciloscopía, preparadas por el laboratorio supervisado en su trabajo rutinario. Es la actividad de control de calidad de las redes de laboratorio de tuberculosis que se realiza con mayor frecuencia.

Para este control de calidad, los LESP deben enviar al LNR, de acuerdo a un programa de calendarización que establecerá este último (Tabla 3), el 10% de sus baciloscopías positivas y el 10% de sus baciloscopías negativas elegidas al azar, previa realización del control de calidad a su red de laboratorios de tuberculosis. Para este último control, los laboratorios periféricos deben enviar mensualmente a su LESP correspondiente el 100% de las baciloscopías positivas y el 10% de las baciloscopías negativas, elegidas al azar.

En el caso de que un LESP procese baciloscopías de diagnóstico a su comunidad cercana o que remplace a un laboratorio periférico en esta actividad, deberá enviar al LNR el 100% de las baciloscopías positivas y el 10% de las baciloscopías negativas elegidas al azar.

Tabla 3. Cronograma de actividades para el PEED

Actividades	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Control de Calidad externo directo o supervisión directa	De acuerdo a las necesidades											
Relectura de laminillas de rutina enviadas desde el Laboratorio Local al LESP	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Relectura de laminillas enviadas del LESP al LNR	Envíos trimestrales de laminillas re-leídas por el LESP al LNR, de acuerdo al calendario difundido en la RNLSPTB											
Envío de un panel de laminillas preparadas en el LNR para su relectura en el laboratorio Efector (Centro-Periferia)	Cada dos años											
Informe mensual de microscopia y cultivo (Local al LESP) y el Concentrado estatal (LESP al LNR)	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Boletín Caminando a la excelencia (Envío de aislamientos del LESP al LNR)	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Cultivo / Informe de rendimiento el cultivo	Cuatrimestral de acuerdo a programa anual											

Control de Calidad de identificación de <i>M. tuberculosis</i> por panel/ Boletín Caminado a la excelencia	Semestral de acuerdo a programación anual
Control de Calidad de Pruebas de Farmacosensibilidad (PFS) de la OMS al LSN	Anual
Control de Calidad de Pruebas de Farmacosensibilidad (PFS)	Anual a los LESP participantes
Control de Calidad del Medio de Cultivo	Anual al azar
Capacitación en servicio	A demanda
Curso de Fortalecimiento de la RNLSP	Anual

A partir del año 2014 el control de calidad que realiza el LNR a los LESP, se lleva a cabo con una periodicidad trimestral, la programación del mismo se comunica a los LESP a través de oficio y se realiza en el mes asignado a cada uno de ellos.

En el caso del laboratorio evaluador, este recibirá las laminillas acompañadas de un oficio con el listado de los resultados de origen, correspondientes al paquete de laminillas enviadas. Se realizará el registro de ingreso y la revisión del material para posteriormente distribuir las laminillas a los supervisores para su re-lectura. La distribución se hará al azar, de tal forma que los supervisores no conozcan los resultados previos. Después se efectuará el cruce de la información, la validación de ésta y la elaboración del resultado final de concordancia. En caso de discordancias, se incluirán las recomendaciones correctivas.

El nivel de concordancia para las baciloscopías positivas y las baciloscopías negativas esperado para la red deberá de ser igual o mayor al 95%. El modelo actual de muestreo de laminillas para el control de calidad se va a mejorar cambiándolo al muestreo por lote. Este muestreo considera la productividad de los laboratorios (número de baciloscopías de diagnóstico y de control que hacen por año) y la positividad (Bk positivo de diagnóstico) y dependiendo de ellos se define cómo controlarlos. Este cambio se irá implementando en el país de manera gradual.

Envío del panel de laminillas preparadas en el LNR, para su relectura en el laboratorio efector (centro-periferia):

Este método complejo evalúa el desempeño y eficiencia del proceso de tinción y de lectura de cada microscopista a través de un panel que incluye laminillas teñidas y sin teñir. Sin embargo, el método no evalúa el desempeño en la elaboración del extendido.

El LNR prepara y envía el panel de laminillas a los laboratorios de la red con una periodicidad de 2 años, el panel consiste de 10 laminillas, de las cuales 5 están teñidas y 5 no, con diferente grado de positividad y algunas negativas. Actualmente se utiliza un panel de complejidad intermedia, sin embargo, la complejidad del panel variará conforme cambie el nivel de la red (*External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy, Association of Public Health Laboratories, 2002*).

El LNR envía a los LESP, por medio de un oficio, las fechas de recepción del listado de los microscopistas participantes de los laboratorios de su red, del envío del panel, de la recepción de resultados de los participantes, el resultado final de los participantes y en caso de aquellos que no aprueben (previa capacitación) la fecha de envío del nuevo panel. Asimismo, el LNR definirá el estatus de cada uno de los participantes (aprobados: calificación de 8 a 10, condicionados: 6 a 7 y reprobados: menor o igual a 5 puntos) y hará la recomendación para el contenido del curso de capacitación (60% práctico y 40% teórico), dirigido a aquellos participantes con estatus de condicionados y reprobados. Los resultados serán informados por medio de un oficio.

La evaluación debe ser individual y sin asesoría para poder evaluar con certeza la habilidad de cada microscopista.

Es importante reiterar que las personas que inician una evaluación deben participar en ella hasta el final; por ejemplo, un participante condicionado debe recibir la capacitación de su LESP y presentarse a la segunda oportunidad de evaluación.

Informe mensual de microscopía y cultivo.

Nivel Local

Este informe debe ser completado por los laboratorios de nivel local (Centros de Salud, Hospitales, etc.), capturado en el sistema de información nacional (SIS) por la jurisdicción correspondiente y enviado al LESP, con periodicidad mensual. Debe incluir el número de pacientes sintomáticos respiratorios examinados, la calidad de las muestras de diagnóstico recibidas, el número de baciloscopías realizadas, así como su resultado y una relación de los casos confirmados.

Informe mensual de microscopía y cultivo: concentrado estatal

Este informe debe prepararlo el LESP, concentrando la información de los laboratorios de su red, y tiene como finalidad conocer y evaluar las actividades referidas. El LESP debe enviar este informe mensualmente al LNR.

El informe incluye la jurisdicción participante con sus laboratorios, los días laborados, los tosedores examinados, diagnóstico de calidad (muestras de diagnóstico recibidas y de ellas las adecuadas; frotis recibidos y de ellos los adecuados), baciloscopías efectuadas, control de calidad de las baciloscopías por relectura. En relación al cultivo se debe informar el número de cultivos realizados, la cantidad de cultivos positivos, negativos y contaminados, entre otra información.

Programa de Evaluación Externa del Desempeño para el método de Cultivo

En el caso de los LESP que sólo realizan cultivo, estos enviarán al LNR aquellos aislamientos con desarrollo y sin contaminación (macroscópica y microscópica), para que el LNR asegure la calidad de los mismos (pureza) y realice la identificación de especie por medio de pruebas enzimáticas/bioquímicas o por el uso de la tira de inmunocromatografía AgMTP64. En caso de no lograr la identificación de la manera referida se solicitará al Departamento de Biología Molecular y Validaciones Técnicas del InDRE que realice esta identificación por medio de las técnicas que considere (Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR - o pruebas de secuenciación).

Informe cuatrimestral del rendimiento del cultivo

Con la intención de conocer la calidad del cultivo realizado en los laboratorios de la RNLSP, se ha implementado en todos los LESP un formato a partir del cual se puede conocer cuánto aporta el cultivo al diagnóstico de tuberculosis pulmonar, cuando la baciloscopía es negativa. También es útil para conocer la calidad del cultivo mediante el índice de contaminación en los cultivos.

Este informe, permite darles seguimiento a los indicadores del cultivo y puede aplicarse a otro tipo de muestras (no pulmonares).

Control de Calidad del Medio de cultivo

Uno de los aspectos más importantes para obtener cultivos de alta calidad es el uso de un medio de cultivo con buena sensibilidad. El medio de cultivo usado en el país tiene tres orígenes: el preparado y distribuido por el InDRE, el casero preparado por cada LESP y el comercial.

En el caso del medio comercial se recomienda solicitar al proveedor un certificado de calidad de cada lote, además del control que le realice el InDRE.

Cada lote del medio preparado por el InDRE es sometido a control de calidad por el Laboratorio de Micobacterias. El control de calidad para el resto de los laboratorios se realiza solicitando a los laboratorios pertenecientes a la red, una vez al año, 12 tubos tomados al azar, de medio Lowenstein-Jensen, que ellos producen o del medio comercial que compran.

A cada lote de 12 tubos a evaluar recibido por el LNR, se le asigna un código. Dos de los tubos de cada lote serán utilizados para observar las características fisicoquímicas, como son color, consistencia, aspecto y pH. El resto son sometidos al proceso de evaluación de su sensibilidad, procedimiento que tarda 5 semanas aproximadamente.

Para conocer la sensibilidad (desarrollo de colonias), los 10 tubos restantes se sembrarán con una suspensión de un cultivo de la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra, ajustada al tubo número 1 del nefelómetro de MacFarland; a partir de esta suspensión se prepararán diluciones decimales-seriadas hasta 1×10^{-5} . Se sembrarán 0.2 ml de la dilución 10^{-5} en 5 tubos del medio de cultivo y 0.2 ml de la dilución 10^{-4} en los 5 tubos restantes. Los tubos inoculados se incubarán a 37 °C y se realizarán lecturas de los mismos a las semanas 3 y 5 para conocer el número de colonias desarrolladas. El análisis de la sensibilidad se realizará conjuntamente con todos los lotes del medio de cultivo participantes. A partir de las lecturas realizadas se obtendrá un promedio y una desviación estándar (DS).

Los criterios de aceptación para el medio de cultivo son los siguientes:

- Sensibilidad aceptable: el promedio del número de colonias de los tubos está dentro del rango de la media $\pm 1DS$. Si la sensibilidad es aceptable, pero si alguna de las características fisicoquímicas está alterada, se harán las recomendaciones pertinentes al laboratorio para mejorarlas.
- Sensibilidad no aceptable: el promedio del número de colonias de los tubos es menor a la media $-1DS$.

En el informe de resultados a los laboratorios con sensibilidad del medio “no aceptable” el LNR proporcionará recomendaciones para investigar la causa. Posteriormente, se solicitará el envío de un nuevo lote de medio, para verificar si el problema se mantiene o sólo fue transitorio. Si el problema se mantiene, se requerirá de una capacitación para preparar el medio de cultivo.

Programa de Evaluación Externa del Desempeño para Pruebas de identificación de *M. tuberculosis*.

La identificación certera del *M. tuberculosis* (M.tb) o el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) permite orientar adecuadamente el tratamiento de un paciente, además, se debe llevar a cabo previamente a las Pruebas de Farmacosensibilidad (PFS). Por ello, es importante que sean implementadas las pruebas de identificación en todos los laboratorios de la Red, siempre que cuenten con las condiciones de bioseguridad necesarias. (Anexo I)

El procedimiento de evaluación por panel para aquellos laboratorios que realizan identificación de *M. tuberculosis* o CMTB por medio de pruebas bioquímicas o por el uso de la tira inmunocromatográfica del AgMPT64 es el siguiente:

Envío de panel (centro-periferia) para la identificación de *M. tuberculosis*

Este control de calidad se lleva a cabo por medio de un panel que se envía dos veces al año a cada laboratorio que realiza las pruebas de identificación. El panel estará compuesto por 5 cepas previamente identificadas que son las siguientes:

M. tuberculosis H37Ra (ATCC 25177) y Micobacterias No Tuberculosas (MNTB) ATCC y/o bien caracterizada ya sea procedentes del panel que este laboratorio recibe de la OMS y/o de un aislamiento clínico identificado por biología molecular, (número de acceso en el *GenBank*). El resultado satisfactorio será mayor al **80% de concordancia**.

En el caso de que en el resultado de un panel la concordancia sea menor al 80%, o presente concordancia del 80% en dos paneles consecutivos por errores técnicos, se llevará a cabo una capacitación en servicio. Luego de la cual el participante deberá resolver un panel complementario en el que deberá alcanzar el 100% de concordancia. Si después de la aplicación de este panel complementario persiste este problema, se les retirará la liberación del diagnóstico, se les recapacitará, reiniciando nuevamente todo el proceso de evaluación.

Cuando se presente un error de origen administrativo (ejemplo: error de transcripción), se emitirá el resultado alcanzado; sin embargo, las intervenciones para corregirlo serán recomendaciones puntuales (no técnicas). Este tipo de error sólo se permitirá una vez debido a que un error administrativo es tan grave como uno técnico en un laboratorio.

El LNR seguirá llevando a cabo las pruebas de identificación para aquellos LESP que no las realicen, ya sea de manera permanente o transitoria. Asimismo, hará diagnóstico de las Micobacterias no tuberculosas (MNTB) apoyándose en el Departamento de Biología Molecular y Validaciones Técnicas del InDRE.

En caso de que el LESP no realice pruebas de farmacosenibilidad y envíe la cepa aislada e identificada al LNR, el Laboratorio de Micobacterias realizará la identificación de especie nuevamente a toda cepa con solicitud de PFS. Esto servirá como un control indirecto de la prueba de identificación de especie en terreno.

Programa de Evaluación Externa del Desempeño para Pruebas de Farmacosenibilidad (PFS) a fármacos antituberculosos de primera línea.

Control de calidad externo al Laboratorio Nacional de Referencia

El LNR participa anualmente en un programa de control de calidad para las pruebas de farmacosenibilidad (PFS) de medicamentos de primera y segunda línea e identificación de especie, organizado por la OPS/OMS, para los laboratorios de referencia nacional reconocidos por la OMS por su buen desempeño como Laboratorios Supranacionales (LSN). La red de laboratorios supranacionales, que incluye a 35 a nivel global; tiene como función asesorar y apoyar a otros países para mejorar la situación de sus redes de laboratorios (gestión de la calidad, asesoría técnica, visitas de evaluación, etc.) y contribuir con la OPS/OMS en la elaboración de lineamientos internacionales.

El Control de Calidad externo consiste en el envío anual al LSN, de un panel de 30 cepas caracterizadas fenotípica y genéticamente, con diferentes patrones de sensibilidad y resistencia, 10 de ellas duplicadas. Los resultados obtenidos se comparan con los resultados de la OMS. Para cada antibiótico se calcula la sensibilidad, especificidad, eficiencia y reproducibilidad.

Control de calidad externo a los Laboratorios que realizan PFS en el país

El objetivo del control de calidad aplicado en la red de laboratorios es conocer la calidad de la identificación y de las PFS a los fármacos antituberculosis de primera línea: Isoniacida (H), Rifampicina (R), Etambutol (E) y Pirazinamida (Z), que ofrecen algunos laboratorios del país, dentro y fuera de la RNLSP, en apoyo al Programa Nacional de Tuberculosis (PNTB).

Este control de calidad se realizará una vez por año, a través del envío de un panel. El LNR invitará a los laboratorios que cuenten con las condiciones de bioseguridad necesarias y que realizan PFS en el país, a participar en el programa de control de calidad.

Se producirán paneles, con 20 cepas cada uno, las cuales son resiembras de cepas provenientes del panel que la OMS aplica anualmente a los LSN. Las cepas estarán identificadas por un código asignado al azar que sólo conocerá el laboratorio coordinador (LNR) y serán enviadas en un volumen de 1.8 ml de medio de Middlebrook 7H9, bajo estrictas medidas de bioseguridad para material de alto riesgo biológico.

Para cada antibiótico el laboratorio controlado referirá en el formato de reporte sus resultados: sensible, resistente, contaminado, sin desarrollo, sin resultado y prueba invalidada, así como el método empleado y las concentraciones utilizadas. El LNR, al recibir el resultado lo comparará con el resultado dado por la OMS y emitirá como resultados finales: verdadero resistente, falso resistente, verdadero sensible, falso sensible. Para cada antibiótico se calculará: sensibilidad, especificidad, eficiencia y reproducibilidad. Además, si es posible, se hará un análisis y comparación de los resultados entre todos los laboratorios participantes y se enviarán los resultados con el fin de que puedan comparar su desempeño con el resto de los participantes, conociendo sólo la identidad de su laboratorio, el resto de los laboratorios se manejará con clave.

Como complemento a la evaluación por panel, se solicitará una vez al año a cada laboratorio de la RNLSP para el diagnóstico de tuberculosis, enviar un informe con la cantidad de PFS que realizó, así como los resultados clasificados en pacientes considerados como casos nuevos o como previamente tratados.

Control de calidad externa a la prueba de Xpert MTB/RIF

Con la finalidad de evaluar el buen funcionamiento del equipo, insumos y capacidad del operador, se lleva a cabo un control de calidad externo por medio del envío de un panel, como complemento a la verificación *in situ* que cada laboratorio debe hacer durante el proceso rutinario de muestras.

El control de calidad se realizará una vez al año, a través del envío de un panel (suspensiones bacilares inactivadas) generado a partir de resiembras de cepas originales pertenecientes a los rounds que la Organización Mundial de la Salud (OMS) envía para la evaluación de los Laboratorios Supranacionales en pruebas de fármacosensibilidad, las cuales son caracterizadas fenotípica y genotípicamente por el Coordinador de los Laboratorios Supranacionales, Instituto de Medicina Tropical de Bélgica.

El Laboratorio de Micobacterias del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), invitará a los LESP que hayan implementado la prueba molecular como una alternativa diagnóstica en tuberculosis.

Se integrarán paneles con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) con patrones diferentes de sensibilidad a rifampicina y cepas de micobacterias no tuberculosas (MNT), completando un total de 5 aislamientos a evaluar. Las cepas serán elegidas en consenso entre los LSN para que, en caso de realizar un análisis, los resultados sean comparables entre sí. Las suspensiones bacilares inactivadas (1 ml por cepa) estarán identificadas con códigos al azar asignados por el Laboratorio que aplica el panel.

La prueba realizada a cada una de las suspensiones bacilares inactivadas incluirá la detección de MTB con o sin resistencia a rifampicina, la correcta clasificación de la cepa de MNT y la identificación de la sonda mutada. Este control permitirá identificar las fallas que se presenten en el equipo, los insumos (cartuchos) o las debidas al operador.

Además de la evaluación por panel descrita, el LNR solicitará a cada laboratorio participante su información anual sobre las pruebas realizadas, que deberá enviar durante el primer mes del año siguiente al cierre.

Criterios para la evaluación del Boletín Caminado a la Excelencia

El Boletín Caminando a la Excelencia, entre otras cosas, es una herramienta que permite al laboratorio conocer y comparar el desempeño en pruebas diagnósticas a nivel nacional. Las pruebas diagnósticas que se ofertan en la RNLSP deben estar integradas al marco epidemiológico actual de la tuberculosis en el país.

En este contexto es necesario que la baciloscopía, el cultivo, la identificación de especie y las pruebas de farmacosenibilidad de primera y segunda línea estén disponibles para el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes que lo requieran.

La RNLSP presentaba un rezago diagnóstico en la identificación de especie de *M. tuberculosis* o CMTB que debe acompañar al cultivo.

Con la finalidad de incentivar la implementación de estas técnicas, a partir de 2017 la calificación del Boletín Caminando a la Excelencia se modificó, de forma que:

- Aquellos laboratorios que envíen al LNR los aislamientos para identificar, debido a que ellos no lo hacen, tendrán una calificación final que será la calificación alcanzada en su evaluación, menos el 10%.
- Para aquellos LESP que realicen PFS sin identificar, a los resultados alcanzados en el Boletín Caminando a la Excelencia se les restará un 20%.
- Finalmente, aquellos que participen en el Boletín Caminando a la Excelencia por medio de la aplicación de los paneles para identificación, tendrán el 100% del resultado alcanzado.

CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RNLSP

Generalidades

Para la liberación de una prueba diagnóstica de un laboratorio, se requiere:

- Contar con la infraestructura, equipos y reactivos.
- Personal capacitado (en el LNR).

- Participar en el PEED correspondiente a cada prueba.

Pruebas de identificación de *M. tuberculosis* o CMTB

Para alcanzar la liberación de estas pruebas diagnósticas, el LESP debe pasar las siguientes dos etapas:

Control de calidad referido (periferia-centro)

Durante 3 meses, aquellos LESP que realicen identificación por medio de pruebas bioquímicas o por el uso de la tira de inmunocromatografía del AgMPT64, deberán enviar al LNR el resultado obtenido y la cepa aislada, para que se realice de nuevo la identificación con la finalidad de evaluar la concordancia.

Para los casos en los que los resultados sean discordantes, se enviará la cepa problema al Departamento de Biología Molecular del InDRE para confirmar el resultado final. Si durante este periodo de 3 meses la concordancia de resultados de las cepas aisladas y recibidas en el LNR fuera mayor al 80%, se invitará al LESP a participar, dos veces por año, en una evaluación por medio de paneles de identificación. En caso contrario (concordancia igual o menor al 80%) se le invitará a una capacitación en servicio para mejorar el rendimiento de sus pruebas y reiniciar el proceso de evaluación.

Envío de panel (centro-periferia) para identificación de *M.tuberculosis* o CMTB

Este control de calidad se llevará a cabo por medio de un panel (referido en Control de Calidad) que se enviará dos veces al año a cada laboratorio que realiza las pruebas de identificación. En caso de que los resultados de estos paneles consecutivos fueran satisfactorios (**>80% de concordancia**) se procederá a liberar el diagnóstico en el LESP.

Si en el resultado de un panel la concordancia es menor al 80%, o presente concordancia del 80% en dos paneles consecutivos, se llevará a cabo una capacitación en servicio. Si después de la capacitación persiste este problema se retirará la liberación del diagnóstico, reiniciando nuevamente todo el proceso de evaluación.

Una vez liberado el diagnóstico, el laboratorio dejará de enviar resultados y cepas al LNR para conocer su pureza e identificarlos. A partir de este logro, participará en el Boletín Caminando a la Excelencia por medio de la aplicación de los paneles dos veces al año.

El LNR seguirá realizando las pruebas de identificación para aquellos LESP que no las realicen de manera permanente o transitoria. Al igual que el diagnóstico de las Micobacterias no tuberculosas (MNTB).

Pruebas de farmacosenibilidad (PFS) a fármacos antituberculosis de primera línea

Para la liberación de estas pruebas, se realizan dos etapas de controles indirectos. En la primera, luego de la capacitación en servicio en el LNR, el laboratorio capacitado enviará al LNR las cepas de su trabajo rutinario que fueron procesadas con PFS junto con los resultados obtenidos. El LNR repite la PFS y establece la concordancia de los resultados de ambos laboratorios. En caso de identificar discordancias (que serán resueltas por el método de las proporciones), se le informará de las mismas señalándole los motivos de las diferencias.

En esta etapa el LESP debe obtener una concordancia del 80% hasta el momento en que se le envíe el panel (referido en el apartado PEED de PFS). Para ello, se le hará una invitación por escrito.

En caso de que la concordancia sea menor al 80% se le invitará a una nueva capacitación en servicio. En la aplicación del panel, que es la segunda etapa de este proceso, el laboratorio que obtenga resultados satisfactorios en la eficiencia para Isoniacida (de 89 a 97%) y para Rifampicina (de 95 a 99%) en un panel, se considerará apto para liberarle el diagnóstico de las PFS de tuberculosis.

Es imprescindible que el laboratorio realice la identificación de especie previamente a la realización de las PFS a fármacos antituberculosis ya que estas pruebas son específicas para *M. tuberculosis*. En caso de que no sea así, el laboratorio deberá enviar la cepa aislada al LNR de tuberculosis, para que realice la identificación y luego efectuar la PFS. Este escenario retrasa los tiempos de emisión de resultado, por lo tanto la implementación de las pruebas de identificación de *M. tuberculosis* en un laboratorio de este nivel es imprescindible.

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE

Las cepas conservadas en el banco del laboratorio de Micobacterias provienen de aislados que cumplen con las siguientes características:

- Cepas puras macro y microscópicamente.
- Cepas jóvenes (entre 28-30 días de desarrollo).
- Estas son conservadas en medio líquido Middlebrook 7H9+ADC y 0.2% glicerol a -70 °C.

Se almacenan las que tengan las siguientes características:

- Cepas de *M. tuberculosis* farmacorresistentes.
- Cepas monorresistentes a Pirazinamida (Z).
- Cepas de *M. tuberculosis* con resistencia a fármacos antituberculosis de segunda línea.
- Cepas identificadas como Micobacterias no tuberculosas patógenas.

- Cepas de *M. bovis*.
- Cepas procedentes del panel que la OMS envía cada año para el control de calidad de la prueba de farmacosenibilidad de primera y segunda línea e identificación de especie.
- Cepas de la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en tuberculosis 2008-2009.
- Cepas procedentes de las encuestas de farmacorresistencia para control de calidad de los países que son apoyados por el InDRE como LSN.
- Cepas de micobacterias ATCC.

Para respaldar la información de cada cepa, se dispone de una base de datos de identificación, que contiene los resultados de las pruebas realizadas para la identificación y las pruebas de sensibilidad. Asimismo, se dispone de las historias clínicas, bitácoras de registro de resultados, así como de los resultados de biología molecular. Las cepas de la encuesta cuentan con todo el análisis realizado durante el estudio y las cepas de la OMS con la evaluación realizada.

Solicitud de cepas al LNR

En el caso de que un LESP requiera una cepa (bien caracterizada o ATCC) para control de calidad, éste deberá enviar una solicitud al LNR y garantizar que cuenta con las medidas de bioseguridad necesarias para el uso y almacenamiento de la cepa además de asegurar su biocustodia. Una vez autorizada, se enviará la cepa lo más pronto posible, cumpliendo los trámites fijados por el área de Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública del InDRE.

Conservación y Eliminación

Las cepas se deberán utilizar y conservar de acuerdo a la metodología elaborada por el Laboratorio de Micobacterias del InDRE.

Para desechar las cepas de Micobacterias ya procesadas, éstas se inactivarán con calor durante 60 minutos a 15 libras de presión y posteriormente deberán eliminarse como RPBI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aziz, M. A. External quality assessment for AFB smear microscopy. Association of Public Health Laboratories, Washington, DC. 2002.
2. Caminero LJ. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Francia: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) 2003.
3. Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Rev Tuberc 1963 ; 27 : 217-72
4. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2011 Suppl:60
5. Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/02/1917, Última Reforma D.O.F. 15/02/2012.
6. Decreto que reforma, adiciona y deroga diversas disposiciones del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. DOF, 2 de febrero de 2010.
7. European Committee for Standardization. Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011
8. Farga V, Caminero JA. Tuberculosis. 3a ed. Chile: Mediterraneo editores, 2012.
9. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. The Handbook. Global Edition. StopTB Partnership GLI 2013).
10. Laszlo A Et al. Quality Assurance programme for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. Int J Tuberc Lung Dis 6 (9): 748-756. 2002
11. Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación. Última reforma publicada DOF 17/11/2017.
12. Ley General de Responsabilidades Administrativas. D.O.F. 18/VII/2016.
13. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2012. 6; 61:1-102
14. Manual de Procedimientos de Laboratorio InDRE/SAGAR. 18.Tuberculosis.1996
15. Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico. SSA.2003
16. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis. DOF: 13/11/2013
17. Norma Oficial Mexicana, NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de febrero de 2013.

18. Organización Mundial de la Salud. Definiciones y marcos de trabajo para la notificación de tuberculosis. Switzerland: WHO Press; 2013.
19. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de Tuberculosis. Switzerland: WHO Press; 2013.
20. Organización Panamericana de la Salud. Normas y guía técnica, Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis, Parte 1, Baciloscopía. EUA: Organización Panamericana de la Salud 2008.
21. Organización Panamericana de la Salud. Normas y guía técnica, Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis, Parte 2, Cultivo. EUA: Organización Panamericana de la Salud 2008.
22. Organización Panamericana de la Salud-Agencia Española de Cooperación Internacional. Capacitación para la Gestión de las Redes de Laboratorio en los Programas Nacionales de Control de la Tuberculosis. EUA: Organización Panamericana de la Salud 2010.
23. Palomino JC, Cardoso Leão S, Ritacco V. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care (e-book) Institute of Tropical Medicine; 2007 (consultado el 1 de enero de 2015) disponible en: <http://www.pneumoniiasi.ro/student/tuberculosis2007.pdf>
24. Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024. Diario Oficial de la Federación.
25. Secretaría de Salud. Guía para la atención de personas con Tuberculosis Resistente a Fármacos. México: Secretaría de Salud; 2010
26. Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2019-2024. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. México: Secretaría de Salud; 2014.
27. Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud 2019-2024. Diario Oficial de la Federación DOF: 12/12/2013.
28. Secretaría de Salud-Dirección General de Epidemiología. Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015
29. Secretaría de Salud-Dirección General de Epidemiología. Lineamientos para programas de evaluación externa del desempeño de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015
30. Secretaría de Salud-Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la tuberculosis, DGAE. México: Secretaría de Salud; 2015.
31. U.S. Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th- ed. USA: CDC-NIH; 2009
32. World Health Organization. Xpert MTB/RIF Implementation manual. Technical and operational “how -to” practical considerations. Switzerland: WHO Press; 2014.
33. 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. WHO Press; 2013.
34. World Health Organization. Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. WHO Press; 2010.
 35. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances. Switzerland: WHO Press; 2012.
 36. World Health Organization. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO Press; 2008.
 37. World Health Organization. Tuberculosis laboratory biosafety manual. Switzerland: WHO Press; 2012.
 38. World Health Organization. Using the Xpert MTB/RIF assay to detect pulmonary and extra pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults and children. Expert group meeting Report. WHO Press; 2013.
 39. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. Switzerland: WHO Press; 2004.

ANEXOS

ANEXO I. BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE TUBERCULOSIS

De acuerdo a la OMS, *M. tuberculosis* está clasificado como un patógeno del grupo de riesgo 3, sin embargo, el manejo del material biológico ofrece diferente riesgo, de acuerdo al método de laboratorio usado. Por lo que se debe hacer una evaluación de riesgo para cada procedimiento e identificar así las medidas de bioseguridad adecuadas (Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de Tuberculosis. Switzerland: WHO Press; 2013).

Para la evaluación de riesgo se debe considerar al menos lo siguiente: la carga bacilar en el material biológico (muestras o cultivos), la viabilidad del bacilo, si el manejo del material es propenso a generar aerosoles, el número de maniobras que podrían generar aerosoles infecciosos para cada técnica, la carga de trabajo del laboratorio, las características epidemiológicas de los pacientes y las habilidades técnicas del personal del laboratorio, entre otras.

Las buenas prácticas de laboratorio y el uso correcto del equipo de protección personal definido para cada técnica, así como la infraestructura correcta (incluyendo el mantenimiento preventivo y correctivo del equipo) son requisitos básicos para mitigar el riesgo de exposición a un mínimo posible.

Respecto al personal, éste debe usar batas con abertura frontal en todo momento dentro del laboratorio. En los procedimientos de mayor riesgo, se deberán usar batas de laboratorio desechables, con abertura en la espalda, manga larga y puño elástico. Siempre que se maneje cualquier muestra potencialmente infecciosa, se deberán usar guantes y se cambiarán con regularidad, sin reutilizarse. El personal siempre deberá lavarse las manos al quitarse los guantes y al salir del laboratorio. En todo momento deberán estar disponibles respiradores N95 para su uso durante actividades que impliquen el manejo de cultivos o para la atención de derrames.

También es importante que el personal que se va a incorporar a trabajar en un laboratorio de tuberculosis cuente con una revisión médica inicial. Posteriormente, se realizarán revisiones anuales a todo el personal, para conocer su estado de salud, debido a que existen enfermedades que pueden aumentar el riesgo de padecer tuberculosis.

En general las recomendaciones mínimas de bioseguridad, respecto a la infraestructura, para los diferentes procedimientos o técnicas son las siguientes:

Preparación de muestras para baciloscopías

- Ventilación adecuada.
- El área técnica del laboratorio debe estar separada del área administrativa.
- El acceso al laboratorio debe restringirse sólo al personal autorizado.
- El área de preparación del extendido debe estar separada de otras áreas de trabajo del laboratorio.

Procesamiento de muestras para inoculación de cultivo

- El área técnica del laboratorio debe estar separada del área administrativa.
- El acceso al laboratorio estará restringido al personal autorizado.
- De preferencia, la infraestructura deberá ser de material impermeable (pisos, paredes, techo, mesas de trabajo, etc.)
- Las ventanas deben estar permanentemente cerradas. El suministro de aire deberá ser de manera pasiva o activa, pero sin recirculación.
- La centrífuga debe contar con accesorios de bioseguridad.

El manejo de material biológico se debe realizar en una cabina de seguridad biológica (CSB) Clase II Tipo A2. La CSB deberá estar instalada correctamente, certificada y con un programa de mantenimiento (preventivo y correctivo) vigente. Si es posible, el laboratorio deberá contar con un flujo de aire que circule del área limpia al área sucia (presión negativa).

Manipulación de cultivos (identificación y PFS)

- Contar con todos los requisitos previamente mencionados para los procedimientos anteriores.
- De preferencia el laboratorio deberá contar con doble puerta de entrada.
- Se deberá disponer de una autoclave en el laboratorio o cerca de él para eliminar los desechos infecciosos.

Clasificación y eliminación de RPBI

La etapa de clasificación es la parte fundamental en el manejo de Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos (RPBI), para evitar riesgos a la salud y daños al medio ambiente, lo cual conlleva a una mejor administración de los recursos, reduciendo así los gastos de operación. Por lo tanto, los RPBI deben ser identificados, separados y envasados inmediatamente después de su generación, es decir, en el mismo lugar en el que se originan y por el personal del laboratorio.

Es necesaria la cooperación e interacción entre el personal de laboratorio, la brigada de recolección y personal de limpieza, así como, una estrecha

vinculación y participación del personal directivo y administrativo del laboratorio para la adquisición de materiales adecuados con el fin de minimizar y evitar riesgos innecesarios.

De acuerdo a su origen y generación los RPBI se clasifican de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos-biológicos). Se eliminan, previamente esterilizados, de la siguiente manera:

Bolsa roja

Material y recipientes que contengan muestras de esputo con sangre fresca o que estén totalmente derramados.

Los recipientes de plástico con cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos.

Envases de plástico con material contaminado (muestras)

Jeringas contaminadas sin aguja, en caso de LCR u otros líquidos

Asas desechables, pipetas de transferencia contaminadas con material biológico

Equipo de protección personal (guantes, respirador, bata desechable, etc.)

Gasas, o material absorbente los cuales estuvieron en contacto con muestras y cepas

Recipiente hermético rojo

Sangre líquida

Bolsa amarilla

Biopsia. Tejidos y órganos

Recipiente hermético amarillo

Patológicos en estado líquido (orina)

Recipiente rígido de polietileno rojo

Objetos punzocortantes (laminillas)

Pipetas Pasteur

Material de vidrio que haya estado en contacto con humanos o animales o sus muestras

biológicas durante el diagnóstico y tratamiento.

Bolsa Transparente

Material no contaminado (guantes limpios).

Empaques de materiales de laboratorio.

Para ampliar este tema recomendamos consultar al “Manual de Bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis”, OMS, 2013.

ANEXO II. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Pruebas diagnósticas

Son las pruebas que cotidianamente se realizan en los laboratorios que conforman la Red Nacional:

- Baciloscopía por tinción con la técnica de Ziehl-Neelsen y microscopía de fluorescencia LED.
- Cultivo por método de Petroff, Petroff modificado y Ogawa Kudoh en medio sólido (Lowenstein-Jensen, Stonebrink y Ogawa Kudoh) y medio líquido (MGIT 960).
- Identificación de la especie *M. tuberculosis* y CMTB por medio de métodos bioquímicos y enzimáticos (producción de niacina, reducción de nitratos y catalasa a temperatura ambiente y a 68 °C) o por uso de tira inmunocromatográfica AgMPT64.
- Pruebas de sensibilidad por el método fluorométrico MGIT TB 960 para fármacos de 1ª y 2ª línea.
- Método de las proporciones en medio Lowenstein-Jensen para medicamentos antituberculosis de 1ª línea. Prueba de la Pirazinamidasasa.
- Método de las proporciones en medio Middlebrook 7H10. Prueba indirecta para medicamentos antituberculosis de 2ª línea.
- Prueba Xpert MTB/RIF.
- Prueba Xpert MTB/RIF Ultra
- Ensayos de Hibridación con Sondas en Línea (LPA)

Baciloscopía. Tinción por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen

Método diagnóstico para detectar la presencia de BAAR en una muestra. El procedimiento se basa en la capacidad que tienen las micobacterias, debido al alto contenido de ácidos micólicos en su pared, para incorporar y retener ciertos colorantes después de ser tratadas con ácidos y alcohol, propiedad conocida como ácido-alcohol-resistencia.

La elaboración del frotis debe realizarse exclusivamente en el laboratorio o por personal capacitado por el laboratorio correspondiente. Su empleo está indicado prioritariamente en todo paciente sintomático respiratorio o en caso probable, para confirmar el diagnóstico de tuberculosis y se realiza en tres muestras seriadas de expectoración y en cualquier muestra clínica excepto orina.

En pacientes donde la primera serie de tres baciloscopías es negativa, no se confirma otro diagnóstico y en quienes se sospeche tanto clínica como radiológicamente de tuberculosis, se debe solicitar otra serie de tres baciloscopías y cultivo. Para control de tratamiento de un paciente que haya

sido identificado mediante baciloscopía positiva, mediante una baciloscopía mensual. La baciloscopía del sexto mes permite clasificar al paciente como curado.

Procedimiento

El procedimiento se realiza de acuerdo a las medidas de bioseguridad establecidas en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte I. OMS/OPS. 2008

Preparación del extendido

Los portaobjetos se numeran con un lápiz de punta de diamante, anotando el número asignado a la muestra y las siglas del nombre del paciente.

Detrás de un mechero, tomar y cortar un aplicador de madera de la parte superior, de manera que se formen astillas; colocarlo entre el pulgar y el índice de la mano y con el extremo irregular seleccionar la parte útil de la muestra, constituida por la porción mucopurulenta o más densa de la misma. Repetir esta acción una o dos veces más.

Colocar la partícula sobre el portaobjetos y realizar un frotis de aproximadamente 2 cm de largo por 1 cm de ancho, efectuando movimientos circulares del centro hacia la periferia para obtener una película uniforme. Dejar secar a temperatura ambiente. Posteriormente, ya seco el frotis se debe de fijar por medio de calor, pasando rápidamente la laminilla dos o tres veces sobre la flama de un mechero.

Tinción del extendido

La técnica utilizada es la de Ziehl-Neelsen que consta de las siguientes etapas:

Coloración

En cada lote de láminas a teñir, siempre deben incluirse dos láminas (una positiva y una negativa previamente preparadas) para el control del método. Este control debe ser registrado en una bitácora.

Para laboratorios que hacen 10 o más baciloscopías por día este control es semanal, si el laboratorio hace menos de 10 baciloscopías por día, el control debe ser diario. Además, también debe incluirse este control en cada cambio de lote de colorante.

Disponer los frotis de izquierda a derecha con una distancia mínima de separación de 5mm una de otra, conservando el orden numérico sobre las varillas de vidrio dispuestas en una tarjeta de coloración, con el extendido hacia

arriba y el tercio numerado hacia el operador, cubrir la superficie del extendido con fucsina fenicada previamente filtrada.³

Con la llama de un hisopo de algodón humedecido en alcohol calentar suavemente por debajo de las láminas cubiertas por la fucsina, hasta que se produzca emisión de vapores blanquecinos visibles; dejar de calentar y repetir la operación por dos veces más. En ningún caso la fucsina debe hervir o secarse sobre la lámina, si ocurre esto último debe reponerse el colorante. Esta operación de calentar tres veces seguidas hasta la emisión de vapor toma habitualmente alrededor de 5 minutos, que es el tiempo adecuado de contacto entre el extendido y el colorante.

Eliminar la fucsina tomando el portaobjetos por los bordes del extremo numerado, entre el pulgar y el índice o con una pinza, inclinándolo hacia delante y lavándolo con agua destilada a baja presión. Girar la lámina para lavar la cara inferior, eliminando la fucsina que ha escurrido hacia ella.

Decoloración

Cubrir el extendido con una solución de alcohol-ácido durante un minuto. Cuando la solución decolorante adquiere una coloración roja se lava con agua destilada y si es necesario se decolora nuevamente durante un minuto. Eliminar el alcohol-ácido lavando la lámina con agua destilada a baja presión.

Se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas conservan sólo un ligero tinte rosado.

Coloración de contraste

- Cubrir la superficie del extendido con azul de metileno durante 1 minuto.
- Eliminar el azul de metileno y lavar el portaobjetos con agua destilada a baja presión, tanto por la superficie del extendido como por la cara inferior.
- Limpiar el resto del colorante de la cara inferior con un algodón empapado en solución de alcohol-ácido.
- Dejar secar las láminas ya teñidas a temperatura ambiente.

Observación microscópica

Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el extremo más cercano a la numeración del extendido, con un cuentagotas y sin tocar la superficie del portaobjetos. Enfocar el microscopio acercando el objetivo de 10x o 40x antes de usar el objetivo de inmersión (100x) para encontrar el área adecuada.

³ Los reactivos utilizados deben ser preparados de acuerdo al Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico. SSA.2003. Es conveniente tener una bitácora donde se registren la preparación y uso de los colorantes.

Después de ubicar el área, enfocar con la lente de 100x ayudándose con el tornillo micrométrico. Seguir una pauta uniforme de observación, leyendo de izquierda a derecha del extendido (tratando de recorrer toda la superficie del frotis) un mínimo de 100 campos útiles⁴ y emitir el informe (Tabla All.1)

Tabla All.1 Interpretación de los resultados de la baciloscopía

Informe	Resultado
Negativo (-)	No se observan bacilos ácido-alcohol resistente en 100 campos microscópicos.
De 1 a 9 BAAR*	Informar el número de bacilos en 100 campos observados. Menos de un bacilo por campo en promedio (de 10 a 99 bacilos), en 100 campos observados.
Positivo (+)	De uno a diez bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.
Positivo (++)	Más de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados.
Positivo (+++)	Más de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados.

* En caso de encontrarse menos de 5 bacilos en 100 campos se recomienda:

- Ampliar la lectura a 200 campos.
- Si con esa lectura no se encuentran más bacilos, hacer otro extendido de la misma muestra, tratando de elegir partículas purulentas.
- Si la lectura del segundo extendido no modifica el resultado del anterior, la muestra debe informarse con número exacto de bacilos observados, consignando en el libro de registro el hallazgo y se deberá solicitar una nueva muestra.
- Cultivar o enviar para cultivo estas muestras.

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

LED Microscopía de fluorescencia

Esta microscopía es 10% más sensible que la microscopía de campo claro, y tiene ventajas cualitativas, operacionales, de costo y de carga de trabajo. La OMS recomendó un cambio paulatino por fases, para pasar de la microscopía de campo claro a la de fluorescencia con LED en la red de laboratorios. Esta modalidad de microscopía se recomienda para un laboratorio con una alta carga de trabajo.

Procedimiento

⁴ Se considera campo microscópico útil aquel en el cual se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células ciliadas)

Reactivos (para su preparación, consultar Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. The Handbook. Global Edition. StopTB Partnership GLLI 2013).

- Auramina al 0.1%
- Alcohol ácido al 0.5%
- Azul de metileno al 0.3%

Metodología

Colocar las laminillas separadas (5 mm de separación como mínimo), en orden, sobre el puente de tinción ubicado sobre una tarja de acero inoxidable.

1. Cubrir las laminillas completamente con auramina filtrada.
2. Dejar actuar el colorante en las laminillas, mínimo 20 minutos.
3. Enjuagar cuidadosamente cada laminilla con agua, evitar salpicar las laminillas aledañas. Eliminar el exceso de agua.
4. Adicionar alcohol ácido a cada laminilla, dejándolo entre 1 a 2 minutos.
5. Enjuagar cuidadosamente cada laminilla con agua, evitar salpicar las laminillas aledañas. Eliminar el exceso de agua.
6. Cubrir cada laminilla con azul de metileno por 1 minuto
7. Enjuagar cuidadosamente cada laminilla con agua, evitar salpicar las laminillas aledañas. Eliminar el exceso de agua.
8. Secar al aire lejos de la luz del sol.
9. Leer una vez que las laminillas estén completamente secas.

Examen del frotis

Es importante leer las laminillas el mismo día que fueron teñidas. En esta tinción los bacilos se ven amarillos brillantes contra un fondo oscuro; aunque en algunos casos dependiendo del filtro se ven verdes. Use el objetivo de 20x para revisar el frotis y con el objetivo de 40x confirme presencia de bacilos.

Los frotis serán examinados de una forma sistemática para asegurar el reporte de un área representativa de éste. Antes de reportar un resultado (Tabla AII.2) negativo se deberá examinar la mayor parte de una línea del frotis (aproximadamente 20 campos). Cuando el frotis ha sido leído, se almacena inmediatamente en una caja cerrada, para cuando sea requerido durante el control de calidad de baciloscopía.

Los bacilos se observan largos, delgados, ligeramente curvos, pero variables en forma e intensidad de tinción. La tinción de estos deberá ser uniforme, puede contener uno o más espacios, o tener una apariencia granular. Los

bacilos pueden presentarse de manera individual, o en pequeños grupos que contienen pocos bacilos, o muy raramente formando grandes cúmulos.

En los extendidos teñidos, se pueden presentar artefactos fluorescentes, los cuales no tienen una típica figura de bacilos, y algunas veces tienen diferente color.

Tabla AII.2 Escala de reporte en el examen de frotis

Lectura con el objetivo de 20X	Lectura con el objetivo de 40X	Resultado
No hay BAAR* en una línea	No hay BAAR en una línea	No se observan BAAR
1-4 BAAR en una línea	1-2 BAAR en una línea	Requiere confirmación**
5-49 BAAR en una línea	3-24 BAAR en una línea	Contable
3-24 BAAR en un campo	1-6 BAAR en un campo	1+
25-250 BAAR en un campo	7-60 BAAR en un campo	2+
>250 BAAR en un campo	>60 BAAR en un campo	3+

* Bacilo Ácido Alcohol Resistente, **Se requiere confirmación por otro técnico, o lectura en otro frotis

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Cultivo

El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico de los conocidos en la actualidad para detectar la presencia de micobacterias y en particular de *M. tuberculosis*, en una muestra determinada.

Su empleo está indicado en los siguientes casos:

- Para el diagnóstico, en caso de sospecha clínica y radiológica de tuberculosis pulmonar con resultado negativo de tres baciloscopías de expectoración.
- En los casos de sospecha de tuberculosis de localización extrapulmonar.
- En todo caso en el que se sospeche tuberculosis renal o genitourinaria.
- Para el diagnóstico en casos de sospecha de tuberculosis en enfermos con VIH/SIDA y con Diabetes
- En caso de sospecha de tuberculosis en niños.
- En pacientes sujetos a tratamiento estrictamente supervisado, en quienes al 2º mes persiste la baciloscopía positiva.
- Para confirmar el fracaso de tratamiento.
- Para el seguimiento bimensual del tratamiento de los casos de tuberculosis farmacorresistentes.

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

Mediante la descontaminación de la muestra se elimina la flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras. Esta flora se multiplica con mayor velocidad e impide el desarrollo adecuado del bacilo. La muestra debe homogeneizarse, especialmente el esputo, con el fin de lograr su licuefacción y liberar el bacilo del moco, así como material celular y tejido que puedan acompañarlo.

El empleo de descontaminantes adecuados además de homogeneizar la muestra, permite la destrucción de los gérmenes asociados, conservando la viabilidad del bacilo.

A partir de 2013, se implementó la Técnica de Petroff modificada, con la finalidad de sustituir a la Técnica de Petroff que se utilizaba desde hace tiempo en la Red de Laboratorios del país. Se hizo debido a que la técnica modificada se considera que es una descontaminación menos drástica que permite la recuperación de un mayor número de cultivos positivos.

A finales de 2013 y principios de 2014, el Laboratorio de Micobacterias del InDRE (LNR) llevó a cabo la validación de la técnica, comprobando los buenos resultados en la recuperación de los cultivos. Por este motivo, el LNR envió estos resultados a los laboratorios de la Red, con la indicación de que lo implementaran y lo validaran en cada Estado.

Actualmente, en la Red Nacional de Laboratorios se está llevando a cabo esta transición, por lo que algunos laboratorios ya la implementaron y otros aún están utilizando la técnica de Petroff anterior.

El reemplazo oficial de la técnica se llevará a cabo, hasta que todos los laboratorios de la Red que hacen la técnica de cultivo, la hayan validado y los resultados sean los esperados.

Cuando un laboratorio no cuenta con la infraestructura adecuada para realizar el cultivo (área o espacio de contención, gabinete de bioseguridad clase II, incubadora, centrífuga, etc), puede realizar la técnica de cultivo Ogawa Kudoh.

Cultivo por el método de Petroff

El bacilo de la tuberculosis es más resistente que los gérmenes comunes al tratamiento con descontaminantes, aunque alguna proporción de bacilos muere durante el procedimiento. Este método emplea como descontaminante una base fuerte, el hidróxido de sodio (NaOH), que además de eliminar la flora asociada, permite homogenizar la muestra, especialmente el esputo, a fin de

lograr su licuefacción y liberar al bacilo del moco, material celular y tejido que puedan acompañarlo. Las muestras consideradas estériles como LCR, sinovial, pleural, líquido ascítico entre otros, para su procesamiento, si el volumen lo permite, se deben dividir en dos partes. Una parte se siembra directamente y el resto se descontamina siguiendo el procedimiento descrito más adelante en muestras de esputo. En el caso de biopsias, macerar previamente la muestra en un mortero estéril con arena. Las orinas y otros líquidos, concentrarlos mediante centrifugación durante 30 minutos a 3000 g. Posteriormente, seguir el procedimiento descrito a continuación.

Procedimiento

El procedimiento se realiza de acuerdo a las medidas de bioseguridad establecidas en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte II Cultivo. OMS/OPS. 2008

1. Trabajar dentro del gabinete de bioseguridad clase II. Enumerar las muestras colocadas en línea horizontal sobre la mesa de trabajo.
2. Colocar en una gradilla una cantidad igual de tubos de centrífuga estériles, numerados en la misma secuencia que los recipientes que contienen las muestras.
3. Colocar en cada tubo aproximadamente 2 ml de la muestra, vaciándola directamente en el tubo procurando no tocar los bordes del tubo.
4. Agregar a cada tubo un volumen igual al de la muestra, de hidróxido de sodio (NaOH) al 4% con rojo de fenol incorporado (Manual de Procedimientos de Laboratorio InDRE/SAGAR. 18. Tuberculosis. 1996) y ajustar firmemente la tapa del tubo, ya que cuando se agita se producen aerosoles que son peligrosos para el operador.
5. Si se cuenta con agitador tipo vórtex, agitar los tubos 20 segundos antes de incubar a 37 °C durante 15 minutos.
6. La agitación de la muestra también puede hacerse manualmente a intervalos de 5 minutos, durante la incubación de 15 minutos.
7. Terminada la incubación, centrifugar a 3,000 g por 15 minutos, a una temperatura de 4 a 8 °C. Durante este proceso en el que se producen aerosoles debe cuidarse en forma especial el cierre hermético de los tubos y de la centrífuga.
8. Dejar reposar los tubos 5 minutos luego de detenida la centrífuga.
9. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante en un dispositivo a prueba de salpicaduras que contenga fenol al 5%.
10. Neutralizar el sedimento con ácido clorhídrico uno normal (HCl 1N) agregando gota a gota hasta el vire de color, antes de sembrar. El proceso de neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH no sea menor de 6.5 ni mayor de 7.2 y para que no haya necesidad de repetir este paso.

Siembra en medio sólido de Löwenstein-Jensen

En el interior de la cabina de bioseguridad se colocan un par de gradillas, una con tubos de las muestras centrifugadas y neutralizadas, en la otra gradilla se colocan los tubos con medios de cultivo (2 por muestra y preferentemente de distinto lote) identificados con los números de los casos correspondientes (nombre del paciente, procedencia, tipo de muestra y fecha de siembra). Todas las muestras extra pulmonares (paucibacilares) se sembrarán en 2 tubos de medio Löwenstein-Jensen y 1 en medio líquido BBL MGIT a excepción de la orina que solo se hace en el medio sólido. Las muestras pulmonares se sembrarán en medio líquido de acuerdo a su necesidad.

Procedimiento

1. Tomar con una pipeta Pasteur el producto neutralizado y sembrar un volumen de 0.2 a 0.5 ml (6 a 8 gotas con pipeta Pasteur) en cada tubo, dejando impregnar toda la superficie del medio de cultivo.
2. Tomar 1 o 2 gotas del sedimento de los tubos para realizar un frotis en una laminilla identificada con el número del caso correspondiente. Dejar secar al medio ambiente y fijar con pases rápidos por la llama de un mechero teniendo el cuidado de no producir aerosoles. Posteriormente se tiñe con la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen y se examina al microscopio para buscar la presencia de bacilos.
3. Una vez sembrados, los tubos se colocan en una bandeja con fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio, se llevan a la estufa de cultivo con la tapa floja para que se evapore la parte líquida de la siembra.

Incubación y lectura

La incubación de los tubos sembrados debe hacerse a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Las revisiones deberán de efectuarse a los 2-3 días después de haberse sembrado, para ajustar la tapa y evitar la desecación (revisar alteración del pH, contaminación), las siguientes serán a los 7, 14, 28 días y hasta 8 semanas. Los tubos contaminados deben ser retirados. La lectura a los 7 días permite detectar micobacterias de crecimiento rápido que pueden confundirse con *M. tuberculosis*. Este dato es muy importante y debe ser anotado en la bitácora del laboratorio para ser tomado en cuenta para la identificación.

En cuanto se observen colonias, se realiza un frotis y se tiñe con la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen anotando en la bitácora si son bacilos ácido alcohol resistentes o no y si el cultivo es puro o presenta flora asociada. La morfología típica de las colonias de *M. tuberculosis* es color crema, rugosas en forma de coliflor o miga de pan, con apariencia seca. La lectura se reporta de acuerdo a la Tabla AII.3

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Cultivo por el método de Petroff modificado

Las medidas de bioseguridad y los procedimientos se realizan de acuerdo a lo establecido en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte II Cultivo. OMS/OPS. 2008.

Las muestras consideradas estériles como LCR, sinovial, pleural, líquido ascítico entre otros, para su procesamiento, si el volumen lo permite, se deben dividir en dos partes. Una parte se siembra directamente y el resto se descontamina siguiendo el procedimiento descrito más adelante en muestras de esputo.

En el caso de biopsias, macerar previamente la muestra en un mortero estéril con arena. La orina y otros líquidos, concentrarlos mediante centrifugación durante 30 minutos a 3000 gravedades, posteriormente, seguir el procedimiento referido para muestras de esputo.

Muestras de esputo.

1. Registrar las muestras recibidas, de recepción de muestras, por el laboratorio con una numeración consecutiva en la bitácora.
2. Enumerar las muestras colocadas en línea horizontal sobre la mesa de trabajo.
3. Trabajar dentro de cabina de seguridad biológica Clase II Tipo A2.
4. Colocar en una gradilla una cantidad igual de tubos de centrífuga de 50 ml estériles, numerados en la misma secuencia que los recipientes que contienen las muestras.
5. Colocar en cada tubo aproximadamente 2 ml de la muestra (sin sobrepasar 5 ml), vaciándola directamente en el tubo, procurando no tocar los bordes de la boca del frasco y tubo cónico.
6. Agregar al tubo 2 ml aproximadamente de Hidróxido de sodio al 4%⁵ o el necesario para duplicar el volumen de la muestra.
7. Homogenizar en agitador tipo vortex durante 20 segundos.
8. Dejar actuar durante 15 a 20 minutos dentro de la cabina de seguridad biológica Clase II Tipo A2 a temperatura ambiente.
9. Agregar solución buffer de fosfato pH 6.8 a cada tubo hasta completar 50 ml. Homogenizar en agitador tipo vortex durante 20 segundos.

⁵ Los reactivos utilizados deben ser preparados de acuerdo al Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II Cultivo. OPS 2008.

10. Centrifugar a 3000 gravedades a 25°-35°C durante 15 min. Dejar reposar 5 min. para que se asienten los aerosoles.
11. Decantar el sobrenadante en el Contenedor de RPBI (amarillo)
12. Homogenizar el sedimento y sembrar. Si la cantidad de sedimento es insuficiente agregar unas gotas de solución buffer pH 6.8 para re-suspenderlo.
13. Inocular con el sedimento entre 0.2 y 0.5 ml (6-8 gotas) en cada tubo con medio de cultivo, identificado previamente. Preparar un frotis con la última gota.

Siembra en el medio de cultivo

Todas las muestras, en caso de ser posible, se sembrarán en 2 tubos de medio Löwenstein-Jensen (preferentemente de distinto lote), 1 de medio de Stonebrink y 1 en medio líquido BBL MGIT, a excepción de la orina que sólo se siembra en el medio sólido. Las muestras pulmonares se sembrarán en medio líquido de acuerdo a su necesidad.

Incubación y lectura

Se lleva a cabo de la misma manera que en el método de Petroff

Tabla AII.3 Informe de resultados de cultivo

Resultado del cultivo	Informe
Todos los tubos inoculados con la muestra están contaminados.	Contaminado
Sin desarrollo, luego de la inspección de la octava semana de incubación.	Negativo
Entre 1 y 19 colonias en el total de medios sembrados.	Número de colonias exacto
De 20 a 100 colonias.	+
Más de 100 colonias (colonias separadas).	++
Colonias incontables (colonias confluentes).	+++

Siembra en medio líquido BBL MGIT 960

Procedimiento

Rotular previamente el tubo de medio BBL MGIT que será inoculado. Para reducir la probabilidad de contaminación, el medio se suplementa con los siguientes antibióticos PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, ácido Nalidíxico, Trimetropina, Azlocilina) de la siguiente forma: el frasco conteniendo PANTA liofilizado se reconstituye con 15 ml de suplemento de crecimiento OADC (ácido oleico, albumina bovina, dextrosa, catalasa y estearato de polioxi-etileno), ya

reconstituido se toman 800 µL con micropipeta (0.8 ml con una pipeta) y se agregan al tubo de medio BBL MGIT que será inoculado.

Con la muestra ya procesada, según el tipo, se realiza lo siguiente:

- Con una pipeta se toman 0.5 ml del sedimento de la muestra (previamente neutralizado y homogeneizado por el método de Petroff modificado) y se inocula el medio BBL MGIT.
- El tubo ya inoculado se coloca en el instrumento BACTEC MGIT 960 y se incuba a 37 ± 1 °C.
- Posteriormente, el equipo BACTEC MGIT 960 emitirá señales tanto audible como visual al identificar un tubo positivo.
- El tiempo esperado para un resultado positivo varía, *M. tuberculosis* de 7-12 días, pero no antes de los 4 días.
- Para otras micobacterias como *M. fortuitum* de 1-3 días. Para dar un informe con resultado: SIN CRECIMIENTO (negativo) se deben esperar 42 días.

Informe de resultados

En caso de no estar presentes BAAR se debe reportar como NEGATIVO.

A todo tubo que el instrumento detecta como positivo se le debe realizar un frotis, el cual será teñido con la técnica de Ziehl-Neelsen, para indicar la presencia de micobacterias, el frotis debe ser puro, sin flora asociada (hongos, cocos, etc.).

- Si la tinción es positiva para BAAR, informe el resultado como POSITIVO, IDENTIFICACIÓN PENDIENTE. Si tiene posibilidades realice la identificación y repórtela.
- Si están presentes otros microorganismos con o sin BAAR, reportar como CONTAMINADO.

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Cultivo por el método de Ogawa Kudoh para muestras de esputo

La variante modificada del método de Ogawa Kudoh es utilizada en Latinoamérica para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en laboratorios que no cuentan con las condiciones necesarias de equipo y bioseguridad. Es una técnica muy sencilla, económica y lo suficientemente sensible para asegurar que el cultivo contribuya a confirmar el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en casos con baciloscopia (-). En relación a la bioseguridad, es semejante a la de la baciloscopia pues no utiliza la centrifugación de suspensiones bacilares ni requiere contar con un laboratorio de contención.

El método de Ogawa Kudoh se puede realizar en dos escenarios diferentes: en laboratorios que cuentan con estufa de incubación, pero sin

centrífuga y muchas veces sin área de contención de las actividades de mayor riesgo y además, con difícil acceso al laboratorio de referencia. Estos laboratorios pueden sembrar e incubar la muestra. En los laboratorios que no cuenten con incubadora ni centrífuga, enviarán los tubos inoculados al LESP donde se incubarán hasta su desarrollo.

Procedimiento

1. Numerar y registrar las muestras recibidas por el laboratorio.
2. Hacer un frotis con un aplicador directamente de la muestra.
3. Agregar a un tubo cónico estéril 3mL de Hidróxido de sodio al 4%.⁶
4. Tomar con un hisopo estéril la totalidad de partículas útiles del esputo.
5. Introducir el hisopo en el tubo que contiene hidróxido de sodio al 4%, dejar reposar durante dos minutos, medir el tiempo con cronómetro en mano.
6. Se deben sembrar 2 tubos de medio acidificado Ogawa-Kudoh. Usar un hisopo para cada uno de los dos tubos.
7. Inocular con el hisopo sin escurrir uno de los tubos, por rotación y haciendo presión sobre el medio.
8. Repetir los pasos desde el número 3 para inocular el segundo tubo.
9. Descartar cada hisopo en recipiente destinado para ser esterilizados.
10. Incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en posición horizontal, sin cerrar en su totalidad el tapón de rosca para secar el inóculo.
11. Revisar los dos tubos de medio Ogawa inoculados y si no hay exceso de agua, cerrar bien el tapón de rosca del tubo y seguir incubando a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.
12. Realizar lecturas del medio sembrado a las 24 horas, 48 horas, 7,14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días.
13. Si está contaminado se descarta inmediatamente de la incubadora, haciendo el reporte.
14. Si hay crecimiento de los 14 días en adelante, reportar el resultado.
15. Si no existe crecimiento o desarrollo alguno en los medios de cultivo se reporta como negativo a los 56 días.

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Métodos para recuperación de Cultivos Contaminados

Cuando un cultivo resulta contaminado, sin importar el método usado con el que se procesó, se debe solicitar una nueva muestra al paciente para repetirlo.

⁶ Los reactivos utilizados deben ser preparados de acuerdo al Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II Cultivo. OPS 2008.

Sin embargo, en algunos casos esto no es posible. Existen algunos métodos alternativos para dar tratamiento a un cultivo contaminado e intentar recuperar la cepa:

- Método del Ácido oxálico.
- Método del ácido sulfúrico.

(Public Health Mycobacteriology a Guide for the Level III Laboratory. 1985. Centers for Disease Control. Pag 44-45).

Pruebas de identificación de especie

Es imprescindible que cuando se obtenga un cultivo positivo, se identifique la especie de micobacteria aislada y previo a realizar una prueba de Farmacosensibilidad (PFS).

A continuación, se describen las técnicas actuales de identificación. De acuerdo a las posibilidades con que cuente su laboratorio, se sugiere realizar de preferencia la prueba de Inmunocromatografía Ag MPT64 por ser sencilla, rápida y confiable. Si sus recursos son limitados y cuenta con pocas pruebas de este tipo, se deben utilizar para cultivos líquidos o sólidos con poco desarrollo. Y si no tiene recursos para adquirir esta prueba, puede realizar las enzimáticas, en su lugar.

Técnicas de identificación de especie por medio de métodos bioquímicos (pruebas enzimáticas)

Para determinar la especie de la micobacteria aislada en cultivo sólido, se emplean las tres principales técnicas enzimáticas para la identificación de *M. tuberculosis*. Cuando se sospecha la presencia de otra micobacteria no tuberculosa, la identificación se realiza mediante técnicas moleculares en el departamento de biología molecular y validación de técnicas del InDRE.

Prueba de niacina

Fundamento: la niacina (ácido nicotínico) juega un rol vital en las reacciones de óxido-reducción que ocurren durante el metabolismo de todas las micobacterias. Aunque todas ellas producen niacina, la mayoría lo hace en cantidad moderada y la emplea en la síntesis de otras moléculas. Sólo *M. tuberculosis* la produce muy activamente y la acumula en gran cantidad porque no puede procesarla posteriormente. La acumulación de niacina puede ponerse en evidencia con mayor seguridad luego de 3-4 semanas de la aparición de las colonias y cuando el desarrollo es abundante (más de 50 colonias).

Esta prueba determina la presencia de ácido nicotínico (niacina). En la prueba química para la detección de niacina descrita por Runyon, el ácido nicotínico reacciona con el bromuro de cianógeno en presencia de una amina

primaria (anilina) formando un compuesto amarillo. Es una prueba básica para diferenciar *M. tuberculosis* de otras micobacterias.

Procedimiento

1. A un cultivo puro en medio sólido con abundantes colonias (cerca de 50), joven (aproximadamente de 4 semanas de desarrollo), agregar 1-2 ml de agua destilada estéril.
2. Romper el medio con el asa, con el fin de facilitar la difusión de la niacina. Dejar el tubo inclinado durante 15 minutos en la incubadora a 37°C.
3. Transferir el líquido a un tubo limpio con tapa de rosca y añadir 0.5 ml de la solución de bromuro de cianógeno al 10% y 0.5 ml de la solución de anilina al 4%.⁷

Controles

- Control positivo: Cepa de *M. tuberculosis* H37Ra ATCC o cepa de *M. tuberculosis* aislada en el laboratorio y bien caracterizada.
- Control negativo: Sólo reactivos, también se pueden utilizar cepas de micobacterias no tuberculosas, sin color, negativas a la prueba de niacina.

Una vez terminada la prueba de niacina, neutralizar con el mismo volumen de una solución de hidróxido de sodio al 10%.

Interpretación

La aparición de un color amarillo en el líquido de extracción indica la presencia de niacina. Los microorganismos niacina-positivos pueden dar pruebas negativas en caso de que el desarrollo sea insuficiente o temprano, de tal forma que no hay suficiente acumulación de niacina que pueda ser detectable en el medio. También se puede obtener una prueba negativa si existe desarrollo bacteriano por toda la superficie del medio de cultivo, lo que impide la extracción de niacina del medio, esto se puede controlar raspando parte del desarrollo bacteriano confluyente hacia un lado mediante un asa bacteriológica.

Informe de resultados

Las cepas niacina-positivas, nitratos-positivos y catalasa a 68 °C negativa se informan como *M. tuberculosis*. Las cepas niacina-negativa que se hayan desarrollado mejor en el medio de Stonebrink, requieren de otras pruebas para determinar si se trata de *M. bovis*. Los cultivos niacina-negativa que no son *M. bovis*, se identificarán mediante pruebas moleculares.

Tiras para análisis de ácido nicotínico para TB.

La tira de niacina reemplaza los reactivos necesarios para hacer la prueba bioquímica de niacina y evita el uso de los insumos y equipos requeridos para su preparación. La tira de análisis de ácido nicotínico (tira de niacina) para tuberculosis, está impregnada con tiocianato potásico acidificado con cloramina T, la cual libera cloruro de cianógeno, que al contacto con el ácido nicotínico (presente en el medio sólido ya que el *M. tuberculosis* no puede metabolizarlo) produce un color amarillo.

La tira de niacina es de fácil manejo (uso e interpretación), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los controles se compran por separado, y se deben realizar varias pruebas simultáneamente para optimizar su uso.

Para su desecho, las tiras no necesitan ser neutralizadas como el bromuro de cianógeno; después de su uso se deben colocar junto con el tubo de reacción (perfectamente cerrado). Si el tubo es de vidrio, se coloca en un cesto de acero inoxidable para esterilizar en la autoclave y ser reutilizado después de lavarse. En caso el que el tubo no sea de vidrio, se desecha en bolsa roja de RPBI y se esteriliza en la autoclave para su disposición final, de acuerdo a la normatividad vigente.

Procedimiento

Cepa problema

A un cultivo en medio sólido de 3 a 4 semanas de crecimiento y con al menos 50 colonias (puede realizarse la prueba con menor número de colonias, no obstante, la visualización de positividad puede disminuir) se le retira la masa bacilar, se fragmenta el medio, se le agregan 2 ml de agua destilada estéril y se inclina el tubo hasta que el agua cubra la superficie del medio. Dejar en esta posición de 20 a 30 minutos para extraer la niacina del medio. Remover cuidadosamente 0.8 ml de extracto y colocarlo en un tubo de ensayo (13x100).

Controles

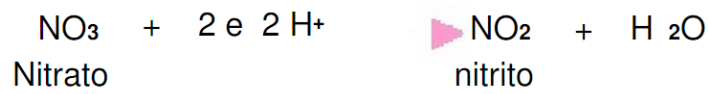
- Colocar 1 ml de agua destilada estéril a un tubo de ensayo, añadir un disco de control del análisis de ácido nicotínico para TB BBL Taxo (se vende por separado), taparlo y agitarlo suavemente tres veces durante 15 minutos. Dejar a temperatura ambiente (control positivo).
- Añadir 1 ml de agua destilada estéril a un tubo de ensayo (control negativo).
- Con unas pinzas estériles, introducir en cada tubo (cultivo de análisis, control positivo y control negativo) una tira de análisis de ácido nicotínico para TB BBL Taxo, con la flecha orientada hacia abajo; y tapar los tubos. Mezclar con suavidad y volver agitar a los 5 y 10 minutos (sin inclinar). Transcurridos 15 minutos, pero no más de 30, comparar el color de los tubos.

Interpretación

Un resultado positivo (presencia de ácido nicotínico) estará indicado por la aparición de color amarillo en el extracto del cultivo de prueba y en el control positivo, la ausencia de color será tomada como una prueba negativa

Prueba de reducción de nitratos

Fundamento: Algunas micobacterias (entre ellas *M. tuberculosis*) utilizan nitratos como fuentes de nitrógeno, reemplazando a las sales de amonio, las micobacterias que contienen la enzima nitratorreductasa, pueden obtener oxígeno a partir de los nitratos y otros productos de reducción. La reacción química es:



La presencia de nitrito en el medio se detecta añadiendo sulfanilamida y clorhidrato de N-naftiletilendiamina en un pH ácido. Si hay nitritos, se forma una coloración roja producida por la formación de un compuesto diazoico (el p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina).

Procedimiento

Se realiza en un cultivo puro, de no más de 4 semanas de desarrollo.

1. Introducir un asa bien cargada de bacilos en tubos de 13x100 mm, con tapa de rosca, conteniendo 2 ml del sustrato.
2. Agitar e incubar a 37 °C durante 2 horas.
3. Agregar una gota de la solución A (ácido clorhídrico 1:1 en agua) y agitar con la mano.
4. Adicionar dos gotas de la solución B (solución acuosa de sulfanilamida al 0.2%).
5. Añadir dos gotas de la solución C (solución acuosa de N-naftil etilendiamina al 0.1%).

Controles

Cada vez que la prueba se determina en aislamientos recientes se deben utilizar los siguientes organismos de control:

- Control positivo: *M. tuberculosis* H37 Ra ATCC o cepa de *M. tuberculosis* aislada en el laboratorio, bien caracterizada.
- Control negativo: solo reactivos.

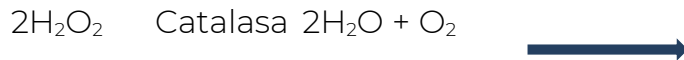
Interpretación

El desarrollo de un color rojo en 30 a 60 segundos indica una prueba positiva. El color puede variar de rosa a rojo intenso.

Prueba de la catalasa a temperatura ambiente y a 68 °C

Todas las micobacterias, excepto las mutantes isoniacida-resistentes de *M. tuberculosis* y *M. gastri*, sintetizan catalasa.

Fundamento: Los organismos que producen la enzima catalasa, tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre.



La prueba de catalasa micobacteriana difiere de la que se utiliza para otros tipos de bacterias, ya que en lugar de la solución usual de peróxido de hidrógeno al 3%, se emplea peróxido de hidrógeno al 30% (superoxol) en una solución fuerte de detergente (Tween 80 al 10%). El detergente ayuda a que las micobacterias hidrofóbicas, estrechamente agrupadas, se dispersen como bacilos individuales, facilitando la detección de la catalasa.

La actividad de la catalasa de *M. tuberculosis* y *M. bovis* resulta inhibida a 68°C a diferencia del resto de las micobacterias que conservan la actividad de la catalasa después del calentamiento.

Procedimiento

1. Se realiza en un cultivo puro, de no más de 4 semanas de desarrollo.
2. Distribuir en tubos de 13x100 mm, 0.5 ml de la solución amortiguadora pH 7 por tubo. Emplear 2 tubos para cada cepa.
3. Agregar a cada tubo el contenido de un asa cargada de colonias. Por cada par de tubos de una cepa, dejar un tubo a temperatura ambiente y colocar el otro en baño María a 68 °C durante 20 minutos.
4. Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Preparar una mezcla en partes iguales de la solución de Tween 80 y el peróxido de hidrógeno al 30% y agregar 0.5 ml de este reactivo a cada tubo. Esta mezcla debe ser preparada en el momento de ser utilizada.⁷

Controles

Catalasa a temperatura ambiente.

- Control positivo: *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC o cepa de *M. tuberculosis* aislada en el laboratorio, bien caracterizada.
- Control negativo: Solo reactivos.

⁷ Los reactivos utilizados en las pruebas se preparan siguiendo las indicaciones del Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte 2 Cultivo de la Organización Panamericana de la Salud.

Catalasa a 68 °C

- Control positivo: Micobacteria no tuberculosa bien caracterizada (Ejemplo *M. avium*).
- Control negativo: Solo reactivos.

Interpretación

La formación de burbujas en la superficie se considera como resultado positivo. Si no hay burbujas, dejar en observación 20 min antes de informar un resultado como negativo.

M. tuberculosis es positivo a temperatura ambiente y negativo después de calentar a 68°C. Las Micobacterias no tuberculosas (como *M. avium*) son positivas a temperatura ambiente y también después de calentar a 68°C.

Los tubos utilizados en las pruebas de identificación mencionadas se deben desechar en contenedor de punzocortantes (tubo de vidrio) o en bolsa roja (tubo de plástico), esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Identificación de especie a través de la Prueba de Inmunocromatografía TB Ag MPT64

La prueba TB Ag MPT64, prueba de identificación inmunocromatográfica lateral, detecta la proteína MPT64 que identifica a las cepas del Complejo *M. tuberculosis* (CMTB). Esta proteína es una de las múltiples proteínas (más de 33) que secreta *M. tuberculosis*. Se obtiene a partir de cultivos en medio líquido o sólido. La prueba usa un anticuerpo anti-MPT64 inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas MPT64 (antígenos) se unen a los anticuerpos específicos de MPT64, conjugados con partículas de oro coloidal.

El complejo antígeno-anticuerpo conjugado se desplaza por la tira de análisis hasta el área de reacción y es atrapado por el anticuerpo inmovilizado en la membrana. Si el antígeno MPT64 está presente en la cepa, las partículas de oro coloidal marcadas se manifiestan en forma de una línea de color rojo a rosa pálido. La prueba es de fácil uso y deben seguirse las recomendaciones del proveedor.

Una vez terminado el proceso se debe colocar el dispositivo en bolsa roja de RPBI y ponerlo a esterilizar en la autoclave para su posterior eliminación, de acuerdo a la normativa vigente.

Procedimiento

Cultivo sólido

- Para preparar una suspensión a partir de cultivos sólidos, se deben resuspender de 3 a 4 colonias en 200 µl de buffer de extracción (material suministrado en el estuche).

- Agua de condensación, si hay agua de condensación en los tubos de medio de cultivo inclinado, se pueden tomar 100 µl de este fluido y utilizarlos para realizar directamente la prueba, o las colonias pueden ser re suspendidas en el agua de condensación en vez de utilizar buffer de extracción.

Cultivo líquido

- Extraer 100 µl de un cultivo en medio líquido para utilizarlos directamente en la prueba, sin necesidad de preparar una suspensión.
- Para realizar la prueba, retirar el dispositivo individual contenido en su bolsa de aluminio (material suministrado en el estuche) y ubicarlo sobre una superficie plana y seca, adicionar 100 µl de la suspensión del cultivo sólido o 100 µl del cultivo en medio líquido dentro del pozo del dispositivo de prueba. Interpretar los resultados 15 minutos después de haber adicionado el extracto.

Interpretación

- La presencia de una única banda en el lado izquierdo del dispositivo, control de la prueba (línea "C"), será interpretada como negativa a CMTB y la presencia de dos bandas de color (línea "T" y línea "C") en el dispositivo de prueba, será interpretada como positiva a CMTB.
- Si la banda del control no es visible, se invalida la prueba.

Una vez terminada la prueba desechar el dispositivo en bolsa roja, esterilizar en autoclave y manejar como un RPBI.

Micobacterias no tuberculosas (MNT)

En la actualidad se conocen un gran número de especies de micobacterias no tuberculosas, siendo la mayoría saprófitas. Estos microorganismos se encuentran en cualquier parte del ambiente, pueden aislarse de tierra, agua (incluso almacenada adecuadamente), polvo, leche y varios animales.

Las especies mayormente asociadas a enfermedad son del complejo *Mycobacterium avium* (CMA), *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium marinum*. Otras MNT patógenas para el humano incluyen micobacterias de crecimiento rápido como *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum*.

Estas micobacterias causan una enfermedad llamada micobacteriosis, por ello es importante que se cumplan las siguientes condiciones para considerarlas como causantes de enfermedad y no como aislamientos banales:

- el paciente presenta signos clínicos y síntomas de una micobacteriosis (muy semejantes a los de la tuberculosis).
- repetir el aislamiento de esa misma especie a partir de distintas muestras del paciente con un buen número de colonias (más de 5)

- las colonias que se aíslan no deben estar asociadas con *M. tuberculosis*.
- Mala respuesta al tratamiento convencional

Cuando se confirma que el aislamiento es una MNT, se deben continuar las pruebas de identificación con pruebas moleculares como la hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas (GenoType), secuenciación de DNA, etc; que son muy precisas para identificar la especie de que se trata.

Las MNT generalmente son resistentes a los fármacos usados para el tratamiento de la tuberculosis por lo que no es recomendable realizar las PFS para *M. tuberculosis*. Por esta razón, el tratamiento de una micobacteriosis es diferente al empleado para la tuberculosis.

Prueba de sensibilidad por el método fluorométrico MGIT 960

Este método semi-automatizado en medio líquido, permite conocer la sensibilidad o resistencia *in vitro* a los medicamentos utilizados contra la tuberculosis (1ª y 2ª Línea), en un intervalo de tiempo menor que los métodos convencionales.

Fundamento

El tubo indicador de crecimiento micobacteriano medio BBL MGIT de 7 ml contiene caldo Middlebrook 7H9 modificado, que permite el crecimiento y la detección de micobacterias. Este tubo de medio MGIT (de 16x100 mm y fondo redondo) contiene un compuesto fluorescente (pentahidrato de rutenio) incluido en silicona que se encuentra en la parte inferior del mismo.

El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. La concentración inicial de oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto, por lo que se detecta poca fluorescencia. Más tarde, los microorganismos, al respirar y crecer activamente, consumen el oxígeno, lo cual permite que se manifieste la fluorescencia del compuesto.

La prueba de sensibilidad BACTEC MGIT 960 es un análisis cualitativo con una duración de 4 a 13 días en promedio. El análisis se basa en la comparación del crecimiento de la cepa aislada de *M. tuberculosis* en un tubo que contiene antibiótico, con el crecimiento en un tubo sin antibiótico (control de crecimiento). El instrumento BACTEC MGIT 960 monitorea los tubos continuamente para detectar un aumento de su fluorescencia (cada hora). El instrumento utiliza el análisis de la fluorescencia del tubo con antibiótico, en comparación con la fluorescencia del tubo de control de crecimiento, para determinar los resultados de sensibilidad.

Este método mantiene el principio del método de las proporciones al emplear como control el inóculo diluido 1:100 sembrado sin antibiótico. De esta forma, si se detecta señal en el tubo sin y con droga, se infiere que existe desarrollo de más del 1% de clones resistentes a la droga.

El instrumento BACTEC MGIT 960 interpreta en forma automatizada los resultados e informa la sensibilidad o resistencia.

A continuación, se describen los dos procedimientos: la prueba para medicamentos de 1ª Línea que incluye la de la Pirazinamida y la prueba para medicamentos de 2ª Línea.

Prueba de sensibilidad (PFS) por el método fluorométrico MGIT 960 a medicamentos de 1ª línea: Estreptomina (S), Isoniazida (H), Rifampicina (R) y Etambutol (E).

Preparación del inóculo a partir de medio líquido

Con el tubo de medio MGIT del cultivo positivo (primo aislamiento o subcultivo), previamente identificado se procede a hacer lo siguiente:

El primer día en que el BACTEC MGIT 960 registra un resultado positivo a crecimiento micobacteriano para un tubo MGIT se considerará como el día 0 para la prueba de sensibilidad.

Para la preparación del inóculo de análisis, debe usarse un tubo de medio MGIT de 7 ml positivo un día después de que el BACTEC MGIT 960 registre el resultado positivo (día 1) y hasta el quinto día inclusive (día 5).

- Si el tubo es positivo el primer o segundo día utilizar el caldo suspensión MGIT directamente para los procedimientos de inoculación. Mezclar bien. Continuar con el procedimiento para la inoculación.
- Si el tubo es positivo en los días 3ero, 4to o 5to, mezcle bien y diluya 1 ml del caldo positivo en 4 ml de agua destilada estéril (dilución 1:5). Utilizar esta suspensión diluida para la inoculación. Continuar con el procedimiento de inoculación.
- Después de que el BACTEC MGIT 960 registre el resultado positivo (día 0). Si un tubo ha permanecido positivo más de 5 días, se debe hacer un subcultivo en un nuevo tubo MGIT de 7 ml que contenga suplemento para crecimiento BACTEC MGIT 960, analizarlo en el instrumento BACTEC MGIT 960 hasta que muestre positividad y utilizarlo de 1 a 5 días después de mostrar positividad.
- Al tubo de cultivo positivo se deberá hacer una baciloscopía para constatar que no haya contaminación.

Preparación de los tubos de medio de cultivo con y sin fármaco

Material necesario: tubos indicadores de crecimiento micobacteriano medio BBL MGIT de 7 ml, kit BACTEC MGIT 960 SIRE con 1 frasco de cada antibiótico liofilizado y 8 frascos de suplemento SIRE (se obtienen aproximadamente 40 análisis con cada antibiótico del kit).

Otros materiales: agua destilada estéril, microorganismos para el control de calidad (una cepa H37Rv sensible a SIREZ y dos cepas resistentes bien caracterizadas –pueden usarse las del panel de control de calidad de PFS – no MDR, pero si resistentes a Isoniacida y Rifampicina separadamente con otra resistencia asociada) y el equipo de laboratorio necesario para este procedimiento.

Reconstituir cada frasco de medicamento liofilizado con 4 ml de agua destilada estéril (de preferencia desionizada para mejor resultado). Es importante hacer este paso con mucho cuidado para evitar errores. El frasco reconstituido puede usarse para 40 pruebas aproximadamente:

Tabla All.4 Concentración de medicamento liofilizado y reconstituido

Fármaco	Fórmula liofilizada (μg)	Fórmula reconstituida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Estreptomicina	332	83
Isoniazida	33.2	8.3
Rifampicina	332	83
Etambutol	1660	415

1. Preparar los tubos con el fármaco etiquetando 5 tubos MGIT: uno con la letra C (tubo control de crecimiento), otro con S, con H, con R y otro con E.
2. Agregar asépticamente 0.8 ml de suplemento BACTEC MGIT SIRE suministrado con el kit, a cada tubo.
3. Posteriormente transferir con una micropipeta, asépticamente 100 μl (0.1 ml) de cada uno de los fármacos al tubo correspondiente. Es importante hacer este paso con mucho cuidado para evitar cualquier error.
4. Al tubo C (control de crecimiento) no debe agregarse antibióticos.
5. Los frascos con el fármaco sobrante deben fraccionarse de acuerdo a la carga de trabajo y conservarse a -20 a -70 °C. Cada alícuota al utilizarse, si hay sobrante debe desecharse.

Tabla All.5 Concentración final de los medicamentos

Medicamento	Concentración del antibiótico reconstituido ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen añadido a los tubos MGIT para la prueba en μl	Concentración final en los tubos MGIT ($\mu\text{g/ml}$)
MGIT (S)	83	100	1
MGIT (H)	8.3	100	0.1
MGIT (R)	83	100	1
MGIT (E)	415	100	5

Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad

1. Inoculación del tubo de control de crecimiento:
Con una pipeta o micropipeta, transferir asépticamente 0.1 ml del tubo BBL a trabajar o de la suspensión de microorganismos (suspensión 1:5) a 10 ml de agua destilada estéril para preparar la suspensión 1:100 de control de crecimiento. Mezclar bien la suspensión de control de crecimiento utilizando un agitador tipo vórtex.
2. Inocular 0.5 ml de la suspensión 1:100 de control de crecimiento en el tubo MGIT que tiene la etiqueta C.
3. Inoculación de los tubos que contienen antibióticos:
Con una pipeta o micropipeta, transferir asépticamente 0.5 ml del tubo BBL del tubo a trabajar o de la suspensión de microorganismos (suspensión 1:5), a cada uno de los cuatro tubos con antibiótico (S, H, R, E).
4. Cerrar bien los tubos. Mezclar invirtiéndolos suavemente entre tres y cuatro veces.
5. Colocar los 5 tubos BBL (control y con fármacos) en la gradilla del conjunto de prueba de susceptibilidad a antibióticos (AST, Antibiotic Susceptibility Testing) correspondiente. Introducirlo en el BACTEC MGIT 960 e incubar a 37 °C.

Preparación del inóculo a partir de medio sólido

La prueba se realiza a partir de un cultivo joven en medio sólido y se requiere al menos un tubo con abundante desarrollo (1 a 3 cruces). Si excepcionalmente el desarrollo fue menor se necesita juntar varios tubos que reúnan al menos 20 colonias. También es importante partir de un cultivo puro de *M. tuberculosis*, esto significa que se utilizaron las técnicas apropiadas de identificación y se descartó la presencia de MNTB o contaminación.

Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad

1. Agregar dos a tres gotas de agua destilada estéril a un frasco estéril de 20 ml, con tapón de rosca, que contenga de 8 a 10 microesferas (perlas) de vidrio.

2. Con un asa esterilizada, separar el mayor número posible de la totalidad de las colonias de un cultivo con desarrollo, procurando evitar recoger medio sólido. Colocar la asada en el frasco con perlas de vidrio. Agitar la suspensión en un agitador tipo vórtex durante 20 a 30 segundos, para dispersar los grumos más grandes. Agregar 4 ml de agua destilada estéril y agitar nuevamente con el vórtex hasta obtener una suspensión de las colonias en agua. La turbidez de la suspensión debe superar el patrón 1.0 de MacFarland.⁸
3. Dejar que la suspensión repose durante 15 minutos, sin moverla.
4. Transferir el líquido sobrenadante (este debe estar homogéneo, sin grumos) a un tubo estéril de 16 x 150 mm.
5. Ajustar la suspensión agregando gota a gota agua destilada estéril, a un patrón 0.5 de MacFarland mediante comparación visual con el patrón de turbidez 0.5. No ajustar por debajo de un patrón 0.5 de MacFarland.
6. Diluir 1 ml de la suspensión ajustada en 4 ml de agua o solución salina estériles (dilución 1:5). A partir de esta dilución, inocular con 0.5 ml los tubos con fármacos (S, H, R y E).
7. A partir de la dilución 1:5 se prepara la dilución 1/100. Tomando 0.1 ml y diluyéndolo en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril. Agitar con el vórtex e inocular 0.5 ml en el tubo de control de crecimiento (C).
8. Cerrar bien los tubos. Mezclar invirtiéndolos suavemente entre tres y cuatro veces.
9. Colocar los 5 tubos BBL (control y con fármacos) en el conjunto AST correspondiente, introducirlo en el BACTEC MGIT 960 e incubar a 37 °C.

Resultados

De la misma forma que el equipo BACTEC MGIT 960 monitorea los tubos de medio BBL de forma individual, el equipo registra las lecturas de los tubos que están agrupados en cada gradilla del conjunto AST hasta obtener una determinación de resistencia o sensibilidad al final del protocolo de estudio y los resultados son informados por el equipo. La duración de la prueba es de 4 a 12 días. Antes de realizar una PFS es indispensable comprobar la identificación de la cepa aislada como *M. tuberculosis* o complejo *M. tuberculosis*. Es preciso asegurarse de que se ha utilizado exclusivamente un cultivo puro (hay que descartar la presencia de mezclas de micobacterias, etc.).

La monorresistencia a etambutol es muy poco frecuente, por lo que debe comprobarse.

⁸ La preparación del patrón turbidimétrico MacFarland No. 1 está descrito en el Método de las Proporciones en medio Lowenstein-Jensen. Prueba indirecta, más adelante

Para las pruebas de resistencia a fármacos, se deben confirmar visualmente los tubos, como sigue:

- Si el tubo control y el que contiene la cepa resistente a un fármaco específico presentan aspecto floculado (típico de *M. tuberculosis*), se puede informar el resultado obtenido.
- Si el tubo control y/o el que contiene la cepa resistente al fármaco específico presentan turbidez, puede sospecharse contaminación y se deberá realizar el siguiente procedimiento:

Hacer un frotis del tubo que presenta turbidez para descartar que exista contaminación.

Si hay discordancia entre el resultado actual de la cepa con otro recibido anteriormente, antes de informar el resultado se debe repetir el antibiograma; y en caso de mantener la discordancia, informar el resultado con esa observación. También se puede usar el método de proporciones (estándar de oro) para resolver la discordancia.

Cuando la prueba presenta crecimiento rápido, significa un exceso de inóculo, una MNTB de crecimiento rápido o una contaminación, y deberá hacer un frotis del tubo control para observar lo siguiente:

- Si no hay BAAR o hay BAAR con la presencia de otros microorganismos, es contaminación. Informar el resultado como contaminado.
- Si hay BAAR, enviar el tubo original a tipificación.

Control de calidad

Se lleva a cabo con la cepa H37 Rv ATCC que es una cepa de referencia de *M. tuberculosis* sensible a SIRE y dos cepas resistentes bien caracterizadas – pueden usarse las del panel de control de calidad de PFS – no MDR, pero si resistentes a Isoniacida y Rifampicina separadamente con otra resistencia asociada) que se utiliza para probar la sensibilidad de los lotes nuevos de medio BBL MGIT BACTEC. También al reconstituir un nuevo kit de SIRE se va hacer control de calidad con las cepas mencionadas.

Prueba de sensibilidad a la Pirazinamida (Z)

Preparación del inóculo a partir de medio líquido

Con el tubo de medio MGIT del cultivo positivo (primo aislamiento o sub-cultivo), puro, con buen desarrollo y previamente identificado como *M. tuberculosis*, se procede a hacer lo siguiente:

El primer día en que el BACTEC MGIT 960 registra un resultado positivo a crecimiento micobacteriano para un tubo MGIT se considerará como el día 0 para la prueba de sensibilidad.

Para la preparación del inóculo de análisis, debe usarse un tubo MGIT de 7 ml positivo un día después de que el BACTEC MGIT 960 registre el resultado positivo (día 1) y hasta el quinto día inclusive (día 5).

- Si el tubo es positivo el primer o segundo día utilizar el caldo suspensión MGIT directamente para los procedimientos de inoculación. Mezclar bien. Continuar con el procedimiento para la inoculación.
- Si el tubo es positivo en los días 3ero, 4to o 5to, mezcle bien y diluya 1 ml del caldo positivo en 4 ml de agua destilada estéril (dilución 1:5). Utilizar esta suspensión diluida para la inoculación. Continuar con el procedimiento de inoculación.
- Después de que el BACTEC MGIT 960 registre el resultado positivo (día 0). Si un tubo ha permanecido positivo más de 5 días, se debe hacer un subcultivo en un nuevo tubo MGIT de 7 ml que contenga suplemento para crecimiento BACTEC MGIT 960, analizarlo en el instrumento BACTEC MGIT 960 hasta que muestre positividad y utilizarlo de 1 a 5 días después de mostrar positividad.
- Al tubo de cultivo positivo que se use se deberá hacer una baciloscopía para constatar que no haya contaminación.

Preparación del inóculo a partir de medio sólido

La prueba se realiza a partir de un cultivo joven en medio sólido y se requiere al menos un tubo con abundante desarrollo (1 a 3 cruces). Si excepcionalmente el desarrollo fue menor se necesita juntar varios tubos que reúnan al menos 20 colonias.

También es importante partir de un cultivo puro de *M. tuberculosis*, esto significa que se utilizaron las técnicas apropiadas de identificación y se descartó la presencia de MNTB o contaminación.

Procedimiento

1. Agregar dos a tres gotas de agua destilada estéril a un frasco estéril de 20 ml, con tapón de rosca, que contenga de 8 a 10 microesferas (perlas) de vidrio.
2. Con un asa esterilizada, separar el mayor número posible de la totalidad de las colonias de un cultivo con desarrollo, procurando evitar recoger medio sólido. Colocar la asada en el frasco con perlas de vidrio. Agitar la suspensión en un agitador tipo vórtex durante 20 a 30 segundos, para dispersar los grumos más grandes. Agregar 4 ml de agua destilada estéril y agitar nuevamente con el vórtex hasta obtener una suspensión de las

colonias en agua. La turbidez de la suspensión debe superar el patrón 1.0 de MacFarland

3. Dejar que la suspensión repose durante 15 minutos, sin moverla.
4. Transferir el líquido sobrenadante (este debe estar homogéneo, sin grumos) a un tubo estéril de 16 x 150 mm.
5. Ajustar la suspensión agregando gota a gota agua destilada estéril, a un patrón 0.5 de MacFarland mediante comparación visual con el patrón de turbidez 0.5. No ajustar por debajo de un patrón 0.5 de MacFarland.

Preparación de los tubos de medio de cultivo con y sin fármaco

Material necesario: tubos indicadores de crecimiento micobacteriano con medio de pirazinamida MGIT, frasco del antibiótico liofilizado Pirazinamida (Z) y frasco con suplemento de enriquecimiento para medio de Pirazinamida.

Otros materiales: agua destilada estéril, microorganismos para el control de calidad: una cepa H37Rv sensible a Z y una cepa de *M. bovis* ATCC o aislada en el laboratorio, pero bien caracterizada, que es resistente a Z y el equipo de laboratorio necesario para este procedimiento.

1. Reconstituir el frasco del medicamento liofilizado (Z) con 2.5 ml de agua destilada estéril (de preferencia desionizada para mejor resultado). Agitar para lograr su completa homogenización. Es importante hacer este paso con mucho cuidado para evitar errores. El frasco reconstituido puede usarse para 25 pruebas aproximadamente.
2. Se prepara un kit de prueba con 2 tubos de medio de pirazinamida MGIT y se rotulan: C (Control) y P (Prueba) respectivamente. En ambos tubos se anotan el no. de sensibilidad y año.
3. Con una pipeta o micropipeta agregar 0.8 ml del suplemento de enriquecimiento para el medio de Z a cada uno de los tubos del kit de prueba C y P.
4. Adicionar 100 μ L (0.1 ml) del frasco de la droga reconstituída al tubo de medio de pirazinamida MGIT rotulado con P.
5. Al tubo C (control de crecimiento) no debe agregarse antibiótico.
6. El frasco con el fármaco sobrante debe fraccionarse de acuerdo a la carga de trabajo y conservarse a -20 a -70 °C. Cada alícuota al utilizarse, si hay sobrante debe desecharse.

Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad

1. Del tubo de medio MGIT positivo preparado para la inoculación, con micropipeta se toman 500 μ L y se dispensan en un tubo con 4.5 mL de agua destilada estéril para preparar la dilución 1:10 para el tubo Control.

2. De esta dilución previamente agitada en vortex durante 10-15 segundos se toman 0.5 ml y se procede a inocular el tubo Control (C) del kit de prueba.
3. Para inocular el tubo prueba (P), se toman 500 μ L (con micropipeta) del tubo de medio MGIT positivo y se dispensan en el tubo (P).
4. Se mezclan y homogenizan los tubos del kit de prueba por inversión de 4 a 5 veces.
5. Se colocan en el conjunto AST para 2 tubos, de izquierda a derecha a partir del tubo Control, como se indicó (previamente hecha la captura de datos del paciente en el EpiCenter) y se ingresan al instrumento MGIT 960, que los incuba a 37 °C +/- 1 °C.

Resultados

De la misma forma que el equipo BACTEC MGIT 960 monitorea los tubos de medio BBL de forma individual, el equipo registra las lecturas de los tubos que están agrupados en cada gradilla del conjunto AST hasta obtener una determinación de resistencia o sensibilidad al final del protocolo de estudio y los resultados son informados por el equipo.

- Se hace el seguimiento de lecturas para prueba de sensibilidad a la Pirazinamida, con la interfase: computadora (con programa EpiCenter) y el instrumento MGIT 960.
- Cuando el tubo Control (C) alcanza 400 UC, el equipo MGIT 960 en forma automatizada, hace la interpretación del resultado de la sensibilidad a la prueba de pirazinamida.
- No se debe reportar un resultado de sensibilidad antes de los 4 días, el sistema 960 lo tiene predeterminado así en su programa (EpiCenter), por lo cual antes de los 4 días lo interpreta “No Válido” (“prueba invalidada”).
- El máximo de días para interpretar un resultado a la pirazinamida, por protocolo de estudio en MGIT 960 es de 21 días.
- El resultado se puede obtener en forma impresa.

Prueba de sensibilidad por el método fluorométrico MGIT 960 a los medicamentos antituberculosis de 2ª Línea: Kanamicina (Km), Amikacina (Amk), Capreomicina (Cpm), Levofloxacin (Lfx) y Moxifloxacin (Mfx).

Si bien la mayoría de casos de tuberculosis son sensibles a medicamentos, la tuberculosis multifarmacorresistente (TB-MFR) representa una amenaza emergente para el control mundial de la enfermedad. Las cepas de TB-MFR son las que presentan resistencia a los medicamentos más potentes (isoniazida y

rifampicina), lo que significa una mayor dificultad para curar a este tipo de enfermos.

Se sospecha multifarmacorresistencia en todo paciente con tuberculosis que curse con recaída, múltiples abandonos y/o fracaso a un esquema de tratamiento. Asimismo, en pacientes que son contactos de casos TB-MFR.

Después de comprobar la presencia de TB-MFR en un paciente es absolutamente indispensable realizar una PFS a medicamentos de 2ª línea para, de acuerdo a los resultados, poder conformar un tratamiento individualizado con los medicamentos a los cuales sea sensible.

Preparación del inóculo a partir de medio líquido

Con el tubo de medio MGIT del cultivo positivo (primo aislamiento o subcultivo), previamente identificado se procede a hacer lo siguiente:

El primer día en que el BACTEC MGIT 960 registra un resultado positivo a crecimiento micobacteriano para un tubo MGIT se considerará como el día 0 para la prueba de sensibilidad.

Para la preparación del inóculo de análisis, debe usarse un tubo de medio MGIT de 7 ml positivo un día después de que el BACTEC MGIT 960 registre el resultado positivo (día 1) y hasta el quinto día inclusive (día 5).

- Si el tubo es positivo el primer o segundo día utilizar el caldo suspensión MGIT directamente para los procedimientos de inoculación. Mezclar bien. Continuar con el procedimiento para la inoculación.
- Si el tubo es positivo en los días 3ero, 4to o 5to, mezcle bien y diluya 1 ml del caldo positivo en 4 ml de agua destilada estéril (dilución 1:5). Utilizar esta suspensión diluida para la inoculación. Continuar con el procedimiento de inoculación.
- Después de que el BACTEC MGIT 960 registre el resultado positivo (día 0). Si un tubo ha permanecido positivo más de 5 días, se debe hacer un subcultivo en un nuevo tubo MGIT de 7 ml que contenga suplemento para crecimiento BACTEC MGIT 960, analizarlo en el instrumento BACTEC MGIT 960 hasta que muestre positividad y utilizarlo de 1 a 5 días después de mostrar positividad.
- Al tubo de cultivo positivo se deberá hacer una baciloscopía para constatar que no haya contaminación.

Preparación del inóculo a partir de medio sólido

La prueba se realiza a partir de un cultivo joven en medio sólido y se requiere al menos un tubo con abundante desarrollo (1 a 3 cruces). Si excepcionalmente el desarrollo fue menor se necesita juntar varios tubos que reúnan al menos 20 colonias.

También es importante partir de un cultivo puro de *M. tuberculosis*, esto significa que se utilizaron las técnicas apropiadas de identificación y se descartó la presencia de MNTB o contaminación.

Procedimiento

1. Agregar dos a tres gotas de agua destilada estéril a un frasco estéril de 20 ml, con tapón de rosca, que contenga de 8 a 10 microesferas (perlas) de vidrio.
2. Con un asa esterilizada, separar el mayor número posible de la totalidad de las colonias de un cultivo con desarrollo, procurando evitar recoger medio sólido. Colocar la asada en el frasco con perlas de vidrio. Agitar la suspensión en un agitador tipo vórtex durante 20 a 30 segundos, para dispersar los grumos más grandes. Agregar 4 ml de agua destilada estéril y agitar nuevamente con el vórtex hasta obtener una suspensión de las colonias en agua. La turbidez de la suspensión debe superar el patrón 1.0 de MacFarland.⁹
3. Dejar que la suspensión repose durante 15 minutos, sin moverla.
4. Transferir el líquido sobrenadante (este debe estar homogéneo, sin grumos) a un tubo estéril de 16 x 150 mm.
5. Ajustar la suspensión agregando gota a gota agua destilada estéril, a un patrón 0.5 de MacFarland mediante comparación visual de la turbidez. No ajustar por debajo de un patrón 0.5 de MacFarland.
6. Diluir 1 ml de la suspensión ajustada en 4 ml de agua o solución salina estériles (dilución 1:5).

Preparación de los fármacos

Material necesario: tubos indicadores de crecimiento micobacteriano medio BBL MGIT de 7 ml, drogas de 2ª Línea: Kanamicina (Km), Amikacina (Amk), Capreomicina (Cpm) y Moxifloxacina (Mfx) de BACTEC MGIT 960, con 1 frasco de cada antibiótico liofilizado y 2 tubos de 20 ml de suplemento OADC. Adquirir además la Levofloxacina (Lfx) por separado, de la marca SIGMA-FLUKA. Otros materiales: agua destilada estéril, microorganismos para el control de calidad (una cepa H37Rv sensible a Km, Amk, Cpm, Lfx, Mfx y dos cepas resistentes bien caracterizadas –una a aminoglucósidos y otra a quinolonas, pueden usarse las del panel de control de calidad de PFS y el equipo de laboratorio necesario para este procedimiento. Reconstituir cada frasco de medicamento liofilizado con 4 ml de agua destilada estéril (de preferencia desionizada para mejor resultado). Es importante hacer este paso con mucho cuidado para evitar errores. El frasco reconstituido puede usarse para 40 pruebas aproximadamente (excepto con la Moxifloxacina):

⁹ La preparación del patrón turbidimétrico MacFarland No. 1 está descrito en el Método de las Proporciones en medio Lowenstein-Jensen. Prueba indirecta, más adelante.

Tabla AII.6 Preparación de los fármacos de 2ª Línea.

Fármaco	No. De Catálogo	Fórmula liofilizada (µg)	Volumen de reconstitución del vial (mL)	Concentración final (µg/mL)	Concentración crítica (µg/mL)	Volumen usado (mL)
Amikacina	215350	332	4	83	1.0	0.1
Kanamicina	215348	830	4	207.5	2.5	0.1
Capreomicina	215351	830	4	207.5	2.5	0.1
Moxifloxacin	215349	498	3	166	2.0	0.1
			12	41.5	0.5	0.1
Suplemento de crecimiento	211886	Middlebrook OADC Enrichment (10 tubos con 20 mL c/u)				

Preparación de la Levofloxacin (Lfx)

Se trabaja con la sal químicamente pura del fármaco (potencia de 98%). Se pesan 100 mg y se prepara la solución “madre” o de referencia, a una concentración de 10 000 µg/ml. Para ello, se solubiliza la droga inicialmente con hidróxido de sodio 0.1 M y se afora a 9.8 ml con agua destilada estéril.

Para preparar la solución de trabajo, se realizan dos diluciones, en la primera se toma 1ml de la solución madre y se afora con 9ml de agua destilada estéril (dilución S1), después se toman 1245 µL de la S1 y se aforan con 8755 µl de agua destilada estéril (dilución S2). Esta última dilución es la de trabajo. Tabla AII.7

Tabla AII.7 Preparación de Levofloxacin

Agente Antimicrobiano	Potencia* (µg/mL)	Solvente	Concentración de la solución madre (de referencia). (µg/mL)	Concentración final S2 (µg/mL)	Concentración crítica (µg/mL)	Volumen usado (mL)
Levofloxacin	98%	Hidróxido de sodio 0.1M	10,000	124.5	1.5	0.1

Posteriormente la solución madre sobrante se divide en alícuotas de 500 y 1000 µL y se congela a – 20 o –70°C hasta su uso. Una vez descongelada cada alícuota de la solución madre, al terminar el procedimiento, el sobrante se elimina.

Preparación del medio de cultivo con y sin fármacos

1. Etiquetar los tubos con y sin el fármaco, uno con C (tubo control de crecimiento), otro con Km, con Amk, con Cpm, con Lfx y dos (para las concentraciones 2.0 y 0.5 µg/mL) con Mfx.

2. Agregar asépticamente 0.8 ml de suplemento de crecimiento OADC a cada tubo.
3. Posteriormente transferir con una micropipeta, asépticamente 100 µl (0.1 ml) de cada uno de los fármacos (excepto la Levofloxacin) al tubo correspondiente. Es importante hacer este paso con mucho cuidado para evitar cualquier error.
4. Para el caso de la Levofloxacin, se utilizan 100 µl (0.1mL) de la dilución S2 al tubo BBL correspondiente.
5. Al tubo C (control de crecimiento) no debe agregarse antibióticos.
6. Como ya se mencionó anteriormente, los frascos con el fármaco sobrante deben fraccionarse de acuerdo a la carga de trabajo y conservarse a -20 a -70 °C. Cada alícuota al utilizarse, si hay sobrante debe desecharse.

Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad

1. Con una pipeta o micropipeta, transferir asépticamente 0.1 ml del tubo BBL del cultivo a trabajar o de la suspensión de microorganismos (suspensión 1:5) a 10 ml de agua destilada estéril para preparar la suspensión 1:100 de control de crecimiento. Mezclar bien la suspensión de control de crecimiento utilizando un agitador tipo vórtex.
2. Inoculación del tubo C (control): inocular 0.5 ml de la suspensión 1:100 de control de crecimiento en el tubo MGIT que tiene la etiqueta C.
3. Inoculación de los tubos que contienen antibióticos:
4. Con una pipeta o micropipeta, transferir asépticamente 0.5 ml del tubo BBL del cultivo a trabajar o de la suspensión de microorganismos (suspensión 1:5), a cada uno de los tubos con antibiótico (Km, Amk, Cpm, Lfx y Mfx).
5. Cerrar bien los tubos. Mezclar invirtiéndolos suavemente entre tres y cuatro veces.
6. Registrar e introducir los tubos BBL inoculados (control y con fármacos) en el BACTEC MGIT 960 e incubar a 37 °C.

Resultados

La duración de la prueba es de 4 a 12 días. Antes de realizar una PFS es indispensable comprobar la identificación de la cepa aislada como *M. tuberculosis* o complejo *M. tuberculosis*. Es preciso asegurarse de que se ha utilizado exclusivamente un cultivo puro (hay que descartar la presencia de mezclas de micobacterias, etc.).

Para las pruebas de resistencia a fármacos, se deben confirmar visualmente los tubos, como sigue:

- Si el tubo control y el que contiene la cepa resistente a un fármaco específico presentan aspecto floculado (típico de *M. tuberculosis*), se puede informar el resultado obtenido.
- Si el tubo control y/o el que contiene la cepa resistente al fármaco específico presentan turbidez, puede sospecharse contaminación y se deberá realizar el siguiente procedimiento:

Hacer un frotis del tubo que presenta turbidez para descartar que exista contaminación.

Cuando la prueba presenta crecimiento rápido, significa un exceso de inóculo, una MNTB de crecimiento rápido o una contaminación, y deberá hacer un frotis del tubo control para observar lo siguiente:

- Si no hay BAAR o hay BAAR con la presencia de otros microorganismos, es contaminación. Informar el resultado como contaminado.
- Si hay BAAR, enviar el tubo original a tipificación.

Informe de resultados

Con ayuda del programa TB Exist se interpretan los resultados como se indica. Cuando las unidades de crecimiento (GU) del tubo GC alcanzan ≥ 400 dentro del Protocolo de tiempo, se registra en el informe determinado descargado; sin embargo, el instrumento no interpreta la susceptibilidad. La interpretación debe realizarse manualmente de acuerdo con los siguientes criterios:

- S = susceptible = el GU del tubo de la droga es menos que 100
- R = resistente = el GU del tubo de la droga es 100 o más

NOTAS:

1. Las PFS para los fármacos de segunda línea sólo se deben repetir una vez si la primera prueba falla. Si no se puede obtener un resultado válido después del segundo intento, informe de la prueba como "Error de prueba", proporcione un breve comentario en la sección "Comentarios" de PFS, y escriba una nota en el archivo para documentar las fallas de la PFS.
2. Registre "Susceptible", "Resistente" o "Error de prueba" en la hoja de trabajo / libro del laboratorio interno y en el formulario de solicitud de laboratorio (si corresponde). Además, conserve las impresiones de MGIT para todos los resultados de DST con los registros del paciente.

Control de calidad

Se lleva a cabo con la cepa H37Rv ATCC, que es una cepa de referencia de *M. tuberculosis* pansensible, y dos cepas resistentes bien caracterizadas –una a

aminoglucósidos y otra a quinolonas- pueden usarse las del panel de control de calidad de PFS y el equipo de laboratorio necesario para este procedimiento. Se va hacer control de calidad con las cepas mencionadas para probar la sensibilidad de los lotes nuevos de medio BBL MGIT BACTEC con y sin medicamento y también al reconstituir un nuevo kit de medicamentos.

Los resultados de las PFS de segunda línea pueden verse interferidos por:

- Aislados con mezclas de micobacterias y contaminados
- Aislados con más de 4 semanas de crecimiento
- Aislados desecados y acidificados
- Aislados subcultivados o con colonias escasas
- Físicos (inactivación de los medicamentos por calor, luz y tiempo de almacenaje)
- Calidad del medio (caducidad)
- Variaciones en la temperatura de incubación

Medidas de bioseguridad

Las medidas de bioseguridad para el trabajo bacteriológico de la tuberculosis son descritas en la sección 3.2, 3.2.1, 3.2.3 al 3.2.5 del Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la tuberculosis parte II Cultivo. OMS. 2008.

Método de las proporciones en medio Lowenstein-Jensen a medicamentos de 1ª Línea. (Canetti, Rist y Grosset). Prueba indirecta

Es la prueba más utilizada en América Latina. Es una prueba estandarizada que se considera como el estándar de oro para comparar otros métodos.

Principio

Consiste en determinar la proporción de mutantes resistentes a cada fármaco que tenga una cepa de *M. tuberculosis*. Se basa en poder diferenciar en el laboratorio una cepa sensible de otra resistente, mediante un método que permite separar los bacilos sensibles de las mutantes resistentes y que al contar unos y otros se pueda determinar su proporción.

Para este método se emplea el medio de Lowenstein-Jensen solo y con la adición del fármaco. El medio sin fármaco permite conocer el número total de la población bacilar sembrada; y el medio con fármaco, permite identificar el número de mutantes resistentes al fármaco correspondiente.

Preparación del medio de cultivo

Los medios de cultivo con y sin fármaco deben ser preparados al mismo tiempo. Actualmente en el InDRE su preparación está a cargo del Laboratorio de Medios de Cultivo, el cual tiene el procedimiento a disposición del usuario

que lo requiera. La duración de ambos medios es de hasta dos meses desde la fecha de su preparación, si se les mantiene en refrigeración entre 4 a 8 °C.

El medio de Lowenstein-Jensen sin fármaco es el mismo utilizado para el cultivo. El medio con fármaco se prepara incorporando al medio Lowenstein-Jensen los fármacos en su concentración crítica antes de la coagulación.

Concentración crítica

Es la concentración mínima del fármaco que inhibe al 99% de cepas salvajes de *M. tuberculosis* que nunca han sido expuestas al fármaco, pero que al mismo tiempo no inhibe a las cepas de *M. tuberculosis* que han sido aisladas de pacientes que no responden a la terapia y que son consideradas resistentes.

Proporción crítica

También llamado criterio de resistencia, es el porcentaje de mutantes resistentes de una población bacilar, por encima del cual la cepa es considerada resistente, y por debajo del cual la cepa se considera como sensible.

En la Tabla AII.8 se presentan las concentraciones y las proporciones críticas empleadas para los principales fármacos antituberculosos, los llamados fármacos de primera línea: Isoniazida (H), Estreptomina (S), Rifampicina (R) y Etambutol (E).

La Pirazinamida sólo es activa a un pH ácido, por lo tanto, para efectuar la prueba de sensibilidad por el método de las proporciones, el medio de Löwenstein-Jensen debe ser acidificado hasta un pH5 antes de su coagulación. A ese pH el crecimiento de *M. tuberculosis* es lento y difícil y algunas cepas no se alcanzan a desarrollar. Por otra parte, si el pH es mayor a 5.5 el fármaco no es activo y la prueba daría un resultado de falsa resistencia.

Por este motivo, la resistencia a la pirazinamida se determina indirectamente mediante una prueba enzimática que se describirá posteriormente.

Tabla AII.8 Criterios de resistencia del *M tuberculosis* a los fármacos antituberculosos

Fármacos	Concentración crítica * µg/ mL	Proporción crítica (%)
Isoniazida	0.2	1
Estreptomina **	4.0	1
Rifampicina	40.0	1
Etambutol (clorhidrato)	2.0	1
* Concentración de los fármacos en el medio de Löwenstein-Jensen antes de la coagulación **No se debe utilizar el sulfato de estreptomina. Se usa sulfato de dihidroestreptomina o sesquisulfato de dihidroestreptomina		

Potencia de los fármacos

Se refiere a los microgramos (μg) del fármaco activo por miligramo (mg) de peso total del producto empleado, los cuales constituyen la potencia real del fármaco.

Pesado y preparación de soluciones stock del fármaco anti-tuberculosis

Únicamente deberá utilizarse el fármaco puro en polvo, de fabricantes reconocidos. Es recomendable almacenarlo en un desecador para prevenir la absorción de la humedad ambiental. La solución debe ser reemplazada regularmente, con base en la información de la actividad del lote, que podrá ser consultada en el sitio de internet del fabricante. Por lo tanto, a excepción de la rifampicina, la mayoría de los laboratorios tendrán que adquirir sólo un frasco pequeño del fármaco en cada ocasión.

La potencia del fármaco en polvo adquirido debe tomarse en cuenta, ya que varía de un fabricante a otro.

Cuando la potencia del fármaco es de 100%, no necesita ser calculada la potencia real. Pero en el caso de que no corresponda al 100% entonces debe calcularse a partir de la información proporcionada por el fabricante:

1. Pureza del fármaco.
2. Contenido de agua.
3. Sal/cuenta de la fracción de iones (dependiendo si el fármaco es sal o base).

El solvente utilizado para las soluciones stock es agua destilada estéril, excepto para la rifampicina, cuyo solvente debe ser dimetilformamida o dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones del fármaco son consideradas auto-esterilizadas y no deben ser esterilizadas en autoclave o ultrafiltradas. En la Tabla All.9 se presentan estos valores para los fármacos más empleados en la actualidad.

Tabla All.9 Potencia de los diferentes fármacos utilizados para pruebas de farmacosensibilidad

Fármaco	μg de sustancia activa por mg
Isoniazida	1,000
Estreptomina	800
Rifampicina	1,000
Etambutol clorhidrato (*)	890

* Se determinará de acuerdo a la información que presente la etiqueta del envase

Preparación de las soluciones madre o stock del fármaco

Las soluciones madre o stock se preparan empleando como solvente agua destilada estéril. Para los fármacos no solubles en agua se emplea el solvente recomendado.

Es conveniente estandarizar la concentración del fármaco en estas soluciones a 10,000 µg/ml o 20,000 µg/ml.

En la Tabla AII.10 se indican el solvente y la cantidad que se debe agregar a 100 mg del fármaco, para obtener las soluciones empleadas con mayor frecuencia en la prueba de sensibilidad.

Tabla AII.10 Preparación de las soluciones madre o stock de fármacos antituberculosos

Fármaco	Solvente	Volumen de solvente para 100 mg del fármaco (ml)	Concentración final del fármaco µg/ml
Isoniazida	Agua destilada	10	10000
Estreptomina	Agua destilada	8	10000
Rifampicina	Dimetilsulfoxido*	5	20000
Etambutol clorhidrato	Agua destilada	8.9	10000

*Se puede emplear dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilformamida, aunque ésta última no es muy recomendable para almacenarla.

Recomendaciones para preparar las soluciones madre y las diluciones del fármaco.

Pesar 100 mg como mínimo de cada fármaco, cantidades más pequeñas pueden dar lugar a error. Preparar las soluciones madre a partir del fármaco puro, pesado y disuelto en el solvente adecuado, el mismo día en que se prepara el medio de cultivo. Las soluciones del fármaco no requieren ser esterilizadas. Las soluciones madre deben conservarse congeladas a -20 o -70 °C, distribuidas en viales para ser utilizadas una por vez. En estas condiciones pueden durar hasta un año. Nunca volver a congelar una solución que ya ha sido utilizada.

En la Tabla AII.11 se detallan las diluciones que se deben hacer a partir de la solución madre, para que 1 ml contenga la cantidad del fármaco que, incorporada a 500 ml del medio Lowenstein-Jensen, sea la concentración crítica. Se recomienda que la cantidad del fármaco que se agregará al medio sea lo más cercana a 1 ml.

Tabla AII.11 Preparación de las diluciones del fármaco a partir de la solución madre para agregarlas al medio de Lowenstein-Jensen. Cantidades para 500 ml de medio

Fármaco	Dilución a partir de solución madre (*)	Volumen en mililitros de dilución que se agregará a 500 ml de medio
Isoniazida	Dilución A: 1:10, concentración 1000 µg/ml	1
	Dilución B: 1:10, concentración 100 µg/ml	
Estreptomina	Dilución A: 1:5, concentración 2000 µg/ml	1
Rifampicina	Solución madre sin diluir	1
Etambutol clorhidrato	Dilución A: 1:10, concentración 1000 µg/ml	1

(*) Como solvente se emplea agua destilada. La rifampicina no requiere dilución.

En la tabla AII.12 se presentan los valores de la concentración final (crítica) por ml y la cantidad total de cada fármaco contenida en 500 ml del medio de cultivo Lowenstein-Jensen.

Tabla AII.12 Concentración del fármaco antituberculoso en el medio Lowenstein-Jensen

Fármaco	Concentración µg/ml	Cantidad en µg para 500 ml de medio
Isoniazida	0.2	100
Estreptomina	4	2,000
Rifampicina	40	20,000
Etambutol clorhidrato	2	1,000

La dilución del fármaco contenida en 1 ml, según lo señalado en la tabla AII.11, se incorpora a 500 ml del medio de cultivo (Tabla AII.12) mezclando por agitación suave y rotando el frasco durante 5 minutos.

A continuación el medio se distribuye en tubos y se coagula, en la forma señalada en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte II Cultivo. OMS/OPS. 2008

Una vez distribuido y coagulado el medio de cultivo adicionado del fármaco, se deja a temperatura ambiente para que se enfríe y se ajustan las tapas de rosca. Guardar en refrigeración.

La temperatura de coagulación del medio de cultivo no debe exceder los 85 °C y el tiempo de coagulación no debe pasar de 45 minutos. El medio de cultivo con los fármacos incorporados se conservará en refrigeración convenientemente resguardado para evitar su desecación.

El tiempo máximo de conservación en estas condiciones será de hasta dos meses. La actividad del fármaco de cada nueva partida del medio de cultivo debe ser controlada.

Preparación del patrón turbidimétrico

Como patrón turbidimétrico para ajustar las suspensiones bacilares madre de las cepas en estudio se utiliza el MacFarland número 1, porque da una turbidez semejante a 1 mg/ml de suspensión bacilar. Puede ser adquirido en forma comercial o preparado en el laboratorio de la siguiente manera:

- MacFarland número 1

Mezclar:

0.1 ml de solución acuosa de cloruro de bario al 1%

9.9 ml de solución acuosa de ácido sulfúrico al 1%

La solución resultante, cuenta con 3 meses de duración, y se conservará en un tubo cerrado herméticamente. Deberá agitarse antes de usarse.

Preparación de las suspensiones de la cepa en estudio

Las características que debe tener la cepa que se va a estudiar se detallaron previamente en este lineamiento.

El material necesario es el siguiente:

- Una gradilla de metal con los siguientes tubos:
 - Un tubo con la cepa en estudio (sembrada en medio Lowenstein-Jensen).
 - Un tubo con la suspensión patrón No 1 de MacFarland (1 mg/ml).
 - Un tubo con la suspensión bacteriana ajustada al No 1 de MacFarland.
- Una botella McCartney de 14 a 28 ml de capacidad, con unas 10 perlas de vidrio de aproximadamente 3 mm de diámetro.
- Un tubo para preparar la suspensión conforme al patrón.
- Seis tubos, cada uno con 9 ml, medidos exactamente, de agua destilada estéril y rotulados 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .
- Una pipeta de 10 ml.

- Siete pipetas serológicas de 1 ml o 2 ml, graduadas en centésimas.
- Asa desechable.
- Un matraz con agua destilada.

Los tubos serán los utilizados en el laboratorio para distribuir el medio de cultivo. Todo el material debe estar estéril.

Procedimiento

1. Tomar del tubo de cultivo con la cepa en estudio, auxiliado con un asa desechable, una parte de cada colonia si están separadas, o del mayor número posible de las colonias desarrolladas si son confluentes, para obtener una muestra representativa; y colocar en un frasco con perlas de vidrio, al que previamente se habrán adicionado 5 gotas de agua destilada estéril, para disgregar las colonias.
2. Cerrar herméticamente y agitar el frasco con agitador tipo vórtex.
3. Por último, agregar aproximadamente 4 ml de agua destilada y agitar nuevamente para obtener una suspensión homogénea.
4. Dejar sedimentar de 30 a 60 segundos la suspensión preparada, con la pipeta Pasteur retirar la parte homogénea y colocarla en el tubo destinado a preparar la suspensión conforme al patrón, para lo cual se le va agregando agua destilada y agitando, hasta que la opacidad de ella se ajuste a la del patrón MacFarland No. 1 equivalente a un miligramo de masa bacilar por mililitro; ésta es la llamada suspensión madre (ajustada al MacFarland No 1). En algunas ocasiones, cuando las colonias desarrolladas en el primocultivo son muy escasas, la opacidad se ajustará según el patrón 10^{-1} , que equivale a 0.1 mg. de masa bacilar por mililitro. Esta primera etapa de la homogenización de la cepa en agua destilada debe hacerse con sumo cuidado.
5. A partir de esta suspensión madre de la cepa en estudio se preparan 6 nuevas suspensiones en escala decimal, utilizando los 6 tubos con 9 ml de agua destilada rotulados de 10^{-1} a 10^{-6} y las 7 pipetas de un mililitro graduadas en centésimas.
6. Para hacer las suspensiones decimales se toma con una pipeta de 1 ml, un mililitro de la suspensión madre, cantidad que se mezcla con 9 ml de agua destilada del primer tubo, es decir el que se rotuló 10^{-1} y se mezcla con el agitador tipo vórtex para obtener una suspensión homogénea. A continuación, y con una nueva pipeta estéril se toma 1 ml de la suspensión 10^{-1} y se mezcla con los 9 ml de agua destilada del tubo rotulado 10^{-2} en la misma forma que antes. Se continúa así, usando cada vez una pipeta nueva, hasta preparar las 6 diluciones establecidas.

7. Es importante insistir en que para la fidelidad de la prueba es fundamental que se use una pipeta nueva para cada dilución, que los 9 ml de agua destilada sean medidos con precisión, para lo cual debe usarse la pipeta de 10 ml, y traspasar exactamente 1 mililitro de suspensión de un tubo a otro.

En esta etapa no es aconsejable utilizar procedimientos diferentes de los indicados, porque si bien pueden significar economía de tiempo o del material, disminuyen considerablemente la exactitud de las suspensiones decimales.

Siembra de las suspensiones bacilares

Para sembrar las suspensiones bacilares se necesita el siguiente material:

- Una gradilla de metal con:
 - Tubo con la suspensión 10^{-3}
 - Tubo con la suspensión 10^{-5}
 - Tubo con la suspensión 10^{-6}
- Tres series de tubos de medio Lowenstein-Jensen colocado de la siguiente forma:
 - La primera serie rotulada 10^{-3} , debe estar constituida de 2 tubos de medio de cultivo sin fármaco, llamados tubos control y 1 tubo de medio con cada fármaco (concentración crítica).
 - La segunda serie rotulada 10^{-5} , debe ser igual a la anterior.
 - La tercera serie rotulada 10^{-6} , debe tener sólo 2 tubos de medio Lowenstein-Jensen, sin fármaco que sirve como control.
- Tres pipetas de 1 ml graduadas en centésimas.
- Una bandeja con fondo inclinado para colocar los tubos. De las 6 suspensiones preparadas, se utilizan para la siembra solamente las 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} ; las restantes se desechan.

Procedimiento

1. Sembrar con 0.2 ml de la suspensión 10^{-3} cada uno de los tubos correspondientes a la primera serie rotulada 10^{-3} .
2. Sembrar con 0.2 ml de la suspensión 10^{-5} los tubos de la segunda serie rotulada 10^{-5} .
3. Sembrar con 0.2 ml de la suspensión 10^{-6} los dos tubos de la tercera serie rotulada 10^{-6} .
4. Utilizar una pipeta diferente de 1 ml graduada en centésimas para cada suspensión (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6}), con lo cual se siembran todos los tubos de la serie correspondiente.
Si en el momento de sembrar algún tubo, éste contiene agua de condensación, deberá eliminar el tubo.

5. Una vez sembradas las tres series, tomar cada tubo por sus extremos con el pulgar y el índice de la misma mano, mantener en posición horizontal y hacerlo rotar suavemente para que la suspensión sembrada se distribuya sobre toda la superficie del medio.
6. Los tubos se colocan inmediatamente en una bandeja de fondo inclinado para mantenerlos en esa posición. La bandeja se lleva a la cámara a 37 °C, cuidando que los tubos no roten, pues si esto sucede las colonias se desarrollarán en el borde del medio y no podrán ser contadas.
7. La tapa de rosca de cada tubo debe mantenerse floja durante las primeras 24 a 48 horas o hasta que se evapore la parte líquida de la siembra, después de lo cual se ajustará firmemente.

Lectura e informe de resultados

Como se ha observado, para preparar la suspensión madre de la cepa en estudio se utiliza la masa bacilar obtenida al tomar una parte del mayor número posible de las colonias desarrolladas.

Esta suspensión madre contiene 1 miligramo de masa bacilar por mililitro. Sin embargo, la cantidad de bacilos en 1 miligramo de masa bacilar varía considerablemente de una cepa a otra; esta variación puede ser de 1 millón a 100 millones de gérmenes.

Por ello es necesario sembrar las dos diluciones 10^{-3} y 10^{-5} en las dos series de tubos de medio Lowenstein-Jensen con y sin fármaco. Los dos ejemplos siguientes aclaran este concepto:

1. Si la suspensión madre contiene 100 millones de gérmenes por mililitro, la suspensión 10^{-3} , que ha sido diluida 1000 veces, contiene sólo 100,000 gérmenes. Como la siembra se efectúa con la quinta parte de 1 mililitro (0.2 ml) en el tubo de control se desarrollarán aproximadamente 20,000 colonias, por cierto, imposibles de contar. Pero como también se siembra la suspensión 10^{-5} que por haber sido diluida 100,000 mil veces más que la suspensión madre, contiene sólo mil gérmenes por mililitro, al sembrar la quinta parte de un mililitro (0.2 ml) se desarrollarán en el tubo de control 200 colonias, que pueden ser contadas y permitirán establecer el resultado de la prueba.
2. Si la suspensión madre contiene sólo 1 millón de bacilos por mililitro, la siembra de 0.2 ml de la suspensión 10^{-5} , dará origen a sólo 2 colonias, cifra absolutamente insuficiente para determinar un porcentaje. Pero la siembra de 0.2 ml de la suspensión 10^{-3} dará un desarrollo de 200 colonias, cifra que permite hacer ese cálculo.

En el primer ejemplo, la lectura del resultado de la prueba se pudo efectuar en la serie sembrada con la suspensión 10^{-5} , mientras que la serie sembrada con la suspensión 10^{-3} sólo sirvió como comparación. En el segundo ejemplo, la lectura del resultado de la prueba sólo se pudo hacer en la serie sembrada con la suspensión 10^{-3} .

A veces no es posible contar las colonias en los tubos de control de ninguna de las dos series antes mencionadas (10^{-3} y 10^{-5}). En estos casos las colonias de los tubos de la serie 10^{-6} , que sí se pueden contar permitirán calcular el número de colonias que hay en los tubos de la serie 10^{-5} y establecer así los resultados de la prueba.

En los casos en que el número de las colonias desarrolladas en los tubos sin fármaco o de control de la serie 10^{-3} sea inferior a 100, se debe repetir la prueba, pero sólo con los fármacos a los cuales aparentemente la cepa en estudio haya resultado sensible.

De acuerdo con lo ya señalado, la lectura de la prueba, para emitir un resultado, se debe realizar en la siguiente secuencia:

- Contar cuidadosamente las colonias en los tubos de control de la serie en que sea posible hacerlo. La media de las colonias contadas en los 2 tubos control indica el número de bacilos sembrados.
- En la misma serie, contar las colonias desarrolladas en cada uno de los tubos del fármaco, lo que indica el número de mutantes resistentes a cada fármaco. La relación entre el número de mutantes resistentes al fármaco de que se trate y el número de bacilos sembrados (tubos control) multiplicada por 100 proporciona el porcentaje de resistencia a ese fármaco.
- Al comparar este porcentaje con la proporción crítica establecida para ese fármaco se determina si la cepa es sensible o resistente.
- Los resultados son leídos a los 21 días (3 semanas) y a los 42 días (6 semanas). La lectura a los 21 días sólo es definitiva con respecto a aquellos fármacos a los cuales la cepa ha sido clasificada como resistente. La lectura a los 42 días es la que da los resultados definitivos para los fármacos a los cuales la cepa es sensible.

Ejemplo: Si a los 21 días una cepa presenta resistencia a 1 o 2 fármacos, se debe informar esta resistencia (informe preliminar), agregando que el resultado del resto de los fármacos queda pendiente hasta transcurridas 3 semanas más. Si a los 21 días una cepa presenta sensibilidad a los fármacos, estos resultados no pueden ser informados, sino que se deben volver a leer a los 42 días. Se recomienda informar los resultados en la forma más simple, indicando solamente si la cepa es sensible o resistente a cada uno de los fármacos estudiados.

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Método de las proporciones en Lowenstein-Jensen. Prueba directa

Principio

El principio es el mismo que el de la prueba indirecta. Este método se realiza a partir de una muestra de expectoración con resultado positivo en la baciloscopía, con el objeto de abreviar el tiempo de diagnóstico, principalmente en los casos de fracaso de tratamiento, cuyas muestras tienen un gran número de bacilos.

Cuando el resultado no es concluyente se debe repetir la prueba. La sensibilidad y especificidad de esta prueba no siempre son tan buenas como las de la prueba indirecta.

Muestra de expectoración

Realizar una baciloscopía de acuerdo a la metodología convencional y con base en los resultados de la misma, se procede como se indica en el siguiente esquema:

Tabla AII.13 Diluciones a sembrar de acuerdo al resultado de la baciloscopía

Resultado de baciloscopía	Diluciones
(+)	No diluido, 10^{-2} y 10^{-3}
(++)	10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4}
(+++)	10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5}

Procesamiento de la muestra

Debe ser homogeneizada y descontaminada con el método convencional (cultivo por **Petroff**) de acuerdo a las indicaciones descritas.

Preparación de las diluciones

Preparar diluciones decimales a partir del sedimento de la muestra homogeneizada y descontaminada.

Procedimiento

1. Colocar 9 ml de agua destilada estéril en cada uno de los tubos de ensayo previamente identificados para hacer las diluciones correspondientes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , etc.).
2. Transferir 1 ml del sedimento tratado no diluido al tubo 10^{-1} y homogeneizar bien.
3. Tomar otra pipeta y transferir 1 ml del tubo 10^{-1} al tubo 10^{-2} y así sucesivamente, según las diluciones que se requieran. Para cada dilución utilizar diferentes pipetas estériles.

Procedimiento para la siembra

Identificar los tubos de medio de cultivo de Lowenstein-Jensen con y sin fármaco, indicando la dilución correspondiente para la siembra de la prueba, de acuerdo a lo siguiente:

1. **Muestra (+):** Se utilizan 6 tubos de medio Lowenstein-Jensen: 2 controles (medios sin fármaco) y 4 con fármaco (H, S, R y E) para inocular 0.2 ml en cada uno del sedimento no diluido. Otro grupo de 6 tubos igual al anterior para inocular 0.2 ml en cada uno de la dilución 10^{-2} . Finalmente, solo 2 tubos controles (sin fármaco) para sembrar 0.2 ml en cada uno de la dilución 10^{-3} .
2. **Muestra (++):** Se utilizan 6 tubos de medio Lowenstein-Jensen: 2 controles (medios sin fármaco) y 4 con fármaco (H, S, R y E) para inocular 0.2 ml en cada uno de la dilución de 10^{-1} . Otro grupo de 6 tubos igual al anterior para sembrar 0.2 ml en cada uno de la dilución de 10^{-3} . Finalmente, sólo 2 tubos controles (sin fármaco) para sembrar 0.2 ml en cada uno de la dilución 10^{-4} .
3. **Muestra (+++):** Se utilizan 6 tubos de medio Lowenstein-Jensen: 2 controles (medios sin fármaco) y 4 con fármaco (H, S, R y E) para inocular 0.2 ml en cada uno de la dilución de 10^{-2} . Otros grupo de 6 tubos igual al anterior para sembrar 0.2 ml en cada una de la dilución de 10^{-4} . Finalmente, sólo dos tubos controles (sin fármaco) para sembrar 0.2 ml en cada uno de la dilución 10^{-5} .

Una vez sembradas las tres series, tomar cada tubo por sus extremos con el pulgar y el índice de la misma mano, mantener en posición horizontal y hacerlo rotar suavemente para que la suspensión sembrada se distribuya sobre toda la superficie del medio.

Cerrar los tubos de medio de cultivo, sin apretar la tapa para colocarlos en la estufa.

Incubación

Los tubos se colocan inmediatamente en una bandeja de fondo inclinado para mantenerlos en esa posición. La bandeja se lleva a la cámara a 37 °C, cuidando que los tubos no roten, ya que si esto sucede las colonias se desarrollarán en el borde del medio y no podrán ser contadas.

La tapa de rosca de cada tubo debe mantenerse floja durante las primeras 24 a 48 horas o hasta que se evapore la parte líquida de la siembra, después de lo cual se ajustará firmemente.

Lectura e informe de resultados

Ambas actividades se llevan a cabo de la forma descrita en la prueba indirecta.

Control de calidad

Se lleva a cabo con la cepa H37 Rv ATCC que es una cepa de referencia de *M. tuberculosis* sensible a SIRE y dos cepas resistentes bien caracterizadas – pueden usarse las del panel de control de calidad de PFS (no MDR, pero si resistentes a Isoniacida y Rifampicina separadamente con otra resistencia asociada) que se utiliza para probar la sensibilidad de los lotes nuevos de medio. El material utilizado en esta prueba se debe colocar en bolsa roja, esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Prueba de la Pirazinamidasa (método enzimático) o Método de Wayne.

Esta prueba se usa para conocer la condición de resistencia o sensibilidad de una cepa a la pirazinamida. Se aplica en un aislamiento joven (3 a 4 semanas de desarrollo) de *M. tuberculosis* puro, procedente de medio sólido o líquido.

Principio

Las cepas del *M. tuberculosis* que son sensibles a la pirazinamida (Z) poseen la enzima parazinamidasa (PZAasa) que metaboliza la pirazinamida en ácido pirazinoico (POA). Las cepas pirazinamida-resistentes han perdido su actividad pirazinamidasa. El método de Wayne que se describe a continuación pone de manifiesto la presencia de ácido pirazinoico por la formación de una sal ferrosa de color rosa; está basado en técnicas para estimar el ácido pirazinoico aplicadas a las micobacterias.

Procedimiento

1. Preparar el medio de Pirazinamida (Manual de Procedimientos de Laboratorio InDRE/SAGAR. Balandrano S, Anzaldo G y col. 1996) y distribuir 5 ml en tubos de 16x150 mm.
2. Esterilizar a 15 libras de presión, 123 °C por 15 minutos.
3. Depositar en el medio de pirazinamida un asa bien cargada de crecimiento bacilar de un cultivo joven en medio de Lowenstein-Jensen.
4. Incubar a 37 °C durante 4 días.
5. Cepas control:
6. Positivo: cepa de referencia de *M. tuberculosis* sensible a las drogas, preferentemente H37Ra
7. Negativo: cepa de *M. bovis* BCG
8. Agregar 1.0 ml de sulfato ferroso amoniacal al 1% recién preparado y refrigerarlo durante 4 horas.
9. Los resultados se interpretan de la siguiente forma:
 - a. Cepa sensible: presencia de una banda rosada de difusión de sal ferrosa.
 - b. Cepa resistente: no se forma la banda rosa.

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Método Modificado de las Proporciones de Canetti, Rist y Grosset en medio Middlebrook 7H10. Prueba indirecta para medicamentos antituberculosis de 2^a línea.

Principio

Este método cuantifica de manera precisa la proporción de mutante resistente a cada medicamento presente en una población micobacteriana. Para cada fármaco en estudio, se prepara una placa con medio sólido Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC y glicerol y adicionado con la concentración crítica del medicamento, determinada previamente (OMS, 2017). En esta placa se siembran 100 µl del aislado en estudio en suspensión diluida 1:100 (10^{-2}), a partir de una suspensión ajustada al tubo 1 del nefelómetro de MacFarland (alrededor de 3×10^8 bacterias).

Simultáneamente y como control de crecimiento, en placas con el mismo medio sin medicamento se siembran 100 µl del inóculo micobacteriano en diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} a partir de la suspensión ajustada; se espera que al menos en una dilución se puedan contar entre 50 y 100 colonias. El número

encontrado se multiplica por la dilución utilizada para determinar las UFC que realmente se sembraron.

Al mismo tiempo se cuentan las UFC presentes en la placa con fármaco, las cuales corresponden a las mutantes que son resistentes. Se calcula la proporción porcentual de mutantes en la población total y si es igual o superior al 1%, el aislado en estudio se califica como resistente a ese medicamento (Canetti y col, 1963).

Cepa problema

Cultivo puro de *M. tuberculosis* aislado de una muestra clínica de un paciente grave con sospecha de farmacorresistencia al tratamiento de primera y segunda línea. Así como aquellos cultivos con patrón de resistencia a Rifampicina (monorresistencia o polirresistencia), MDR (Rifampicina e Isoniazida simultáneamente) procedentes de este laboratorio o no, al igual que las solicitudes especiales del PNTB. (WHO/HTM/TB/2014.1)

Cepa de referencia.

Cepas pansensible y resistentes bien caracterizadas con diferentes patrones de resistencia a las diferentes drogas.

- *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) (susceptible a los fármacos de segunda línea).
- *M. tuberculosis* 3A (339) OMS/2014 (resistente a inyectables de segunda línea).
- *M. tuberculosis* 6 (5057) OMS/2014 (resistente a quinolonas de segunda línea).

Procedimiento

Preparación de reactivos

Para la realización del presente procedimiento se requiere la preparación previa de las soluciones de trabajo de los fármacos antituberculosis a ensayar y de los medios de cultivo Middlebrook 7H10 con y sin fármacos.

Preparación de fármacos antituberculosis

Se trabaja con la sal químicamente pura de cada medicamento (Tabla All.14). Para la técnica de las proporciones se preparan soluciones “madre” o de referencia, pesando 100 mg de cada medicamento. Los fármacos se solubilizan inicialmente con el solvente indicado y se aforan con agua destilada estéril a 10 ml o de acuerdo a la potencia del fármaco (ver Tabla All.15), para quedar a una concentración de 10 000 µg/ml. Posteriormente las soluciones madre sobrantes se dividen en alícuotas de 200, 500 y 1000 µl y se congelan a -70°C hasta su uso.

Una vez descongelada cada alícuota de la solución madre, ésta se utiliza y al terminar el procedimiento se elimina el sobrante.

Tabla All.14 Fármacos antituberculosis de primera y segunda línea

Medicamento	Marca	Catálogo	Almacenaje	Pureza
Disulfato de Kanamicina	SIGMA	A1774	DE -2° a 8° C	
Disulfato de Kanamicina	SIGMA	K1876	Temeratura Ambiente	700mg/mg
Etionamida	SIGMA	E6005	2°-8 °C	
Isoniazida	SIGMA	I3377	Temeratura Ambiente	
Levofloxacin	FLUKA	28266	Temeratura Ambiente	98% HPLC*
Oflifaxina	SIGMA	O8757	2° a 8° C	
Rifampicina	SIGMA	R3501	0° C	95% HPLC*
Sulfato de Capreomicina	SIGMA	C42142	0° C	885 mg/mg

*High Purity Liquid Chromatoghaphy/Cromatografía Líquida de Alto Desempeño

Tabla All.15 Preparación de las soluciones madre de los fármacos y sus concentraciones críticas

Fármaco	Potencia* (µg/ml)	Solvente	Concentración de la solución madre (de referencia).	Concentración crítica final del fármaco en agar 7H10
			(µg/ml)	(µg/ml)
Capreomicina	Varia con el lote	Agua destilada estéril	10,000	4
Amikacina	Varia con el lote	Agua destilada estéril	10,000	2
Etionamida	1,000	DMSO	10,000	5
Isoniazida	1,000	Agua destilada estéril	10,000	0.2
				1
Kanamicina	Varia con el lote	Agua destilada estéril	10,000	4
Oflifaxina	1,000	NaOH 0.1M y agua destilada estéril	10,000	2
Levofloxacin	1,000	NaOH 0.1M y agua destilada estéril	10,000	1
Rifampicina	1,000	DMSO*	10,000	1

*Dimetilsulfóxido, M: Molar.

Preparación de placas de Agar Middlebrook 7H10 con y sin fármacos antituberculosis.

Para cada fármaco se prepararán placas con medio sólido Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC 10% y glicerol 0.5% y adicionado con la concentración crítica del medicamento (que es la concentración mínima a la que el

medicamento es efectivo contra *M. tuberculosis*) determinada previamente (WHO, 2017)

Se preparan frascos para cada medicamento, con el volumen de medio requerido de agar Middlebrook 7H10 con glicerol (Ej. 200 ml cada uno), los cuales se elaboran de acuerdo a las instrucciones del fabricante; una vez esterilizados los medios, se llevan a un baño de recirculación ajustado a una temperatura de 50°C y posteriormente (en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica Clase II, tipo A2), se adiciona a cada frasco, el OADC al 10% v/v y después, a partir de las diluciones de la solución madre de cada fármaco, a cada uno se agrega el volumen correspondiente a su concentración crítica (que es la concentración mínima a la que el fármaco es efectivo contra *M. tuberculosis*) y se vacía en la placa correspondiente. Tabla AII.16.

Tabla AII.16 Preparación de las diluciones de drogas a partir de la solución madre para agregarlas al medio de middlebrook 7h10 antes de que este se coagule. Cantidades para 200 ml de medio.

Fármaco	Dilución a partir de solución madre*	Volumen de dilución que se agregará a 200 mL de medio y concentración final del fármaco en Middlebrook 7H10
Isoniacida	Dilución A : 1:5 , concentración 2.000 µg/mL Dilución B : 1:10 , concentración 200 µg/mL Dilución C: 1:5 , concentración 40 µg/mL	1 mL de Sol. B= 1 µg/mL 1 mL de Sol. C= 0.2 µg/mL
Etionamida	Dilución A : 1:10 , concentración 1 .000 µg/mL	1 mL de Sol. A= 5 µg/mL
Rifampicina	Dilución A : 1:10 , concentración 1.000 µg/mL Dilución B : 1:5 , concentración 200 µg/mL	1 mL de Sol. B= 1 µg/mL
Capreomicina	Dilución A : 1:5 , concentración 2.000 µg/mL Dilución B : 1:5 , concentración 400 µg/mL	2 mL de Sol. B= 4 µg/mL
Amikacina	Dilución A : 1:5 , concentración 2.000 µg/mL Dilución B : 1:5 , concentración 400 µg/mL	1 mL de Sol. B= 2µg/mL
Kanamicina	Dilución A : 1:10 , concentración 1 .000 µg/mL Dilución B : 1:5 , concentración 400 µg/mL	2 mL de Sol. B= 4 µg/mL
Ofloxacina	Dilución A: 1:5, concentración 2.000 µg/mL Dilución B 1:5, concentración 400µg	1 mL de Sol. B= 2 µg/mL
Levofloxacina	Dilución A : 1:10 , concentración 1.000 µg/mL Dilución B : 1:5 , concentración 200 µg/mL	1 mL de Sol. B= 1 µg/mL

*Como solvente se emplea agua destilada.

Para el medio control (sin medicamento) se prepara un frasco con el doble de volumen requerido para los fármacos de agar Middlebrook 7H10 con glicerol,

de acuerdo a las instrucciones del fabricante; una vez esterilizado el medio se lleva a una temperatura de 50°C en un baño de re-circulación ajustado a esa temperatura y posteriormente se adiciona el OADC al 10% v/v en condiciones de esterilidad.

Los lotes de placas se preparan con anterioridad y para facilitar el trabajo, se usan placas con tres y cuatro cuadrantes. Una vez que se tienen listos los frascos con medio, con y sin fármacos, se vacían en las placas de petri.

Se les hace prueba de esterilidad colocándolos en la incubadora a 37°C durante 24-48 hrs. Posteriormente, el medio se guarda en refrigeración (4-8°C). Protegiendo las cajas de la luz y de la deshidratación en bolsas de plástico para ser usadas durante el lapso de un mes

Si la prueba se realiza a partir de un cultivo joven en medio sólido, se requiere al menos un tubo con abundante desarrollo (1 a 3 cruces).

Si excepcionalmente el desarrollo es menor se necesita tomar colonias de varios tubos hasta reunir al menos 20 colonias. La masa bacilar de los aislados se transfiere a un tubo de ensaye de 15 x 100mm con perlas de vidrio, se agita en vórtex para disgregar las colonias. Se agregan 3 ml de caldo Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa) al 10% v/v y 0.5% de glicerol y se agita nuevamente en vórtex con el fin de homogenizarlo. Si es medio líquido MGIT, se recupera la masa bacilar sedimentada colocándola en un tubo con medio 7H9. Se rotula utilizando un marcador indeleble con los siguientes datos: estado, número consecutivo asignado por el laboratorio y la fecha. El aislado es incubado a 37°C hasta alcanzar la concentración requerida con un máximo de 10 días.

Montaje de la prueba

- Colocar en una gradilla 4 tubos Eppendorf de 1.5ml estériles a los cuales se le ha adicionado previamente 0.9 ml de agua destilada estéril; rotúlelos del 1 al 4 (10⁻¹ al 10⁻⁴) con un marcador indeleble.
- Rotule un juego de placas de Petri con el estado, No. de laboratorio y fecha; para cada aislado a evaluar.
- Una vez que los aislados se encuentran adaptados en la fase logarítmica del crecimiento en caldo Middlebrook 7H9; el día de la prueba se ajusta a la turbidez del tubo número 1 del nefelómetro de MacFarland, correspondiente a 3x10⁸ bacterias/ml.
- A partir de esa suspensión del aislado en estudio, ajustada al tubo No 1 del nefelómetro de MacFarland, tome 100µL para realizar las diluciones seriadas de: 10⁻¹ hasta 10⁻⁴. Coloque los 100µL del aislado en el tubo Eppendorf rotulado como No. 1 (dilución 10⁻¹), que contiene previamente 0.9 ml de agua destilada estéril, agite vigorosamente en vórtex por un tiempo aproximado de 1 minuto y de este tubo vuelva a tomar otros 100µL

del aislado y colóquelos en el tubo No 2, para preparar la dilución 10^{-2} ; repita el paso anterior en cada tubo Eppendorf hasta completar la dilución 10^{-4} .

- Ordene las cajas de Petri con el medio que contienen los fármacos y siembre 100µl de cada aislado en estudio en suspensión diluida 1:100 (10^{-2}). Simultáneamente y como control de crecimiento, en placas con el mismo medio sin fármaco se siembran 100 µl del inóculo micobacteriano, en diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-4} a partir de la suspensión ajustada, se inoculan por duplicado las diluciones: 10^{-2} a la 10^{-4} .
- Una vez inoculado cada cuadrante con la suspensión bacteriana, se esperará por 1 hora para que el inóculo sea absorbido en el agar, para posteriormente guardarse en bolsas de plástico. Todas las placas se incubarán boca arriba en una incubadora a 37° C.
- Conserve el tubo original de la cepa en una gradilla a temperatura ambiente, hasta que se genere el reporte de la prueba de sensibilidad.
- Esterilizar el material ocupado y desecharlo conforme al manejo de RPBI.

Lectura y reporte de resultados

El desarrollo micobacteriano se revisará a las 24 y 48 horas, 7 y 28 días de incubación.

Si está contaminado se saca inmediatamente de la incubadora y se descarta, reportando inmediatamente. Una vez transcurridos los 28 días de incubación, saque de la incubadora (a 37° C) la charola con las cajas de Petri de las PDS a evaluar. Coloque y ordene las cajas de Petri por dilución desde 10^{-1} hasta 10^{-4} y posteriormente las cajas que contienen el fármaco antituberculosis.

En una cuenta colonias, contabilice las colonias para cada dilución y registre los resultados en la hoja de reporte de resultados. Estos resultados representan el 100% de crecimiento de las micobacterias cultivadas.

Posteriormente cuente el número de colonias (si las hay) en las cajas de Petri con medicamento, y anótelos en el formato de reporte de resultados. Estos resultados representan el porcentaje de mutantes presentes en la población micobacteriana cultivada y por ende, determinan el grado de resistencia a los fármacos evaluados.

Para el reporte de resultados se espera que al menos en una dilución se puedan contar entre 50 y 100 colonias.

Al mismo tiempo se contarán las UFC presentes en la placa con fármaco, las cuales corresponden a las mutantes resistentes. Se calcula la proporción porcentual de mutantes en la población total y si es igual o superior al 1 % el

aislado en estudio se considera como resistente a ese fármaco (Canetti y col, 1963).

Cálculo de resultados

La fórmula para determinar el porcentaje de resistencia es:

$$\% \text{ de resistencia} = \frac{\text{Número de colonias en la placa con fármaco}}{\text{Número de colonias en la placa control sin fármaco}} \times 100$$

Control de calidad

Medio sólido Agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) y caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), ambos medios serán preparados de acuerdo a los procedimientos estándares propuestos por Strong y Kubica 1985. Se utilizarán las siguientes cepas pansensible y resistentes caracterizadas, con diferentes patrones de resistencia a las diferentes drogas, como cepas de control interno de recuperación de cada lote de medio preparado, las cuales serán evaluadas en cada ronda de pruebas a realizar:

- *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) (susceptible a los fármacos de segunda línea).
- *M. tuberculosis* 3A (339) OMS/2014 (resistente a inyectables de segunda línea).
- *M. tuberculosis* 6 (5057) OMS/2014 (resistente a quinolonas de segunda línea).

Los resultados de las PDS de segunda línea pueden verse interferidos por:

- Aislados con mezclas de micobacterias y contaminados
- Aislados con más de 4 semanas de crecimiento
- Aislados desecados y acidificados
- Aislados con colonias escasas
- Físicos (inactivación de los medicamentos por calor, luz y tiempo de almacenaje)
- Calidad del medio 7H10 con y sin droga
- Variaciones en la temperatura de incubación

Interpretación de resultados:

Los resultados serán interpretados como lo describe la OMS (WHO/HTM/TB/2008.392). El número de colonias deberá ser registrado para cada prueba y los aislados serán clasificados como sensibles (S) o resistentes (R). La prueba también puede dar Contaminada o Invalidada en algunos casos.

El material utilizado en esta prueba se debe esterilizar en autoclave y manejar como RPBI.

Prueba Xpert MTB RIF

Prueba molecular automatizada para identificar Complejo *M. tuberculosis* (CMTB) y resistencia a rifampicina. Este sistema simplifica la prueba molecular ya que tiene una plataforma que integra y automatiza los tres procesos que son la preparación de muestra, amplificación y detección, conteniendo todos los reactivos requeridos en el interior de un cartucho plástico. Presenta un solo paso manual que es añadir el buffer bactericida al esputo, antes de transferirlo al cartucho. El tiempo de emisión del resultado es en aproximadamente 2 horas.

A diferencia de otras pruebas moleculares, puede hacerse a partir de una muestra de esputo con baciloscopia negativa. Se basa en un ensayo de PCR semi-anidado en tiempo real, que detecta simultáneamente al CMTB y la resistencia a rifampicina, mediante el empleo de tres iniciadores específicos y cinco sondas moleculares únicas que detectan en el gen *rpoB* la región de 81 pb, donde se ubican las mutaciones más comunes.

Indicaciones de uso

Para diagnóstico de TB pulmonar y resistencia a Rifampicina en adultos y niños.

- El Xpert MTB/RIF debe ser usado como prueba diagnóstica inicial, en lugar de las pruebas convencionales (baciloscopia, cultivo y PFS), en adultos y niños sospechosos de tener TB MFR o TB-VIH.
- El Xpert MTB/RIF puede ser usado como prueba adicional a la baciloscopia, en adultos con sospecha de tener TB, pero sin riesgo de tener TB MFR y TB-VIH, especialmente en muestras con baciloscopia negativa.
- El Xpert MTB/RIF puede ser usado como prueba diagnóstica inicial, en sustitución de la baciloscopia y cultivo convencional, en adultos y niños con sospecha de tener TB.

Estos dos últimos puntos, son recomendaciones condicionadas a la existencia suficiente de insumos, para no comprometer el uso del equipo, y éste sea empleado de preferencia en los probables farmacorresistentes y/o con VIH y TB.

Estas recomendaciones se aplican para muestras procesadas y sin procesar de esputo. La bibliografía refiere que para identificar CMTB tiene una sensibilidad de 90.4% (IC95%: 75-85.1%) y especificidad alta, 98.4% (IC 95%-98%). La cual es mayor cuando la muestra de esputo es baciloscopia positiva. Para la detección de resistencia a rifampicina ocurre lo mismo.

Para diagnóstico de TB extrapulmonar y resistencia a rifampicina en adultos y niños.

- El Xpert MTB/RIF debe ser usado como prueba diagnóstica inicial, en lugar de las pruebas convencionales (baciloscopía, cultivo y PFS), en muestras de LCR procedentes de pacientes con sospecha de meningitis.
- El Xpert MTB/RIF puede ser usado como prueba diagnóstica inicial, en sustitución de la baciloscopía, cultivo o histopatología, en muestras específicas (ganglio linfático y otros tejidos) procedentes de pacientes con sospecha de tener TB extrapulmonar.

El líquido pleural no es una buena muestra por su baja sensibilidad, se recomienda de preferencia procesar biopsia pleural. Estas recomendaciones no aplican para muestras de materia fecal, orina o sangre y no deben ser procesadas en el Xpert TB/RIF dada su poca utilidad.

En general, en las muestras extrapulmonares la sensibilidad y especificidad son más bajas que para las pulmonares. Esta prueba es de fácil realización y puede hacerse en un laboratorio con nivel de bioseguridad semejante al de la baciloscopía, lo que favorece su descentralización.

Consideraciones de la prueba

La prueba tiene una sensibilidad analítica para 5 copias de ADN purificado y 131 UFC/ml en el esputo. Esta sensibilidad hace posible su uso en muestras de esputo con baciloscopía negativa (-). No tiene reacción cruzada con micobacterias no tuberculosas (MNTB).

Con relación a la tecnología, la prueba Xpert MTB/RIF usa unas balizas moleculares para detectar resistencia a Rifampicina. Estas balizas son sondas de ácidos nucleicos que reconocen y reportan la presencia o ausencia de la secuencia normal del gen *rpoB* de tuberculosis tipo silvestre, sensible a Rifampicina. Se usan 5 diferentes balizas marcadas, cada una cubre una secuencia de ácidos nucleicos separada dentro del gen *rpoB* amplificado. Sólo cuando una baliza se une a una secuencia coincidente emite luz fluorescente (se detecta cuando la señal fluorescente aumenta por encima de un ciclo del umbral de referencia predeterminado), lo que indica la presencia de la secuencia del gen que es característico de la tuberculosis sensible a Rifampicina. Si una baliza no se une a la secuencia blanco o tiene un tiempo de retardo, significa que la muestra es potencialmente resistente a Rifampicina.

Los resultados de la prueba dependen del número de balizas positivas, del tiempo de su detección y de los resultados de los controles de proceso de muestras. Los resultados posibles son los siguientes:

- TB no detectada: negativo para TB. Reportar: N

- TB detectada, resistencia a Rifampicina no detectada: positivo para tuberculosis, sin resistencia a Rifampicina. Reportar: T
- TB detectada, resistencia a Rifampicina detectada: positivo para tuberculosis, con resistencia a Rifampicina. Reportar: RR
- TB detectada, resistencia a Rifampicina indeterminada: indeterminado. Examinar nueva muestra. Reportar TI
- Invalidado/ Error / Sin resultado: invalidado. Examinar nueva muestra. Reportar: I

Los términos invalidados, error e indeterminado hacen referencia a las siguientes definiciones:

- Invalidado: no se puede determinar la presencia o ausencia de MTB. El control de procesamiento de muestra (Specimen Probe Control, SPC por sus siglas en inglés) no cumple los criterios de aceptación, la muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido el PCR.
- Error: no se puede determinar la presencia o ausencia de MTB y puede deberse a tres causas: falla del cartucho, falla o problemas con el módulo o un mal procesamiento de la muestra por el operador.
- Sin resultado: puede deberse a datos insuficientes como, por ejemplo: detener la prueba cuando esta en proceso, ya sea deliberadamente o en forma accidental.

Procesamiento de muestras

Para el diagnóstico de TB pulmonar, la prueba puede usarse directamente desde una muestra de esputo fresca o desde un sedimento de esputo, el cual se obtiene después de descontaminar y concentrar el esputo. El volumen mínimo a procesar si es una muestra fresca es 1 ml y se agrega el doble de volumen del reactivo, 2 ml (es decir 1:2). Si se trata de sedimento, el volumen mínimo a procesar es de 0.5 mL y se agrega 1.5 mL del reactivo (1:3). En ambos casos el material se combina con el reactivo mezclando manualmente por 10 a 20 veces o en vortex por 10 segundos. Se incuba a Temperatura Ambiente (TA) por 10 minutos, se repite la agitación manual o por vortex y se incuba a TA por 5 minutos más. Luego de la incubación, se transfieren 2 ml de la muestra o sedimento procesado al cartucho, el cual se introduce a la plataforma para completar la prueba. Las muestras procedentes de niños pueden ser: jugo gástrico, lavado o aspirado.

Las muestras con partículas de comida no deben ser procesadas por este método.

Para el diagnóstico de TB extrapulmonar, las muestras de líquido cefalorraquídeo, nódulos linfáticos, biopsias de otros tejidos, etc. pueden requerir homogenización, concentración o descontaminación, previo a ser

procesadas por el Xpert MTB/RIF. Estos procedimientos se hacen de la forma habitual pero dentro de una cabina de seguridad biológica Clase II Tipo A2 y en un laboratorio de contención. El líquido pleural, como ya se mencionó, no es una buena muestra por su baja sensibilidad, en su lugar debe procesarse la biopsia pleural. Las muestras de materia fecal, orina o sangre no deben ser procesadas en el Xpert MTB/RIF dada su poca utilidad.

Consideraciones generales para el procesamiento de muestras

Todas las muestras deben ser procesadas tan rápido como se pueda. Etiquetar correctamente los cartuchos de Xpert MTB/RIF y los tubos de cultivo en caso de hacer uso de ellos. Los tejidos deben ser procesados dentro de una cabina de seguridad biológica Clase II Tipo A2 por los aerosoles que pueden producir al moler u homogenizar.

Las muestras de LCR son paucibacilares y pueden ser procesadas usando las mismas precauciones que para una muestra de esputo a excepción de cuando están concentradas por centrifugación. Uso de buenas prácticas de laboratorio para evitar contaminación de muestras y especialmente contaminación cruzada con otras muestras.

Cuando el volumen de una muestra es suficiente, el cultivo puede hacerse simultáneamente. Para aquellas muestras que requieran descontaminación se debe respetar estrictamente el tiempo de descontaminación y la concentración de los reactivos y procesarlas en un laboratorio de contención (Ej.: ganglio linfático, otro tejido-biopsia pleural, etc.) Es importante para este tipo de muestras no transferir grumos de tejido, deben estar correctamente homogenizados.

Para ello, usar un mortero estéril, cortar la muestra en pequeñas porciones, agregar 2 ml de solución buffer de fosfato y moler y triturar el tejido hasta homogenizarlo completamente. Transferir la suspensión a un tubo cónico con tapa de rosca y darle el tratamiento habitual para descontaminar (método de Petroff), antes de procesarla y transferirla al cartucho del Xpert MTB/RIF.

Si el tejido-biopsia pleural, etc. está estéril, después de homogeneizar la muestra en el mortero, transferir 0.7 ml a un tubo cónico con tapa de rosca y procesarla para vaciarla al cartucho del Xpert MTB/RIF. Para ampliar esta información revisar el Anexo 2 del Manual de implementación del Xpert MTB/RIF (Xpert MTB/RIF Implementation manual. Technical and operational “how-to” practical considerations, World Health Organization, 2014).

Manejo de desechos

Se lleva a cabo siguiendo las normas vigentes en el país para el desecho de residuos peligrosos biológico infecciosas (RPBI) establecido en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y NOM-052-SEMARNAT-2005.

Prueba Xpert MTB RIF Ultra

Este test utiliza la tecnología Xpert, pero con mayor sensibilidad para detectar TB en muestras con BK negativa (ej. en pacientes con TB/VIH, con TB extrapulmonar y en pacientes pediátricos) que el actualmente recomendado. El Xpert MTB/RIF tiene un límite de detección de 131 ufc/mL. Se espera llegar a una sensibilidad mayor al 90%, con una especificidad de 100% en pacientes BK negativos con cultivos positivos.

La prueba molecular de nueva generación Xpert MTB/RIF Ultra ha mejorado la sensibilidad en la detección de especie en comparación con la versión anterior, sobre todo cuando se realizan pruebas provenientes de baciloscopías negativas o muestras de esputo de pacientes con tuberculosis asociada a VIH. Además, ha mejorado las limitaciones referentes a la detección de resistencia a rifampicina.

La nueva versión, incorpora dos diferentes secuencias de inserción multicopia (*IS6101* e *IS1081*) y una cámara de reacción de PCR con mayor capacidad (50 µL en la versión Ultra a diferencia de los 25 µL de Xpert MTB/RIF). En Ultra la PCR ahora es completamente anidada, con ciclos térmicos más rápidos, reactivos y enzimas mejoradas, lo cual reduce el límite de detección de 131 unidades formadoras de colonias por mL (UFC) a 16 (11.8) UFC por mL, un nivel que es similar o mejor que el del cultivo líquido. La detección de resistencia a rifampicina se ha mejorado, utilizando un análisis basado en temperaturas de fusión en lugar de la PCR cuantitativa.

Ultra, también incorpora una nueva categoría semicuantitativa “trace” a las utilizadas en la versión anterior (high, medium, low y very low), que corresponde a la carga bacilar más baja para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*. El tiempo de detección se redujo de 110 minutos a 65 minutos en pruebas negativas y 77 minutos en pruebas positivas.

Ensayos de Hibridación con Sondas en Línea (LPA)

Los ensayos de hibridación con sondas en línea o LPA (“Line Probe Assays”) son pruebas moleculares que utilizan tiras de nitrocelulosa (tecnología “DNA Strip”) que contienen regiones moleculares parciales o sondas de los genes en estudio. Para esta tecnología es necesario realizar los siguientes pasos: el aislamiento y amplificación del ADN, la detección de los productos de la amplificación por hibridación reversa y por último el revelado de la tira mediante una reacción de color usando estreptavidina-conjugada con fosfatasa alcalina. Al final de la prueba se realiza la evaluación de las tiras para determinar la identificación de especie y la detección, si los hay, de los genes que confieren

resistencia. El ensayo puede ser realizado en un día de trabajo. Entre los métodos comerciales más usados a nivel mundial está el Genotype® MDRTBplus v2.0 y Genotype® MTBDRs/ v2.0.

Genotype® MDRTBplus v2.0

Esta prueba utiliza tiras reactivas que contienen regiones moleculares parciales de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* fijadas sobre ellas, detectando así mutaciones de resistencia a la rifampicina (*rpoB*) y las principales mutaciones presentes en la resistencia a isoniacida (*katG* e *inhA*).

Realizada a partir de muestra directa de esputo tiene una sensibilidad de 95,7% para rifampicina, 95,8% para isoniacida y 95,3% para TB-MDR. La misma prueba molecular a partir de cultivos tiene una sensibilidad de 100% para detectar resistencia a rifampicina, 97,5% para isoniacida y 96,9% para TB-MDR.

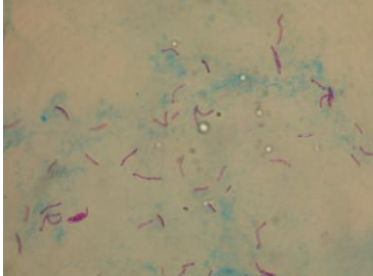
En conclusión, Genotype®MTBDRplus es una herramienta muy útil para la detección rápida de la resistencia a INH y RIF simultáneamente (MDR) en un máximo de 72 h a partir de esputo o de cultivo. Además, se pueden procesar entre 12 a 48 muestras simultáneamente

Genotype®MDRTB *sl* (v2.0)

Este ensayo para medicamentos de 2ª línea ha incorporado sondas para detectar mutaciones de los genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y el promotor *eis*, que están asociados a la clase de las fluoroquinolonas y las drogas inyectables de 2ª línea. La presencia de mutaciones en estas regiones, no necesariamente implica resistencia a todas las drogas dentro de esa clase. Aunque las mutaciones específicas dentro de estas regiones pueden estar asociadas con diferentes niveles de resistencia (ej. diferentes concentraciones mínimas inhibitorias) a cada droga dentro de esas clases, el alcance de la resistencia cruzada no está completamente aclarada. Se requieren más datos para entender mejor la correlación de la presencia de ciertas mutaciones que confieren resistencia a las fluoroquinolonas, con la resistencia presente en las pruebas de sensibilidad fenotípicas y con el resultado en los pacientes.

El ensayo puede ser realizado directamente de una muestra de esputo procesada (descontaminada y concentrada por centrifugación) con resultado de baciloscopía negativo, o indirectamente, usando el DNA aislado de un cultivo de *M. tuberculosis*. Sin embargo, existen algunas limitaciones para implementar los métodos moleculares en un laboratorio. Una de ellas es que requiere de equipamiento especial, personal entrenado para la ejecución de la prueba y una infraestructura adecuada para evitar la contaminación cruzada. Otra limitación es que se necesita una inversión alta para establecer este tipo de pruebas en un laboratorio, por lo que deben realizarse previamente estudios de costo-beneficio que justifiquen su implementación.

ANEXO III. IMÁGENES

Imagen	Fuente
 <p data-bbox="203 806 365 835">Imagen AIII.1.</p>	Baciloscopia de <i>M. tuberculosis</i> por tinción de Ziehl-Neelsen. LMIC 2016.

80

1939-2019
ISET-InDRE

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"