

idime

Instituto de Diagnóstico Médico S.A.

IDIME

Guía: Guía de Manejo Tuberculosis y Lepra

Copia no controlada



IDIME
Proceso: Apoyo Diagnóstico
Subproceso: Laboratorio Clínico y Toma de Muestras
Guía: Guía de Manejo Tuberculosis y Lepra

Código	ID-ADLAB-GU-31
Fecha	2019-11-28
Versión	1.0

Estratégico Misional Apoyo Operacional Evaluación Gerencial Asistencial Apoyo Atención

Objetivo

Establecer de manera institucional una Guía específica en donde se documenten todos los procedimientos asociados al diagnóstico y manejo de la Tuberculosis y Lepra, basados en las distintas guías vigentes y alineados con los lineamientos vigentes establecidos por el Instituto Nacional de Salud, el Ministerio de Salud y los demás organismos de control nacionales e internacionales como la OMS y la OPS, entre otros

Desarrollo

ALCANCE

Aplica a todas las sedes de IDIME que realicen el manejo de muestra de Tuberculosis y Lepra.

DESARROLLO

TUBERCULOSIS

Fundamento:

Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo causante de la tuberculosis. Aproximadamente 8 millones de ellos enferman anualmente y cerca de dos millones mueren por la enfermedad, aun cuando se cuenta con técnicas de diagnóstico sencillas y precisas y tratamientos eficaces.

La transmisión de los bacilos de la tuberculosis se produce casi exclusivamente por medio de núcleos suspendidos en pequeñas gotas que son expulsadas con la expectoración de las personas afectadas por tuberculosis pulmonar. Estas pequeñas gotas pueden permanecer infectantes en el aire durante bastante tiempo y pueden ser inhaladas por otras personas. La infección de los contactos es más probable cuando conviven o permanecen durante un tiempo prolongado cerca del enfermo que está expectorando bacilos y en un ambiente poco ventilado.

Esta enfermedad crónica es de carácter contagioso, hace parte de las micobacteriosis y presenta diversas manifestaciones clínicas, principalmente pulmonares; debido a su dependencia de diversas variables se desarrolla solo en el 5% de la población que se infecta.

Su principal agente causal como ya se mencionó son los bacilos del llamado Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y que esta compuesto principalmente por las especies:

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium africanum*
- *Mycobacterium canettii*
- *Mycobacterium orygis*

La denominación "complex" o complejo se ha utilizado no solo para la clasificación del agente causal de la enfermedad sino para el desarrollo de las técnicas de diagnóstico, identificación y susceptibilidad a fármacos.

Los síntomas más característicos de la tuberculosis pulmonar son la tos y la expectoración persistentes por más de 2 semanas. A las personas con estos síntomas se los llama Sintomáticos Respiratorios. Otras manifestaciones pueden ser pérdida de peso, fiebre, sudores nocturnos, cansancio físico y dolores de tórax. El diagnóstico de certeza de tuberculosis puede hacerse en forma confiable en el laboratorio demostrando la presencia de bacilos en una muestra por medio de la baciloscopia (examen microscópico) o el cultivo. Para que la baciloscopia sea positiva es preciso

que la muestra tenga como mínimo, entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra. Este alto contenido de bacilos se encuentra en los pacientes con tuberculosis pulmonar, especialmente en aquellos con enfermedad avanzada y con lesiones cavitadas. Estos pacientes son los que transmiten los bacilos manteniendo la enfermedad en la comunidad.

En 1993, la OMS declaró la tuberculosis como un tema de urgencia mundial debido a la falta de atención de los gobiernos a esta enfermedad, a programas de control de poca eficiencia, falta de planeación y prevención, entre otros, llevando a que para el año de 1995 se habían presentado más de nueve millones de nuevos casos con más de tres millones de muertes, entrando a hacer parte de las tres enfermedades causadas por un único agente infeccioso con mayor mortalidad (grupo del cual hacen parte la malaria y el VIH)

Aunque el número de casos se ha ido reduciendo en un ritmo de un 2% anual aproximadamente en el nuevo milenio, la meta propuesta para el año 2020 pretendía alcanzar un porcentaje de reducción del 5%, con el fin de acabar con la epidemia para el año 2030

Con los datos actuales a nivel mundial, esta meta parece inalcanzable. La TBC es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo y al 2017, 10 millones de nuevos casos se presentaron, terminando con la vida de al menos 1.6 millones de personas, entre ellos 300.000 con VIH.

Como ya se mencionó se estima que un cuarto de la población mundial se encuentra o encontrará infectada con el bacilo, sin embargo solo el 5% de esta, desarrolla la enfermedad, dependiendo de diversas variables inmunológicas, sociales, económicas, entre otras y es por esto que aunque la infección es causada por un único agente, el desarrollo de la enfermedad es considerado multi causal

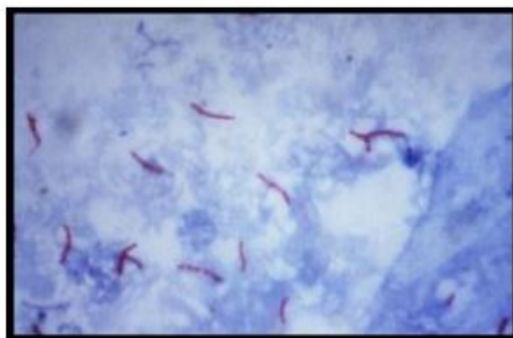
Actualmente se conocen algunas de estas variables que inciden grandemente en el desarrollo de la enfermedad:

- Condiciones socio económicas que llevan a un estado de deterioro del estado general de la salud del individuo como la pobreza o el hacinamiento (incluyendo privación de libertad)
- Desnutrición
- Estados de inmunosupresión, principalmente VIH
- Algunos vicios como tabaquismo

Y es por esto que un número significativo de nuevos casos se presenta en países en vía de desarrollo

BACILOGRAFÍA

La baciloscopia es la técnica de elección para el diagnóstico rápido y el control del tratamiento de la tuberculosis pulmonar del adulto. Es simple, económica y eficiente para detectar los casos infecciosos. Por eso es la herramienta fundamental de un programa de control de la tuberculosis. Esta técnica tiene una sensibilidad del 40 al 80%.



Para que una Baciloscopia sea positiva, la muestra debe contener entre 5000 y 10000 bacilos por mililitro de muestra.

Una baciloscopia puede detectar desde un 40% hasta un 80% de los casos, una segunda muestra agrega un 15% y una tercera muestra hasta un 5% adicional, sin embargo debido a otras variables como la calidad de la muestra y los momentos de la toma de estas, estos porcentajes pueden disminuir.

Por esta razón los distintos planes nacionales de control de TBC recomiendan la realización de las tres baciloscopias

Espuito

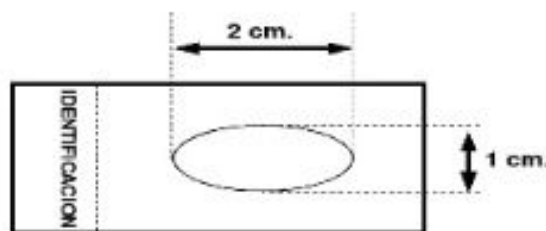
La muestra debe llegar en un recipiente de boca ancha, para que el paciente pueda expectorar fácilmente, de cierre hermético, capacidad de 30 a 50 ml, de plástico, transparente, desechable, fácil de rotular.

Se deben tomar tres muestras seriadas provenientes de bronquios, recolectado preferiblemente la muestra al momento de despertarse, lo cual aumenta la positividad del diagnóstico. En caso de que el paciente no pueda asistir los tres días consecutivos se debe recolectar la primera muestra en el momento de la consulta, la segunda al despertar del día siguiente y la tercera cuando lleve la segunda. A las personas que viven en áreas de difícil acceso, se les debe recoger las tres muestras de esputo el mismo día, tratando que hayan intervalos de tiempo de por lo menos treinta minutos. Es importante explicar al paciente la importancia de recolectar esputo y no saliva.

Conservación: Si la muestra de esputo no se procesa inmediatamente se puede conservar a 4°C hasta por 72 horas. Conserve las muestras protegidas de la luz directa. Una muestra que no cumpla con las condiciones de conservación debe ser rechazada.

Elaboración de la lámina:

1. Utilizar todos los elementos de bioseguridad: gorro, guantes, tapabocas con filtro N95, gafas y bata.
2. Procesar la muestra en cámara de Bioseguridad. En caso de no contar con cámara de bioseguridad, procesar las muestras frente a un mechero de bunsen.
3. Utilizar láminas nuevas, sin marcas y de empujadas.
4. Realizar con lápiz punta de diamante la identificación de la lámina, diligenciando número interno de registro del paciente, tipo de muestra y calidad de la misma en caso de ser esputo.
5. Partir un bajalenguas o escobillón y con la parte astillada tomar la partícula útil. Es decir, la parte más purulenta o con sangre.
6. Extender la muestra uniformemente sin tocar el borde de la lámina, realizando un extendido en forma ovalada con dimensiones de 2 cm x 1 cm.



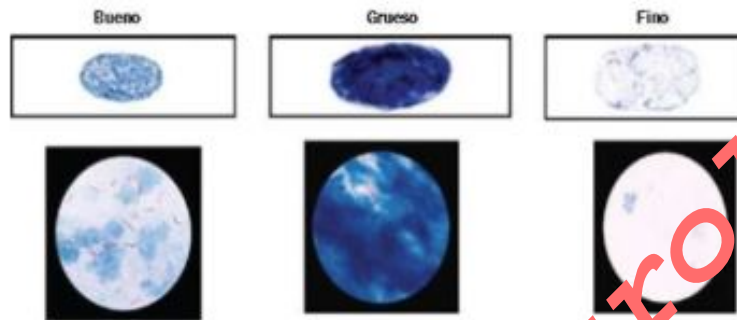
7. No trabajar con más de 12 muestras en cada serie, mantener el orden de las láminas y envases según su numeración de izquierda a derecha y procesar las muestras individualmente. No procesar el siguiente envase antes de cerrar el anterior.

8. Luego de realizadas las láminas, dejar secar a temperatura ambiente.

9. Fijar con calor y colorear los extendidos por medio de la Coloración de Zielh Neelsen. Los tiempos de coloración deben ser los siguientes:

- Cubrir las láminas completamente con fucsina fenicada durante 5 minutos, calentando 3 veces hasta la emisión de vapores, sin hervir.
- Lavar con agua.

- Decolorar con alcohol ácido por 3 minutos o hasta lograr decoloración completa de la lámina.
- Lavar con agua.
- Realizar la coloración de contraste con azul de metileno durante un minuto y lavar con agua.
- Dejar secar la lámina a temperatura ambiente. No olvidar que los colorantes deben ser filtrados diariamente.



10. Se deben realizar dos láminas por muestra, una de estas será coloreada inmediatamente se realicen los extendidos para su respectiva lectura y la otra será guardada como contra muestra, en caso de presentarse alguna eventualidad. Esta lámina de contra muestra será almacenada en un contenedor con tapa luego de ser fijada con calor y sin colorear; en un término de 24 horas después de la realización del extendido, las láminas de contra muestra deben ser descartadas.

11. Para la lectura de las láminas, se debe tener en cuenta la siguiente tabla:

Promedio de BAAR encontrados	Número mínimo de campos útiles a examinar
Ningún BAAR	100
Menos de 1 BAAR por campo	100
Hasta 10 BAAR por campo	50
Más de 10 BAAR por campo	20
De 1 a 9 BAAR en todo el extendido	100

12. Luego de realizada la lectura, se debe informar el resultado de la siguiente manera:

- No se observan Bacilos ácido alcohol resistentes en 100 campos observados ni en 10 minutos de observación.
- Si se observan de 1 a 9 Bacilos ácido alcohol resistentes en 100 campos observados: Informar el número exacto de Bacilos en 100 campos observados.
- Si se observan entre 10 y 99 Bacilos ácido alcohol resistentes en 100 campos observados: Informar Positivo +.
- Si se observa de 1 a 10 Bacilos ácido alcohol resistentes por campo en 50 campos observados: Informar Positivo ++.
- Si se observan más de 10 bacilos ácido alcohol resistentes por campo en 20 campos observados: Informar Positivo +++.

13. Luego de realizada la lectura, limpiar la lente del microscopio con alcohol al 70%

14. Para el almacenamiento de las láminas ya coloreadas, luego de la lectura se debe realizar los siguientes pasos

- Retirar el exceso de aceite de inmersión
- Sumergir las láminas en alcohol al 70% durante 30 segundos
- Secar el exceso de alcohol sin retirar la muestra
- Almacenar por fecha de manera organizada las láminas correspondientes al mes en curso y al mes inmediatamente anterior (tener en cuenta también las solicitudes para evaluación del desempeño indirecto de los distintos laboratorios de salud pública)

15. Recordar que todas las muestras de láminas positivas debes ser sembradas.

16. En el sistema se debe siempre reportar el tipo de muestra, y en caso de ser esputo, la cantidad de la misma (Saliva, Moco, Mucopurulenta, Hemoptoica) junto con el resultado de la baciloscopia.

Control de Calidad de la coloración:

Para la realización de los controles de calidad de la coloración, se deben utilizar muestras positivas y negativas inactivadas con 10 gotas de hipoclorito al 2,5% durante por lo menos media hora, para preparar con ellas extendidos que puedan ser utilizados hasta por dos meses. Colocar el control positivo y negativo en la misma lámina. El control de calidad se debe realizar diariamente y se debe controlar así mismo cada vez que se utilice un nuevo lote de colorantes. Registrar en el formato correspondiente el resultado del control.

Por otro lado, con el fin de llevar control de todos los pacientes, las baciloscopias y cultivos realizados, se llevará en cada sede el libro de registro de baciloscopias y cultivos socializado por el instituto nacional de salud o cada laboratorio de salud pública.

Adicionalmente de manera semanal, toda sede donde se realice lectura de baciloscopias deben diligenciar el formato "Registro de Baciloscopias Positivas" en el cual deben anotar todos los datos de las baciloscopias que resulten positivas y este archivo se deben enviar semanalmente a la persona referente a nivel nacional de vigilancia epidemiológica y a la coordinación de microbiología. Recordar que toda baciloscopia positiva es considerada valor crítico y debe ser reportada como tal.

CULTIVO DE MYCOBACTERIAS

Un cultivo puede detectar un mínimo de entre 10-100 bacilos ácido alcohol resistentes por microlitro de muestra, un valor bastante inferior al detectado por una baciloscopia de aquí su gran valor diagnóstico, permitiendo detectar hasta un 30% de los casos que la baciloscopia no logra detectar

Ahora bien su valor no solo esta relegado al diagnostico, ya que aunque es lento, ofrece una cantidad de valores agregados, que no ofrecen otras técnicas y métodos.

Según la Guía de Vigilancia por Laboratorio de Tuberculosis, si la sede de procesamiento cuenta con la infraestructura y equipos necesarios para la siembra en medio Lowenstein Jensen, esta se debe realizar, debido a su mayor porcentaje de recuperación. El proceso en medio L-J se menciona mas adelante.

Espuito

De acuerdo a recomendaciones del LDSP en adherencia al programa de TB y teniendo en cuenta los nuevos lineamientos, se puede sembrar la primera muestra de esputo que llegue del paciente, siempre y cuando le haya sido ordenada baciloscopia seriada y cultivo. Esto con el fin de aumentar la posibilidad de recuperación de pacientes positivos que no cumplan con la entrega de las tres muestras, sin embargo si el paciente entrega las tres muestras, se debe continuar con el lineamiento de sembrar la muestra No 2

1. Para la realización del cultivo, se deben marcar dos tubos de medio de cultivo Ogawa Kudoh con el número interno de registro del paciente (Sticker del sistema).

2. Impregnar con la muestra el algodón de un escobillon estéril y colocarlo en un tubo con 3 ml de NaOH al 4% y dejar en reposo máximo 2 minutos. (Método del escobillón de kudoh). Es importante no exceder el tiempo, ya que puede llegar a matar las micobacterias presentes en la muestra, pero tampoco minimizar este tiempo, con el fin de que el cultivo no se contamine.
3. Sacar el escobillón del tubo y sin escurrir, sembrar por rotación en los dos tubos de Ogawa kudoh.
4. Al terminar el procedimiento, tanto de la realización de la lámina como del cultivo, descartar el bajalenguas y el escobillón utilizados en un recipiente plástico de paredes resistentes (guardián), el cual será finalmente incinerado. Ver Instructivo de montaje y lavado.
5. Finalmente se debe proceder a realizar la limpieza y desinfección del área utilizada, incluyendo la cámara de bioseguridad, siguiendo el Instructivo de limpieza y desinfección de equipos.
6. Los medios de cultivo ya sembrados se deben incubar a 37°C en posición horizontal con un mínimo de inclinación de 30° con las tapas sin ajustar.
7. Realizar lectura de los cultivos a la primera semana, a las cuatro semanas y a las 9 semanas de incubación.
8. En caso de crecimiento en el medio de cultivo, se debe realizar una lámina para coloración de Ziehl Neelsen para verificar el crecimiento de bacilos ácido alcohol resistentes.

Lavado broncoalveolar

1. Agregue a una alícuota de la muestra igual cantidad de fosfato trisódico al 10%.
2. Agite vigorosamente.
3. Deje en reposo por 2 horas a temperatura ambiente.
4. Centrifugue a 3500 g por 30 minutos en centrífuga refrigerada.
5. Descarte el sobrenadante.
6. Decontamine el sedimento por el método del escobillón de kudoh.
7. Siga el mismo procedimiento realizado para el cultivo de esputo o siga el procedimiento de siembra en medios L-J.

Aspirado gastrico:

1. Para tomar la muestra debe pasarse la sonda nasogástrica la noche anterior a la toma de la muestra.
2. Antes de despertar al paciente, aspire con jeringa el contenido gástrico.
3. Depositar lo aspirado en un recipiente estéril
4. Si no se obtiene muestra del aspirado inyectar agua estéril o solución salina estéril y aspirar nuevamente.
5. Depositar nuevamente lo aspirado en un tubo



6. Neutralizar la muestra agregando 1 mg de bicarbonato de sodio o 1 ml de Fosfato Trisódico por cada ml de muestra del aspirado.
7. Centrifugar a más de 3500 g por 30 minutos en centrífuga refrigerada.
8. Descartar el sobrenadante y sembrar en medios Lowenstein Jensen, siguiendo el método de decontaminación de Petroff mencionado mas adelante
9. Sembrar por duplicado.
10. Hacer dos extendidos del sedimento para baciloscopia.

Líquidos Esteriles: LCR, Pleural, Sinovial, Amniótico, Pericárdico y Ascítico:

El líquido debe llegar idealmente en cantidad no menor a 10 ml.

1. Dividir la muestra en dos alícuotas.
2. Guardar una alícuota en la nevera a 4°C y procesar la otra.
3. Centrifugar a 3500 g en centrífuga refrigerada por 30 minutos.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Hacer dos extendidos del sedimento para baciloscopia.
6. Siembre con pipeta estéril 0.2 ml del sedimento en medios Lowenstein Jensen, siguiendo el método de decontaminación de Petroff mencionado mas adelante
7. Esparza el inoculo sobre todo el plano inclinado del medio.

Orinas:

Debe llegar idealmente en cantidad no menor a 30 ml, y deberá corresponder al volumen total de la primera micción de la mañana y debe ser recolectada en frascos de volumen superior (300 - 500 ml)

1. Mezclar bien la totalidad de la muestra y alicuotar en un tubo de 50 ml.
2. Centrifugar a 3500 g en centrífuga refrigerada por 30 minutos.
3. Descartar el sobrenadante
5. Si la muestra se debe conservar, se debe agregar 1 ml de fosfato trisódico al sedimento
6. Descontaminar el sedimento en NaOH al 4 % (1N) y sembrar en dos tubos de medios Lowenstein Jensen, siguiendo el método de decontaminación de Petroff mencionado más adelante
7. Incubar a 37° C, mínimo de inclinación y tapas sin ajustar

Biopsia tejidos contaminados:

1. Macerar en un mortero estéril con solución salina o el agua destilada con la que viene la biopsia.



2. Transvasar a un tubo estéril.
3. Agregar igual cantidad de FTS al 10% y dejar actuar por 2 horas a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 3.500 g 30 minutos en centrifuga refrigerada.
5. Descartar el sobrenadante dejando 2 ml de sedimento y homogenizar.
6. Impregnar un escobillón con el sedimento e introducirlo en un tubo que contenga 3 ml de NaOH al 4% máximo por dos minutos.
7. Sacar sin escurrir y sembrar en dos tubos de medios Lowenstein Jensen, siguiendo el método de decontaminación de Petroff mencionado mas adelante
8. Hacer baciloscopia con el sedimento sobrante.
9. Incubar a 37°C en posición horizontal con un mínimo de inclinación y las tapas sin ajustar. Si la biopsia es de piel, y se sospecha la presencia de micobacterias no tuberculosas, siembre 4 tubos e incube dos tubos a 37° C y dos a 28° - 32°C.

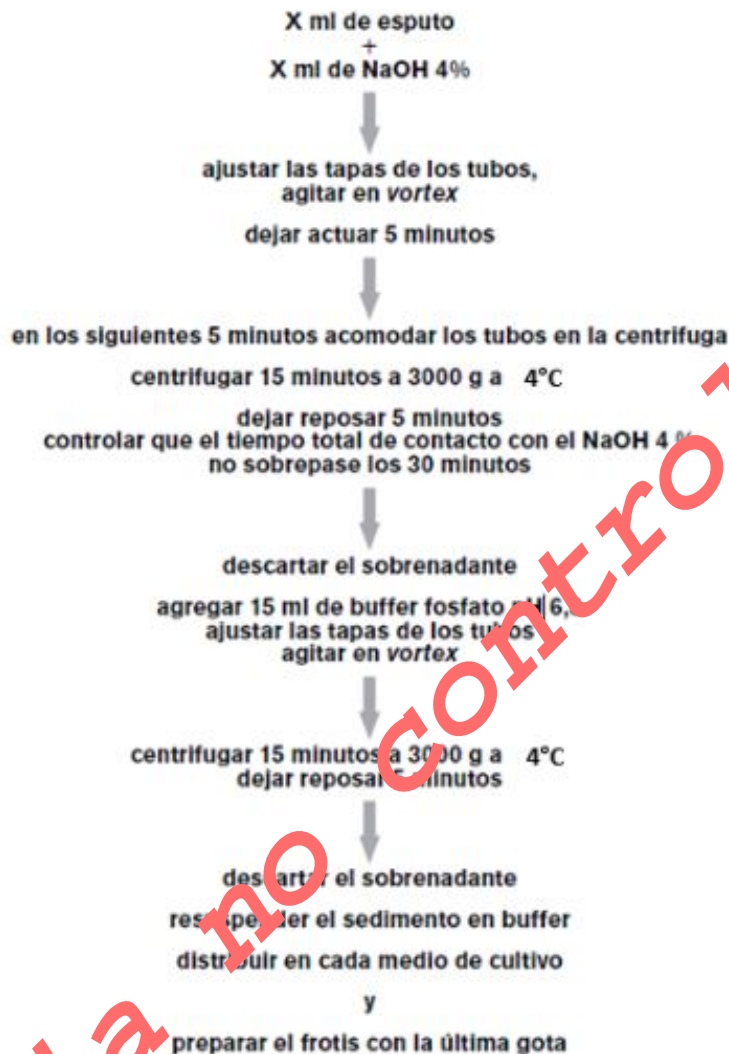
Biopsia tejidos esteriles:

1. Macerar en un mortero estéril con solución salina o el agua destilada con la que viene la biopsia.
2. Transvasar a un tubo estéril y centrifugar a 3.500 g por 30 minutos en centrifuga refrigerada.
3. Descartar el sobrenadante dejando 2 ml de sedimento y homogenizar.
4. Procesar de la misma forma que con los líquidos estériles.

Secreciones:

1. Realice de la muestra directa las láminas de baciloscopia.
2. Coloque un escobillón impregnado con la muestra en un tubo que contenga 3 ml de NaOH al 4% por dos minutos.

Para realizar siembra en agar Lowenstein Jensen, es necesario realizar la decontaminación de la muestra de acuerdo al método modificado de Petroff:

MÉTODO DE PETROFF MODIFICADO

- Abrir el primer envase conteniendo una muestra de esputo. Trasvasar todo su contenido en el tubo de centrifuga que le corresponde, con un movimiento muy suave y seguro, o transferirlo con una pipeta.
- Tapar el envase y proceder de la misma manera con las siguientes muestras, de a una. No abrir un envase sin haber cerrado antes los anteriores
- Tomar la primera muestra transferida sin agregado de decontaminante, verificar su volumen, abrir el tubo, agregar NaOH 4% hasta duplicar el volumen del esputo guiándose por la graduación exterior del tubo. Cerrar el tubo. Proceder del mismo modo con el resto de las muestras de esputo, con los sedimentos de muestras previamente centrifugadas y macerados de tejidos que requieran decontaminación
- Verificar que todos los tubos estén cerrados herméticamente
- Agitar el primer tubo en vortex vigorosamente, y luego colocarlo en una gradilla vacía auxiliar
- Proceder de igual forma con las siguientes muestras, manteniendo el orden de los tubos en la nueva gradilla. Dejar actuar el decontaminante 5 minutos
- Ubicar cada tubo dentro de un portatubos del rotor y balancear con un tubo con igual volumen en la posición opuesta. Si no se encuentra dos tubos con igual volumen, ubicar en frente un tubo con el volumen necesario de agua destilada o etanol 70°
- Centrifugar 15 minutos a 3000 g a 4°C
- Dejar reposar los tubos 5 minutos luego de detenida la centrifuga
- Abrir la tapa de la centrifuga. En caso de sospechar o comprobar algún derrame dentro del contenedor de tubos, autoclavarlo. De lo contrario, retirarlo muy cuidadosamente, tratando de no resuspender el sedimento, trasladarlo tapado, junto con la gradilla auxiliar a la cabina, y allí destaparlos. Retirar los

tubos y ubicarlos en orden según su número en la gradilla auxiliar, con cuidado de no resuspender el sedimento

- Comprobar que los procedimientos hayan sido realizados con agilidad suficiente como para que el tiempo total de contacto con el decontaminante no exceda los 30 minutos
- Abrir de a uno cada tubo, descartar suavemente el sobrenadante dentro del recipiente destinado a este fin, sin salpicar ni mojar la parte exterior del tubo. Limpiar el exterior del tubo con un pañuelo de papel o algodón embebido en desinfectante a base de amonio cuaternario si, eventualmente, se moja la pared. Descartar el pañuelo o algodón dentro de la bolsa destinada a descartar tubos. Dispensar buffer fosfato hasta completar los 15 ml con un frasco dispensador o con una pipeta, sin tocar la boca ni pared del tubo. Cerrar el tubo
- Proceder de igual forma con todos los tubos centrifugados. No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado previamente el anterior
- Comprobar el cierre hermético de las tapas de todos los tubos manipulados
- Agitar vigorosamente en vortex cada tubo y ubicarlos en el contenedor de la centrifuga. Cerrar la tapa de bioseguridad de este contenedor
- Centrifugar 15 minutos a 3000 g a 4°C
- Esperar que se detenga completamente la centrifuga. Dejar reposar los tubos 5 minutos dentro
- Abrir la tapa de la centrifuga. En caso de sospechar o comprobar algún derrame dentro del contenedor portatubos, autoclararlo. De lo contrario retirarlo muy cuidadosamente tratando de no resuspender el sedimento
- Abrir de a uno cada tubo, descartar suavemente el sobrenadante dentro de recipiente destinado a este fin, sin salpicar ni tocar bocas o paredes de tubos o frascos. Dispensar buffer fosfato hasta completar el volumen suficiente para sembrar todos los tubos con medios que se empleen.
- Proceder de igual forma con cada tubo centrifugado. No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado previamente el anterior.
- Resuspender mediante agitación manual el sedimento de cada tubo, reintegrarlo a la gradilla que contiene los tubos con medios de cultivo, en la posición que le corresponde.

Reporte del cultivo:

- **Negativo a las 8 semanas de incubación:** Sin desarrollo de bacilos ácido alcohol resistentes
- **Contaminado:** Si se observa crecimiento de microorganismos diferentes a bacilos ácido alcohol resistentes

En caso de confirmar por coloración de Zielh Neelsen que el crecimiento obtenido es de bacilos ácido alcohol resistentes, en el resultado **final** reportar de la siguiente manera:

- **Cultivo Positivo Entero y 19 colonias para bacilos ácido alcohol resistentes:** Reportar el número exacto de colonias observadas y el tiempo de incubación al que se realiza la lectura.
- **Cultivo Positivo (+) para bacilos ácido alcohol resistentes:** Si se observan de 20 a 100 colonias. Informar el tiempo de incubación al que se realiza la lectura.
- **Cultivo Positivo (++) para bacilos ácido alcohol resistentes:** Si se observan más de 100 colonias separadas. Informar el tiempo de incubación al que se realiza la lectura.
- **Cultivo Positivo (+++) para bacilos ácido alcohol resistentes:** Si se observan colonias incontables. Informar el tiempo de incubación al que se realiza la lectura.

Ejemplo: Cultivo positivo (+) para bacilos ácido alcohol resistentes a las 8 semanas de incubación.

Posteriormente se deben realizar las pruebas de identificación y susceptibilidad para confirmar la presencia de Complejo Mycobacterium tuberculosis, solicitando a la sede o entidad respectiva las ordenes para la realización de estos

Aquellos especímenes que tengan solo una alícuota o porción y deban ser procesadas por otras secciones distintas a microbiología como: patología, química, biología molecular, entre otras. Deberán ser registradas Formato Control de muestras inter secciones ID-ADLAB-F12 para garantizar que se cumplan todos los procesos de cada muestra.

Diligenciamiento del libro de registro diario de baciloscopias y cultivo de micobacterias:

De acuerdo a las directrices dadas por el Instituto Nacional de Salud, todas las sedes deben diligenciar el libro de registro diario de baciloscopias y cultivo. En este libro se deben registrar todos los pacientes sintomáticos respiratorios que sean atendidos y diligenciar los campos que indican

resultados de baciloscopias y cultivo. No se deben allí incluir pacientes que por solicitud de visa, requisito de trabajo o estudio les soliciten el examen.

Para las sedes Lago de Bogotá y Rafael Uribe de Cali, en el libro se debe registrar igualmente la realización de las pruebas por GenXpert y otras pruebas moleculares junto con el resultado obtenido. El libro debe ser enviado mensualmente vía correo electrónico al laboratorio de salud pública, secretaría de salud de Bogotá e Instituto Nacional de Salud, quienes verifican la información contenida en el libro. Adicionalmente para Bogotá, cada trimestre se debe realizar ingreso de los indicadores del programa de tuberculosis a la página Silasp, los cuales aparecen automáticamente en las pestañas de cada uno de los trimestres del año.

En las sedes en las cuales se evidencie que existe solicitud por parte del personal médico de baciloscopias de una sola muestra a pacientes sintomáticos respiratorios, es necesario enviar por correo la notificación a la secretaría de salud municipal y departamental, con el fin de que se intervengan en la IPS que se requiera, para que los médicos cumplan con el requisito de ordenar siempre baciloscopias seriadas y cultivo a los pacientes sintomáticos respiratorios.

Adicionalmente de manera semanal, toda sede donde se realice procesamiento y lectura de cultivos de mycobacterias se debe diligenciar el formato "Registro de Cultivos Positivos" en el cual deben anotar todos los datos de los cultivos que resulten positivos y este archivo se deben enviar semanalmente a la persona referente a nivel nacional de vigilancia epidemiológica y a la coordinación de microbiología. Recordar que todo cultivo positivo es considerado valor crítico y debe ser reportado como tal.

CULTIVO PARA MICOBACTERIAS CON ENFOQUE EN ATÍPICAS NO TUBERCULOSAS

Fundamento:

Las micobacterias atípicas son un grupo de micobacterias cuya incidencia ha aumentado durante los últimos años. Desde el punto de vista dermatológico, existen varias especies que es necesario conocer para así poder atajar con prontitud procesos que pueden llegar a ser potencialmente mortales. Por lo tanto, el diagnóstico correcto y el tratamiento precoz constituyen hoy día uno de los retos más importantes al cual nos enfrentamos con este tipo de microorganismos.

Procedimiento:

Para la desinfección y siembra de la muestra se siguen los mismos protocolos descritos anteriormente, pero se debe incubar uno de los medios a 37°C y el otro a 30°C si se sospechan especies no tuberculosas como *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, etc. El tiempo de incubación es de 16 semanas y la lectura del cultivo en caso de observarse crecimiento se reporta de igual manera que para *Mycobacterium tuberculosis*.

Hay que tener en cuenta que es necesario realizar pruebas adicionales para poder determinar la especie de la micobacteria aislada.

IDENTIFICACION INMUNOCROMATOGRÁFICA DE COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Consideraciones generales:

* Utilizar todas las medidas de Bioseguridad (gorro, guantes, bata desechable, tapabocas N95) y trabajar en cámara de bioseguridad.

* Es obligatorio que en el momento en que se va a realizar esta prueba, tanto la persona encargada de realizarla como las demás personas presentes en el área utilicen el tapabocas N95. Adicionalmente, se debe restringir completamente el acceso de personal diferente al que se encuentra realizando la identificación hasta que se termine el procedimiento, mediante el bloqueo con llave de la puerta de entrada a la sección.

Fundamento:

SD BIOLINE TB Ag MPT 64 Rapid es una prueba de identificación inmunocromatográfica rápida del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La caracterización biológica, bioquímica, inmunológica y molecular del *Mycobacterium tuberculosis* ha llevado a la identificación de varios antígenos que pueden ser útiles en el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico con el fin de distinguir el complejo M. tuberculosis y micobacterias distintas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT bacilli).

Mycobacterium tuberculosis se ha conocido por secretar más de 33 proteínas diferentes. Una de las proteínas predominantes, MPT64 fue encontrada en el fluido de cultivo en las cepas del complejo M. tuberculosis.

Muestra: Colonias del cultivo positivo para bacilos ácido alcohol resistentes (sólido o líquido) o fluido de condensación del cultivo sólido

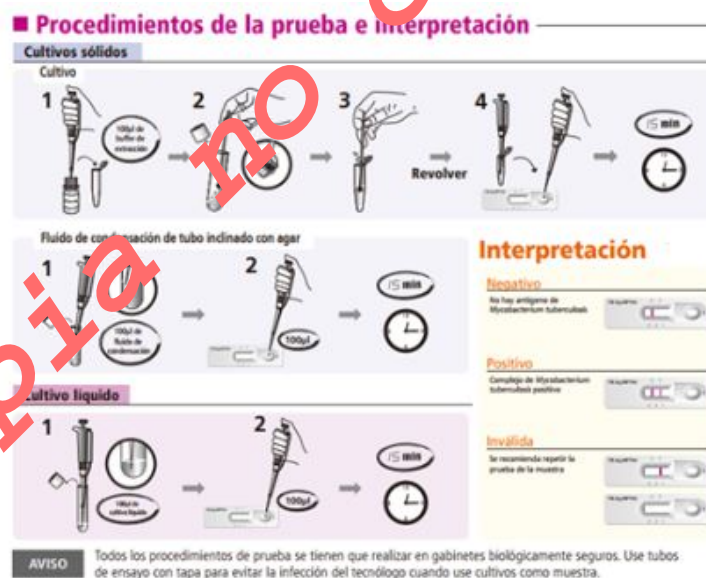
Procedimiento:

1. Cultivos sólidos: Tomar 100 ul de buffer de extracción y dispensarlos en un tubo eppendorf, suspender de 3 a 5 colonias en el buffer, mezclar con vortex e inocular los 100 ul en el cassette

2. Cultivos líquidos: Tomar 100 ul del cultivo e inocular en la ventana del cassette

3. Fluido de condensación: Tomar 100 ul del cultivo e inocular en la ventana del cassette

Dejar correr la muestra 15 minutos a temperatura ambiente y realizar la lectura de la prueba

**Interpretación:**

Negativo: Se observa únicamente la línea control

Positivo: Se observan dos líneas, la línea control y la línea del test

Inválida: No se observa la línea control. La prueba se debe repetir.

Reporte:

Negativo: Negativo para *Complejo Mycobacterium tuberculosis*

Positivo: Positivo para *Complejo Mycobacterium tuberculosis*

Observaciones:

* No olvidar que en caso de que el resultado de la identificación para *Complejo Mycobacterium tuberculosis* sea positiva, se debe realizar remisión de la muestra para la realización de las pruebas de susceptibilidad.

* Cada vez que se abra una caja se debe realizar un control positivo con un cultivo previamente identificado como positivo para *Complejo Mycobacterium tuberculosis* y un control negativo con solución salina.

MICOBACTERIUM DNA DETECTOR (Diagnóstico Molecular)

El diagnóstico molecular ha tomado gran importancia en los últimos años, no solo por el desarrollo de distintas técnicas sino por sus altos valores de sensibilidad y especificidad en relación al tiempo de obtención del resultado y es por esto que ofrece grandes ventajas

- Pruebas con porcentajes de sensibilidad y especificidad con un porcentaje de más del 90% en una muestra que representan una mejoría significativa respecto a la sensibilidad presentada por una baciloscopia en una muestra
- Límites de detección muy inferiores respecto a los entre 5000 y 1000 bacilos requeridos para una baciloscopia positiva
- Tiempo de oportunidad significativamente menor que a la misma baciloscopia y que el cultivo líquido o sólido
- La recomendación de la OMS a estas pruebas permite el uso de las mismas con plena confianza para el diagnóstico
- Al conocerse la prueba molecular como criterio diagnóstico en los casos confirmados por laboratorio, el inicio del tratamiento es más temprano y oportuno

Grandes secuelas funcionales en los pacientes con TB se dan por demoras en el inicio del tratamiento

La morbilidad asociada a la enfermedad genera mayores costos al sistema de salud, mientras un tratamiento rápido disminuyen las complicaciones de los individuos infectados

Uno de los grandes objetivos no solo es el diagnóstico, sino la prevención, por lo tanto un diagnóstico rápido permite tomar medidas para evitar la propagación de la infección

Cultivos derivados de las muestras de pacientes con TB o incluso las mismas muestras directamente se deben dirigir a las pruebas de sensibilidad para determinar el perfil de resistencia del microorganismo principalmente a Rifampicina e Isoniazida

Entre el numeral de responsabilidad por niveles del protocolo de vigilancia de salud pública del INS a las entidades prestadoras de servicios de salud le corresponde realizar acciones de detección temprana como estrategia de control, lo cual se puede fortalecer con el diagnóstico molecular

GENEXPERT

Utilidad Clínica:

El diagnóstico rápido y asertivo de la Tuberculosis permite un manejo inmediato de los pacientes y por lo tanto una mejora considerable en los tiempos de tratamiento de la infección; además de esto permite tomar medidas de contención para controlar la propagación del bacilo y es por esto que los avances tecnológicos y científicos permitieron el desarrollo de técnicas moleculares que permiten la identificación del bacilo tanto en muestras de cultivo como en muestras directas, lo que permite un diagnóstico mucho más rápido.

Los exámenes diagnósticos como Baciloscopia y Cultivos, solo permiten evidenciar la presencia de *Mycobacterias* en las muestras, sin embargo presuntivamente no permiten conocer la especie, mientras las pruebas moleculares permiten conocer mínimamente si la *Mycobacteria* pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* lo que permite avanzar en el diagnóstico.

La evaluación de la sensibilidad a fármacos es de gran importancia debido a que el perfil de resistencia del microorganismo indica la realización del tratamiento y por esto la evaluación también es de gran importancia en el manejo de los pacientes con TB. Poder realizar esta evaluación desde especímenes directos sin esperar el crecimiento de un cultivo mediante la biología molecular también brinda una gran herramienta de tener estos resultados de manera rápida y correcta.

Principio y Método:

- **Principio:** PCR en Tiempo Real

- **Método:**

La prueba Xpert MTB/RIF (en su versión inicial y la versión ultra) es un test molecular que permite mediante la realización de una PCR múltiple en Tiempo Real, realizar la identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) y detectar mutaciones que indiquen resistencia a Rifampicina en distintos especímenes.

La prueba se basa principalmente en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa aplicada en la cual se usan sondas altamente específicas, dos dirigidas a unas regiones altamente conservadas (IS6110 – IS1081) usadas en varias técnicas como blancos de detección y que permiten evidenciar la presencia de material genético de bacterias del CMT y cuatro sondas que reconocen varias regiones altamente conservadas del gen *rpoB* en donde se han identificado más del 95% de las mutaciones que le confieren al microorganismo resistencia a la Rifampicina, adicionalmente mediante una reacción con emisión de fluorescencia se puede evidenciar la reacción en tiempo real, la cual es interpretada al final junto con los controles internos de la prueba (uno que verifica la funcionalidad de los reactivos internos del test y otra que evalúa la eficiencia de las reacciones de amplificación y detección de material genéticos)

Características de Desempeño:

Ver manual

Tipos de muestra:

Actualmente en nuestra institución se montan por esta prueba los siguientes especímenes:

- Espudo
- Espudo inducido
- Lavados y muestras de tracto respiratorio inferior
- Líquido Cefalorraquídeo
- Líquido Pleural (solo se monta en sedes de Cali)

Preparación del paciente:

Ver manual de pruebas

Equipo y Partivos.

Equipo: Unidad de procesamiento Genexpert

Reactivos

- Cartuchos de Reacción Xpert MTB/RIF (ultra)
- Diluyente de la prueba, incluido en el kit
- Muestra (estable 3 días a 35°C y 10 días a 28°C)
- Pipetas, incluidas en el kit

Procedimientos de Calibración:

Ver Manual

Controles:

La prueba cuenta con dos controles internos en cada cartucho de reacción:

- SPC: Controla el procesamiento adecuado de la reacción de PCR al usar DNA de *Bacillus globigii* y una sonda que permite la amplificación; también controla que no hayan inhibidores de la reacción

- PCC: Antes de la reacción el sistema verifica el correcto funcionamiento de las señales de fluorescencia, la estabilidad de los reactivos y la integridad de los fluoróforos y los compara con la configuración pre establecida en el software

Procedimiento:

1. Inicial el sistema Genexpert en el equipo de computo
2. Realizar actividades de mantenimiento según lista de chequeo del equipo de acuerdo a la periodicidad que corresponda (diario, semanal, mensual) y registrar en el formato ID-ADLAB-IN-07-F01.
3. Alistar insumos y reactivos requeridos para el procesamiento
4. Trabajar en Cabina de Seguridad CBS II siempre que se pueda o usar tapabocas de referencia N95
5. En labcore buscar en pestaña de Listas de Trabajo la lista "Mycobacterium DNA Detector" y seleccionar las muestras que se van a procesar y las que se van a remitir; si hay muestras pendientes gestionar respectivamente
6. Abrir con cuidado el recipiente de la muestra y agregar el reactivo a la dilución respectiva según el tipo de muestra:
 1. Esputo y muestras respiratorias no sedimentadas: Dos partes de reactivo por una de muestra (1 ml es la cantidad mínima requerida de esputo y 3-4 ml es la cantidad ideal)
 2. Esputo y muestras respiratorias sedimentadas: Agregar 1.5 ml de reactivo a 0.5 ml del sedimento
 3. LCR y Líquido Pleural
 1. Más de 5 ml de Líquido: Centrifugar LCR (3000 c/15 min), decantar y re suspender sedimento en 2 ml de reactivo
 2. Entre 1 y 5 ml de Líquido: Añadir en partes iguales el reactivo
 3. Entre 0.1 ml y 1 ml: Añadir 2 ml del reactivo (muestras menores a 0.1 ml son insuficientes para procesar)
7. Agitar 10 a 20 veces o usar vortex durante 10 segundos
8. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
9. Agitar nuevamente 10 a 20 veces o usar vortex durante 10 segundos
10. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos si la muestra aun presenta viscosidad dejarla entre 5 a 10 minutos mas)
11. Transferir con pipeta la 2 ml de la preparación a un cartucho de reacción por la apertura de inoculación lentamente, evitando formación de burbujas (esta mezcla es estable por hasta 12 horas en refrigeración o no sobrepasar 4 horas después de preparada)
12. Programar muestra en el software en la pestaña "Create Test" registrando los datos del cartucho, de la muestra y de la identificación del paciente
13. Montar el cartucho en el equipo (no superar 4 horas después de inoculado)
14. Cerrar compartimento hasta escuchar un cierre automático y darle "Start Test"
15. Registrar datos de la muestra procesada en la lista de trabajo de la sección ID-ADLAB-F216 "Montaje DNA Detector Mycobacterium Complex" y al obtener resultado registrar en el Libro de Registro Diario Baciloscopias y Cultivo ID-ADLAB-F59 y validar casilla en lista de trabajo
16. Al finalizar el día registrar cantidad de muestras procesadas en el formato de Eficiencias Reactivos Laboratorio ID-ADLAB-F03.

Interferencias:

Tabla 9. Sustancias interferentes

Sustancia	Descripción/Principio activo	Concentración analizada
Sangre	Sangre (humana)	5 % (v/v)
Coautorio germicida	Gluconato de clorhexidina (0,12 %), solución al 20 %	20 % (v/v)
Reactivos de procesamiento de muestras	Cloruro de cetilpiridinio, 1 % en NaCl al 2 %	0,5 % (v/v) en NaCl al 1 %
Reactivos de procesamiento de muestras	Cloruro de cetilpiridinio, 1 % en NaCl al 2 %	0,5 % (v/v) en NaCl al 1 %
Reactivos de procesamiento de muestras	Cloruro de cetilpiridinio, 1 % en NaCl al 2 % más citrato 25 mM	0,5 % (v/v) en NaCl al 1 % más citrato 12,5 mM
Ácido gástrico	Solución de pH 3 a 4 en agua, neutralizada con bicarbonato de sodio	100 % (v/v)
ADN/células humanas	HELA 229	10 ⁸ células/ml
Antimicótico; antibiótico	Suspensión oral de nistatina, 20 %	20 % (v/v)
Leucocitos (humanos)	Matriz de leucocitos/pus (30 % de capa leucocitaria, 30 % de plasma, 40 % de solución salina tamponada con fosfato)	100 % (v/v)
Anestésicos (intubación endotraqueal)	Lidocaina HCl al 4 %	4 % (v/v)
Soluciones nebulizadoras	NaCl al 5 % (p/v)	5 % (p/v)
Mucina	Mucina al 5 % (p/v)	5 % (p/v)
Antibacteriano sistémico	Levofloxacino 25 mg/ml	5 mg/ml
Corticosteroides nasales	Fluticasona 500 mcg/nebulización	5 µg/ml
Broncodilatadores inhalados	Sulfato de albuterol 2,5 mg/3 ml	100 µg/ml

Intervalos de Referencia Biológicos:Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: NO DETECTADO

Resistencia a la Rifampicina: NO DETECTADA

Límites de Detección:

Xpert MTB/RIF: 131 UFC/ml

Xpert MTB/RIF Ultra: 11,8 UFC/ml

Valores Críticos:

Todo resultado positivo se considera valor crítico y se debe reportar según el Instructivo de Valores Críticos

Interpretación:

Un resultado que muestre amplificación del material genético indicara la presencia del CMT en la muestra y la amplificación de todas las regiones del gen *rpoB* indicaran que el microorganismo se mantiene sin mutaciones que le confieran resistencia, es decir, indicará sensibilidad a la Rifampicina; si alguna de las sondas no es amplificada, será interpretada como una mutación que puede conferirle resistencia al fármaco.

Algoritmo según resultados en el procesamiento:

1. Resultado: Complejo No Detectado: Reportar resultado
2. Resultado: Complejo Detectado, Rifampicina Sensible: Reportar resultado
3. Resultado: Complejo Detectado, Rifampicina Resistente (sedes distintas a Bogotá): Reportar resultado, garantizar siembra de la muestra en cultivo. Solicitar a entidad (aseguradora, sede, institución, clínica, etc) la orden para realización de pruebas moleculares de sensibilidad (CUPS 908846) en muestra directa o pruebas de sensibilidad fenotípicas (CUPS 901007) si aceptan esperar a que el cultivo crezca (ya no se requerirá identificación por el mismo resultado del genexpert). En caso que por medio de la entidad no se logre gestionar nada, el cultivo crecido se puede enviar al INS (LSPC en caso de los de Cundinamarca) con la ficha de notificación, el soporte de afiliación y el resultado de la prueba.
4. Resultado: Complejo Detectado, Rifampicina Resistente (sedes de Bogotá): Reportar resultado, garantizar siembra de la muestra en cultivo. Solicitar a entidad (aseguradora, sede, institución,

clínica, etc) la orden para realización de pruebas moleculares de sensibilidad (CUPS 908846) en muestra directa o pruebas de sensibilidad fenotípicas (CUPS 901007) si aceptan esperar a que el cultivo crezca (ya no se requerirá identificación por el mismo resultado del genexpert). En caso que por medio de la entidad no se logre gestionar nada, el cultivo crecido se puede enviar al LDSP Bogotá con la ficha de notificación, el soporte de afiliación y el resultado de la prueba.

5. Resultado: Complejo Detectado, Rifampicina Indeterminado (sedes externas a Bogotá): **Repetir ensayo**
 - a. si vuelve a dar indeterminado reportar resultado, garantizar siembra de la muestra en cultivo. Solicitar a entidad (aseguradora, sede, institución, clínica, etc) la orden para realización de pruebas moleculares de sensibilidad (CUPS 908846) en muestra directa o pruebas de sensibilidad fenotípicas (CUPS 901007) si aceptan esperar a que el cultivo crezca (ya no se requerirá identificación por el mismo resultado del genexpert).
 - b. Si da Resistente: Seguir lo indicado en el numeral 3
 - c. Si da sensible: Seguir lo indicado en el numeral 2
6. Resultado: Complejo Detectado, Rifampicina Indeterminado (sedes de Bogotá) **Repetir ensayo**
 - a. si vuelve a dar indeterminado reportar resultado, garantizar siembra de la muestra en cultivo. Solicitar a entidad (aseguradora, sede, institución, clínica, etc) la orden para realización de pruebas moleculares de sensibilidad (CUPS 908846) en muestra directa o pruebas de sensibilidad fenotípicas (CUPS 901007) si aceptan esperar a que el cultivo crezca (ya no se requerirá identificación por el mismo resultado del genexpert). En caso que por medio de la entidad no se logre gestionar nada, el cultivo crecido se puede enviar al LDSP Bogotá con la ficha de notificación, el soporte de afiliación y el resultado de la prueba.
 - b. Si da Resistente: Seguir lo indicado en el numeral 4
 - c. Si da sensible: seguir lo indicado en el numeral 2
7. Resultado: Complejo Detectado Trazas, Rifampicina Indeterminado: **Repetir ensayo (en pacientes VIH reportar de manera preliminar resultado de trazas y sensibilidad a Rifampicina indeterminada):**
 - a. si vuelve a dar indeterminado reportar resultado, garantizar siembra de la muestra en cultivo. Solicitar a entidad (aseguradora, sede, institución, clínica, etc) la orden para realización de pruebas moleculares de sensibilidad (CUPS 908846) en muestra directa o pruebas de sensibilidad fenotípicas (CUPS 901007) si aceptan esperar a que el cultivo crezca (ya no se requerirá identificación por el mismo resultado del genexpert). En caso que por medio de la entidad no se logre gestionar nada, el cultivo crecido se puede enviar al LDSP Bogotá (solo aplica sedes Bogotá) con la ficha de notificación, el soporte de afiliación y el resultado de la prueba.
 - b. Si da Resistente: Seguir lo indicado en numerales 3 y 4 según corresponda
 - c. Si da Sensible: seguir lo indicado en el numeral 2
 - d. Si da Complejo No Detectado: Validar resultado inicial con nota de CH y seguir indicaciones de numeral 7a.

Notas de validación:

Para todas las muestras validar con CH y cuando sean positivas con CRC (Dato Crítico)

Para Líquido Pleural y Cefalorraquídeo:

- CH. Un resultado negativo no descarta la presencia de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* debido a una disminuida sensibilidad de la técnica para la detección del micorganismo en este tipo de muestra

Para Resistencia a Rifampicina Indeterminada

- Debido a que la concentración de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra es demasiado baja, no es posible determinar si existe o no resistencia a Rifampicina

Criterios de validación:

Realmente no existen muchos escenarios donde se tengan que evaluar distintos criterios de validación ya que esta prueba se envía con un cuadro clínico previo de sospecha o confirmación de TB y lo único que se debe resaltar es una correcta correlación con la historia clínica del paciente (siempre poner la nota CH) apoyada en otros exámenes, signos y síntomas, ya que incluso hay caso de TB que o bien nunca son confirmados por laboratorio o son diagnosticados solo con la clínica.

Para tener en cuenta, si se debe tratar de saber si es un paciente VIH ya que como se mencionó en el numeral 7 del algoritmo de resultados se debe tomar una conducta ante el resultado de trazas.

HUMALOOP

Utilidad Clínica:

El diagnóstico rápido y asertivo de la Tuberculosis permite un manejo inmediato de los pacientes y por lo tanto una mejora considerable en los tiempos de tratamiento de la infección; además de esto permite tomar medidas de contención para controlar la propagación del bacilo y es por esto que los avances tecnológicos y científicos permitieron el desarrollo de técnicas moleculares que permiten la identificación del bacilos tanto en muestras de cultivo como en muestras directas, lo que permite un diagnóstico mucho más rápido.

Los exámenes diagnósticos como Baciloscopia y Cultivos, solo permiten evidenciar la presencia de Mycobacterias en las muestras, sin embargo presuntivamente no permiten conocer la especie, mientras las pruebas moleculares permiten conocer mínimamente si la Mycobacteria pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* lo que permite avanzar en el diagnóstico.

Principio y Método:

Principio: Amplificación Isotérmica mediada por Bucles

Método:

La prueba TB LAMP es un test molecular que permite mediante la realización de una polimerasa que abre y amplifica el material genético a una misma temperatura, realizar la identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) en muestras de esputo

La prueba se basa en la amplificación de DNA de bacterias del CMT presentes en la muestra en una reacción mediada por una polimerasa que además de tener la capacidad de generar copias del material genético blanco, también tiene acción de helicasa, lo que permite que toda la reacción se realice en un mismo rango de temperatura. La técnica contiene varios pares de primers que además de ser altamente específicos para el DNA blanco, tienen una estructura que genera bucles de amplificación por complementariedad lo cual genera mayor probabilidad de amplificación y mayor especificidad. La amplificación en su reacción genera liberación de compuestos que contienen pirofosfatos los cuales además de generar turbidez mediante la unión al Magnesio que está presente en los reactivos de la prueba, también genera la activación de la Calceína que también está presente en la reacción y genera fluorescencia al momento de existir amplificación del DNA.

Características de Desempeño:

Ver manual

Tipos de muestra:

- Esputo

Preparación de muestra:

- Ver manual de pruebas

Equipo y Reactivos:

Equipo: HumaLoop

Reactivos:

- Reactivo de Detección LoopAMP MTBC
- Reactivo de Extracción de DNA puro MTB LoopAMP
- Muestra (estable 3 días a 28°C, 7 días si la muestra es tratada con NaOH-NaCl)

Procedimientos de Calibración:

Ver Manual

Controles:

La prueba cuenta con dos controles:

- Control Positivo: Reactivo que contiene DNA de MTBC que permite la verificación del proceso de amplificación en la prueba
- Control Negativo: Corresponde a un reactivo blanco de reacción el cual debe permanecer negativo al finalizar la reacción

Procedimiento:

1. Alistar el área de montaje de la prueba, realizando de contaminación de todos los implementos usados con alcohol al 70% y luego con solución salina
2. Realizar actividades de mantenimiento según lista de chequeo del equipo de acuerdo a la periodicidad que corresponda (diario, semanal, mensual) y registrar en el formato
3. Alistar insumos y reactivos requeridos para el procesamiento
4. Trabajar en Cabina de Seguridad CBS II siempre que se pueda o usar tapabocas de referencia N95
5. En labcore buscar en pestaña de Listas de Trabajo la lista "Genexpe" y seleccionar las muestras que se van a procesar si hay muestras pendientes gestionar respectivamente
6. Encender el equipo HumaLoop para permitir que cada bloque de incubación llegue a la temperatura configurada
7. Dispensar con la pipeta del sistema 60 uL de Espudo en el tubo Heating y mezclar de 3-5 veces
8. Procesar el control negativo junto con las muestras
9. Incubar en la unidad de calentamiento del equipo las muestras durante 5 minutos
10. Enroscar el tubo de calentamiento en el tubo absorbente hasta que la muestra caiga al interior
11. Agitar el tubo hasta obtener un aspecto lechoso
12. Enroscar la tapa de inyección en el tubo absorbente y dispensar en el tubo de detección (reacción) hasta la medida marcada
13. Incubar el tubo de reacción de manera invertida durante dos minutos a temperatura ambiente para permitir la mezcla de la muestra con los reactivos
14. Mezclar varias veces vigorosamente
15. Dispensar 40 uL de control positivo a un tubo de reacción para procesar junto con las muestras
16. Incube los tubos de detección (muestras y controles) en la unidad de reacción durante 45 minutos
17. Insertar los tubos en la unidad de visualización UV y encender la lámpara (para la lectura también tener en cuenta no solo fluorescencia sino turbidez)
18. Registrar datos de la muestra procesada en la lista de trabajo de la sección ID-ADLAB-F216 "Montaje DNA Detector MTB Complex" y al obtener resultado registrar en el Libro de Registro Diario Baciloscopias y Cultivo ID-ADLAB-F59 y validar casilla en lista de trabajo
19. Al finalizar el día registrar cantidad de muestras procesadas en el formato de Eficiencias Reactivos Laboratorio ID-ADLAB-F03.

Intervalos de Referencia Biológicos:

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: NO DETECTADO

Límites de Detección:

TB LAMP: 95.7 UFC/ml

Valores Críticos:

Todo resultado positivo se considera valor crítico y se debe reportar según el Instructivo de Valores Críticos

Interpretación:

Un resultado que muestre amplificación del material genético mediante la turbidez del medio o la evidencia de fluorescencia indicará la presencia del MTBC en la muestra, comparando frente al control negativo.

El control positivo valida la eficiencia de la prueba mas no es un estándar de comparación con las muestras por la intensidad de la fluorescencia verde

Algoritmo según resultados en el procesamiento:

1. Resultado Complejo No Detectado: Reportar resultado
2. Resultado Complejo Detectado: Realizar Montaje de prueba Genexpert (tener en cuenta algoritmo de montaje de Genexpert para el respectivo reporte)

Notas de validación:

Para todas las muestras validar con CH y cuando sean positivas con CRC (Dato Crítico)

Criterios de validación:

Realmente no existen muchos escenarios donde se tengan que evaluar distintos criterios de validación ya que esta prueba se envía con un cuadro clínico previo de sospecha o confirmación de TB y lo único que se debe resaltar es una correcta correlación con la historia clínica del paciente (siempre poner la nota CH) apoyada en otros exámenes, signos y síntomas, ya que incluso hay caso de TB que o bien nunca son confirmados por laboratorio o son diagnosticados solo con la clínica.

INDICACIONES A TENER EN CUENTA PROGRAMA TB

Debido a la gran cantidad de pruebas, técnicas y forma en que las distintas entidades envían las muestras para el diagnóstico de tuberculosis se debe tener en cuenta lo siguiente:

- La baciloscopia seriada cuenta con un código CUPS propio 901111 y por lo tanto siempre se debe garantizar que soliciten el estudio seriado y no una sola muestra
- El cultivo de mycobacterias posee una mayor sensibilidad que la baciloscopia y por lo tanto es ideal su realización de la segunda muestra de la baciloscopia seriada (si estas son llevadas por el paciente) en caso que solo sea llevada la primera, se debe garantizar la siembra de esta muestra.
- Cuando se obtenga un resultado positivo ya sea de baciloscopia, de cultivo o de DNA detector, este resultado debe ser marcado como valor crítico.
- Cuando se realice la lectura de la baciloscopia seriada y la muestra sembrada (primera o segunda) resulte negativa pero la baciloscopia No 3 resulte positiva, notificar a la sede que realiza el proceso del cultivo para proceder a sembrar esa muestra cuya cantidad de bacilos es mas alta.
- Cuando se obtiene un cultivo positivo de mycobacterias, se debe notificar via correo electrónico a coordinación de microbiología y al grupo comercial (ejecutivos de cuenta) solicitando la gestión de las ordenes respectivas para las pruebas de identificación y sensibilidad del cultivo; una vez realizada la identificación del cultivo como Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) se debe enviar el cultivo al laboratorio de red de apoyo que realiza las pruebas de sensibilidad del cultivo.
- Cuando la identificación del cultivo sea negativa para MTBC se debe gestionar con la entidad una solicitud con la prueba para identificación de Mycobacterias no tuberculosas a partir de cultivo. En caso que la entidad no acepte, se puede solicitar a la respectiva entidad la autorización para el envío del cultivo al INS para la identificación respectiva a partir del cultivo como parte de vigilancia del programa de micobacteriosis.
- Cuando se obtenga un cultivo positivo de un paciente cuya muestra haya sido procesada y tenga un resultado de DNA detector positiva, solo se debe solicitar la orden para las pruebas de sensibilidad (incluyendo los que tengan resultado de Rifampicina) ya que se debe garantizar el perfil completo de sensibilidad de primera línea
- Cuando se obtenga un resultado de genexpert de detección del complejo positiva y resistencia a Rifampicina indeterminada, seguir las instrucciones del algoritmo de decisión de esta prueba (ver prueba Genexpert).
- Tener en cuenta que existen pruebas de identificación y sensibilidad que no son moleculares y que se realizan a partir de cultivos positivos y existen pruebas moleculares que se realizan a partir de muestras directas, incluida la sensibilidad, para no confundir las respectivas solicitudes.

- Tener en cuenta que si se obtiene un resultado positivo de un cultivo control de un paciente con diagnóstico de TB no es necesario repetir las pruebas y lo que se debe es indagar con la entidad si están sospechando de falla terapéutica y por lo tanto se requiera hacer pruebas de sensibilidad de segunda línea o si creen que sea una cepa distinta y requieran identificación y sensibilidad.

Estabilidad de la muestra:

PRUEBA	DIAS	TEMPERATURA
Baciloscopia	Espuito y muestras pulmonares: Máximo 72 horas Muestras extra pulmonares: Máximo 24 horas	2-8 °C
Cultivo	Muestras pulmonares y jugo gástrico: 24 horas Líquidos Corporales: 7 días	2-8 °C
Genexpert	10 días 3 días	2-8 °C Ambiente
TBLAMP	8 días 30 días	2-8 °C -20 °C

Conservación y descarte de las muestras:

Las muestras serán conservadas en refrigeración durante 10 días en el cuarto frío, debido al uso previsto de la muestra para realización de otras pruebas teniendo en cuenta el enfoque de riesgo en el cual se debe garantizar que se puedan realizar las pruebas diagnósticas disponibles según el algoritmo de diagnóstico que se encuentra en los lineamientos del instituto nacional de salud.

Las muestras serán descartadas luego de este tiempo completamente cerradas en una bolsa roja, la cual será debidamente marcada y dispuesta para que la ruta sanitaria destine según corresponda a la ruta final de entrega al encargado de la disposición final de los residuos de acuerdo al contractual vigente.

LEPRA

BACILOSCOPIA

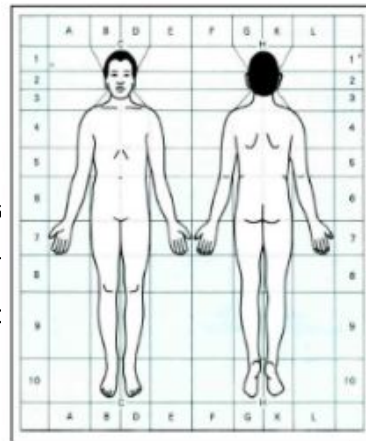
Fundamento:

Si al examen clínico se tiene como impresión diagnóstica lepra, se debe proceder a la toma de la muestra de líquido intersticial, para realizar la baciloscopia con el fin de clasificar el caso como multibacilar, si el resultado del examen es positivo (índice bacilar > 0) o paucibacilar, si el resultado es negativo (índice bacilar = 0). Un examen con índice bacilar igual a cero (0) no descarta el diagnóstico de lepra, en este caso se debe realizar una biopsia de piel.

La solicitud del examen, debe ser completa y contener todos los datos del paciente, además debe acompañarse del esquema corporal donde el médico deberá señalar los sitios en los cuales se van a tomar las muestras.

Para la toma de la muestra se requieren:

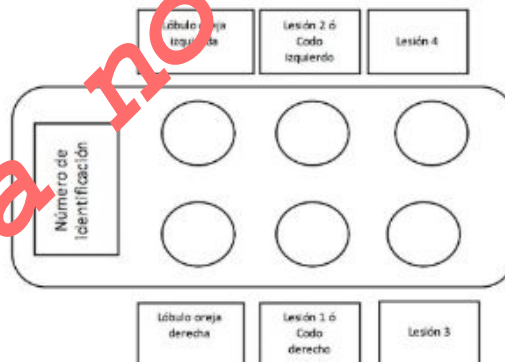
- Dos láminas portaobjetos nuevas, desengrasadas
- Aplicadores con algodón
- Lápiz punta de diamante para marcar las láminas
- Lancetas
- Pinzas tipo Kelly con la punta recubierta con algodón
- Alcohol al 70%



adadas

Procedimiento:

1. Marcar con el lápiz punta de diamante las láminas con el número interno del paciente.
2. Con las pinzas tipo Kelly, obtener isquemia en el sitio de toma, para así conseguir muestra de líquido intersticial, libre de sangre. Las muestras a tomar deben ser principalmente: Lóbulo oreja derecha, lóbulo oreja izquierda, codo derecho, codo izquierdo y dos lesiones bien identificadas.
3. Limpiar el área con alcohol al 70% y con una lanceta pinchar la zona y recolectar el líquido intersticial obtenido, junto con el tejido que se pueda desprender. En todas las muestras: Codos, lóbulos de las orejas y lesiones, se debe obtener líquido intersticial rico en macrófagos donde se obtendrán los bacilos.
4. La muestra obtenida se debe colocar en la lámina, ocupando un espacio de aproximadamente 1 cm de diámetro, tal y como se indica en la imagen.



5. Dejar secar las láminas a temperatura ambiente.
6. Fijar con calor y colorear con Zielh Neelsen con los siguientes tiempos:
 - Cubrir las láminas completamente con fucsina fenicada durante 10 minutos, calentando 5 veces hasta la emisión.
 - Dejar enfriar por cinco minutos.
 - Lavar con agua.
 - Alcohol ácido por 5 minutos o hasta que la lámina decolore completamente.
 - Lavar con agua.
 - Realizar la coloración de contraste con azul de metileno durante 10 minutos
 - Lavar con agua
 - Dejar secar la lámina a temperatura ambiente

No olvidar que los colorantes deben ser filtrados diariamente.

7. Realizar la lectura de las láminas utilizando una cuadrícula de 10 x 10 campos, anotando en cada campo lo observado. Si se observan globias, se debe tener en cuenta si es pequeña, mediana o grande. Una globia grande equivale a 1000 bacilos, una mediana a 600 y una pequeña a 300 bacilos.

8. Calificar la muestra de acuerdo a la escala semicuantitativa nacional para aquellas sedes donde no se haya entrenado el personal, la escala es la siguiente:

ESCALA SEMICUANTITATIVA		
VALOR	CAMPOS OBSERVADOS	BACILOS OBSERVADOS (descripción de la lectura)
0+	100	NO SE OBSERVAN B.A.A.R EN LA MUESTRA EXAMINADA
1+	100	0-1 BACILO POR CAMPO
2+	50	1-10 BACILOS POR CAMPOS
3+	20	> 10 BACILOS POR CAMPO O GLOBIAS

Para aquellas sedes que cuenten con entrenamiento en la escala logarítmica Ridley (sede Bogotá) se debe reportar según esta:

RIDLEY ESCALA LOGARITMICA [1]		
GRADUACION	# BACILOS OBSERVADO POR CAMPO	# CAMPOS ESTUDIADOS
0	0	100
1+	0,01-0,1	100
2+	0,1-1	25
3+	1-10	25
4+	10-100	25
5+	100-1000	25
6+	>1000	25

9. Calcular el índice bacilar: El Índice Bacilar corresponde al promedio aritmético del número de cruces obtenidas de cada uno de los sitios observados y se informa en números arábigos. Este Índice bacilar (IB) se realizará teniendo en cuenta la [Escala de Ridley o la escala semicuantitativa según aplique](#)

Para cada una de las muestras se registrará el número de cruces de acuerdo a la Escala leída (no la descripción de la lectura)

Según esta lectura y cálculo de índice bacilar la clasificación bacteriológica de la lepra es:

Multibacilar: IB mayor a 0

Paucibacilar: IB igual a 0

El paciente clasificado como multibacilar debe tener un examen de baciloscopia de control semestral, dadas las lentas tasas de disminución del índice bacilar. Para pacientes paucibacilares se debe realizar examen de control al finalizar el tratamiento.

10. Se deben realizar dos láminas por muestra, una de estas será coloreada inmediatamente se realicen los extendidos para su respectiva lectura y la otra será guardada como contra muestra, en caso de presentarse alguna eventualidad. Esta lámina de contra muestra será almacenada en un contenedor con tapa luego de ser fijada con calor y sin colorear; en un término de 24 horas después de la realización del extendido, las láminas de contra muestra deben ser descartadas en un contenedor de paredes rígidas

11. Luego de realizada la lectura, limpiar la lente del microscopio con alcohol al 70%

13. Para el almacenamiento de las láminas ya coloreadas, luego de la lectura se debe realizar los siguientes pasos

- Retirar el exceso de aceite de inmersión
- Sumergir las láminas en alcohol al 70% durante 30 segundos
- Secar el exceso de alcohol sin retirar la muestra

- Almacenar por fecha de manera organizada las láminas correspondientes al mes en curso y al mes inmediatamente anterior (tener en cuenta también las solicitudes para evaluación del desempeño indirecto de los distintos laboratorios de salud pública).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1. Baciloscopia. Organización Panamericana de la Salud. 2008
- Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2. Cultivo. Organización Panamericana de la Salud. 2008
- Guía para la vigilancia por laboratorio de tuberculosis. Grupo de Micobacterias. Dirección de redes en salud pública. Instituto Nacional de Salud. 2017
- Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Programa "Fortalecimiento de la red de laboratorios de tuberculosis en la región de las Américas. Parte 1 "Manual de actualización de la Baciloscopia. Organización Andino de Salud. 2018
- Manual de normas y procedimientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Ministerio de Salud. 2016
- Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Tuberculosis. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. 2017
- Micobacterias. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica SEIMC. 2005
- Detección de TB de forma precisa y sencilla. Resultados rápidos y fiables con TB-LAMP. HUMAN
- Joon D, Nimesh M, Saluja D. Loop-mediated isothermal amplification as alternative to PCR for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. INT J TUBERC LUNG DIS 19(8):986-991. 2015
- World Health Organization Model List of Essential In Vitro Diagnostics. 2018. First Edition. World Health Organization
- Genexpert Dx System. Manual del operador. Cepheid. Junio de 2012
- Xpert® MTB/RIF and Xpert® MTB/RIF Ultra Alternate Specimen Testing Procedures.
- Módulo 6: GeneXpert Tecnología y Procedimientos del GeneXpert MTB/RIF. Iniciativa Mundial del Laboratorio. Módulos de Capacitación de Xpert MTB/RIF
- Sustancias interferentes. Xpert MTB/RIF Ultra, Mayo de 2017
- Módulo 1: Sobre tuberculosis (TB) y su diagnóstico. Iniciativa Mundial del Laboratorio. Módulos de Capacitación de Xpert MTB/RIF
- Technical and operation "how to" practical consideration. Xpert MTB/RIF implementation manual. World Health Organization

Copia no controlada